

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

LARA HEWILIN FERNANDES ROSA

**Novos derivados do azul de metileno como potenciais
fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica em câncer de
mama triplo negativo.**

UBERLÂNDIA

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**Novos derivados do azul de metileno como potenciais
fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica em câncer de
mama triplo negativo**

Lara Hewilin Fernandes Rosa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

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

Uberlândia

2025

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

R788 2025	<p>Rosa, Lara Hewilin Fernandes, 2002- Novos derivados do azul de metileno como potenciais fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica em câncer de mama triplo negativo. [recurso eletrônico] / Lara Hewilin Fernandes Rosa. - 2025.</p> <p>Orientadora: Tayana Mazin Tsubone. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Química Industrial. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Tecnologia química. I. Tsubone, Tayana Mazin, 1989-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Química Industrial. III. Título.</p> <p>CDU: 660.2</p>
--------------	--

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

**Novos derivados do azul de metileno como potenciais
fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica em câncer de
mama triplo negativo**

LARA HEWILIN FERNANDES ROSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do título
de bacharel em Química Industrial.

Uberlândia-MG, 22 de setembro de 2025

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Tayana Mazin Tsubone (Orientadora)

Prof^a. Dr^a Carolina Gonçalves Oliveira (Examinadora)

Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior (Examinador)

Dedico este trabalho à minha mãe
Helen e avó Vera que sempre me apoiaram
com um amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial minha mãe Helen e avó Vera por sempre me apoiarem nos estudos e no meu desenvolvimento pessoal e profissional com amor e carinho.

A Prof^ª. Tayana Mazin Tsubone pela orientação e paciência para me orientar neste trabalho, além de ter me acolhido na área da Terapia Fotodinâmica. Agradeço a Prof^ª Carolina Gonçalves Oliveira, Prof. Celso de Oliveira Rezende Júnior e Prof. Sidnei Gonçalves por terem aceitado o convite para compor a minha banca de TCC.

Sou grata por toda a equipe do LIFeBio, Ieda, Patrícia, Maynne e Helner pelas trocas de conhecimento e metodologias. Em especial, agradeço a Ieda por me acompanhar nos experimentos e me instruir para a realização deles da melhor forma possível.

Aos meus melhores amigos, Ananda e Athirson pelo companheirismo e por tornarem os dias da graduação mais leves e alegres.

Ao meu namorado Keldson pelo companheirismo, apoio e incentivo nesta jornada.

Agradeço à FAPEMIG (APQ-00704-21, APQ-02393-24), ao CNPq (407282/2023-8, 308094/2025-5) e à CAPES (PROEX e Código de Financiamento 001) pelo apoio financeiro que viabilizou a aquisição de materiais de consumo e permanentes, indispensáveis ao desenvolvimento desta pesquisa. Ressalto, ainda, o auxílio financeiro recebido por meio do Prêmio “*Para Mulheres na Ciência*” 2023, concedido pela L’Oréal-Brasil, UNESCO e Academia Brasileira de Ciências, que também contribuiu para aprimorar as condições de trabalho no Laboratório Interdisciplinar de Fototerapia e Biomoléculas (LIFeBio).

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de cursar a graduação de Química Industrial.

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo é um subtipo altamente agressivo, caracterizado pela ausência de três receptores: de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), eliminando opções de terapias-alvo convencionais. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como alternativa promissora, desde que fotossensibilizadores (FS) eficientes sejam empregados. Este trabalho avaliou as propriedades fotofísicas e atividade biológica de dois novos derivados do azul de metileno (AM), denominados AM-NMP, derivado com um grupo dimetilamino substituído por um grupo naftil-metil-piperazina e AM-I (cloreto de 3-(dimetilamino)fenotiazina-5-io), frente à linhagem de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231). Os ensaios espectroscópicos revelaram que o AM-NMP apresenta coeficiente de absorvidade molar elevado ($\epsilon \approx 5,1 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), enquanto o AM-I exibiu ϵ significativamente menor ($\approx 1,0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), o que representa eficiência de absorção de fótons cerca de cinco vezes menor. Os novos derivados apresentaram rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) reduzidos em comparação ao azul de metileno ($\Phi_f = 0,04$), sendo o valor para o AM-NMP aproximadamente dez vezes menor ($\Phi_f = 0,0041$) e para o AM-I cerca de duas vezes menor ($\Phi_f = 0,020$). Já o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) mostrou-se baixo para ambos os derivados ($\approx 0,021$), em contraste com o AM (0,52). Apesar dessas limitações, os dois compostos exibiram boa fotoestabilidade até 22 minutos de irradiação, assegurando desempenho adequado dentro das condições experimentais dos ensaios biológicos, que requerem apenas 12 minutos de exposição à luz. Nos ensaios de viabilidade celular, nenhum dos compostos apresentaram citotoxicidade no escuro nas concentrações testadas (0,1 μM à 10 μM) em células de MDA-MB-231. Já sob irradiação com LED vermelho ($\lambda = 633 \text{ nm}$, dose $\approx 5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$), o AM apresentou $\text{IC}_{50} \approx 3,1 \mu\text{M}$, o AM-NMP $\approx 6,7 \mu\text{M}$ e o AM-I não demonstrou fototoxicidade ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). Esses resultados indicam que o AM-NMP mantém fotoatividade promissora ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$), ainda que inferior ao AM, enquanto o AM-I se mostrou ineficiente para a aplicação proposta. De forma geral, as modificações estruturais não resultaram em maior eficácia fotodinâmica em relação ao azul de metileno, mas os dados obtidos fornecem subsídios importantes para a compreensão das relações estrutura-atividade e apontam caminhos para otimizações futuras.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica (TFD), derivados de azul de metileno, câncer de mama.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer is a highly aggressive subtype characterized by the absence of three receptors—estrogen (ER), progesterone (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)—which eliminates the possibility of conventional targeted therapies. In this context, Photodynamic Therapy (PDT) emerges as a promising alternative, provided that efficient photosensitizers (PS) are employed. This study evaluated the photophysical properties and biological activity of two novel methylene blue (MB) derivatives, AM-NMP, derivative in which one dimethylamino substituent is replaced by a naphthyl-methyl-piperazine group and AM-I (3-(dimethylamino)phenothiazin-5-ium chloride), against the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Spectroscopic assays revealed that AM-NMP displayed a high molar absorptivity coefficient ($\epsilon \approx 5.1 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), whereas AM-I showed a significantly lower value ($\epsilon \approx 1.0 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), corresponding to nearly five-fold lower photon absorption efficiency. Both derivatives exhibited reduced fluorescence quantum yields (Φ_f) compared to MB ($\Phi_f = 0.04$), with AM-NMP being about ten times lower ($\Phi_f = 0.0041$) and AM-I about two times lower ($\Phi_f = 0.020$). The singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) was also low for both derivatives (≈ 0.021), in contrast with MB (0.52). Despite these limitations, both compounds showed good photostability up to 22 minutes of irradiation, ensuring adequate performance under the biological experimental conditions, which required only 12 minutes of light exposure. Cell viability assays demonstrated no dark cytotoxicity for any compound at the tested concentrations (0.1–10 μM) in MDA-MB-231 cells. Under red LED irradiation ($\lambda = 633 \text{ nm}$, dose $\approx 5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), MB exhibited $\text{IC}_{50} \approx 3.1 \mu\text{M}$, AM-NMP $\approx 6.7 \mu\text{M}$, while AM-I showed no phototoxicity ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). These results indicate that AM-NMP retains promising photoactivity ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$), although less effective than MB, whereas AM-I proved inefficient for the proposed application. Overall, the structural modifications did not enhance PDT efficacy compared with methylene blue, but the findings provide important insights into structure–activity relationships and highlight future directions for optimization.

Keywords: photodynamic therapy (PDT), methylene blue derivatives, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subtipos de câncer de mama e seus marcadores.	2
Figura 2. Processos que ocorrem para fotossensibilizadores ao serem ativados por luz ilustrado por um diagrama de Jablonski.	4
Figura 3. Estrutura química do Azul de Metileno (AM).	6
Figura 4. Estrutura química dos compostos (A) azul de metileno (AM), (B) azul de metileno intermediário (AM-I) e azul de metileno ligado a naftil-metil-piperazina (AM-NMP).	9
Figura 5. Espectro de sobreposição da emissão do LED vermelho utilizado no trabalho e a região de absorbância das moléculas estudadas.	13
Figura 6. Esquema representativo de microplaca com 96 poços, sendo a linha A o controle (CT) apenas células sem composto, as colunas 1, 2, 3 e 4 incubadas com AM, as colunas 5, 6, 7 e 8 com AM-NMP e 9, 10, 11 e 12 com AM-I em diferentes concentrações.	15
Figura 7. Reação de redução do MTT (sal amarelo solúvel em água) a formazan (sal de cor roxa insolúvel em água e solúvel em DMSO).	16
Figura 8. Reação de redução da resazurina (cor azul em solução) a resorufina (coloração rosa em solução com PBS).	17
Figura 9. Espectros de absorção no UV-vis dos compostos AM-NMP (A) e AM-I (B) nos solventes clorofórmio (CHCl ₃), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol (EtOH), água (H ₂ O), metanol (MeOH) e tampão fosfato salino (PBS).	19
Figura 10. Espectros de absorbância do (A) AM-NMP e (B) AM-I nas diferentes concentrações em etanol. Relação linear entre o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorbância (655 nm AM-NMP e 580 nm AM-I) e a concentração de (C) AM-NMP e (D) AM-I. Os ensaios foram realizados em triplicata, portanto cada ponto refere-se à barras de erro o desvio médio das replicatas.	21
Figura 11. Espectros de emissão de fluorescência do AM, AM-NMP e AM-I em etanol. λ_{exc} = 580 nm, e fenda de excitação 10 nm e fenda de emissão 20 nm. Experimento realizado em duplicata, portanto este é apenas o espectro representativo de cada composto.	24
Figura 12. Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.	26

Figura 13. Espectros de absorbância do DPBF em função do tempo de irradiação na presença de (A) AM, (B) AM-NMP e (C) AM-I. Amostra irradiada com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm), potência 0,943 mW/cm ² à 40,0 cm de distância da amostra.	27
Figura 14. Curvas cinéticas do consumo de DPBF (em 411 nm) em função do tempo de irradiação dos FSs com LED vermelho. ($\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm), potência 0,943 mW/cm ² à 40,0 cm de distância da amostra.....	28
Figura 15. Representação gráfica comparativa dos espectros de absorção dos compostos sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{emissão}} = 633$ nm), potência 6,98 mW/cm ² à 7,0 cm de distância da amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata; cada ponto corresponde à média e as barras de erro representam o desvio padrão.	30
Figura 16. Gráficos de % viabilidade celular em função da concentração (μM) do AM, AM-NMP e AM-I pelo método MTT (A) no escuro, (B) irradiado e pelo método com resazurina (C) no escuro e (D) irradiado após 2 horas de incubação do FS. As barras representam a média \pm desvio médio de quatro réplicas ($n = 4$) realizadas num mesmo dia. Sistema de irradiação utilizado foi LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm, dose de luz ≈ 5 J/cm ²).resazurina (C) no escuro e (D) irradiado após 2 horas de incubação do FS. As barras representam o desvio méd	
Figura 17. Gráficos de %viabilidade celular <i>versus</i> log[concentração] do FS para determinação do IC ₅₀ para os compostos AM, AM-NMP e AM-I. Resultados dos ensaios de viabilidade celular obtidos pelos métodos (A) MTT e (B) resazurina. LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm, dose de luz ≈ 5 J/cm ²).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fotossensibilizadores reconhecidos mundialmente para tratamento de câncer, com testes clínicos aprovados e/ou comercialmente disponíveis.....	6
Tabela 2. Dados referentes ao comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorbância dos FS e seus respectivos valores de absortividade molar (ϵ).....	22
Tabela 3. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) calculados, com $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência em 670 nm. Experimento realizado em duplicata, portanto os valores representam a média e desvio padrão (DP).....	24
Tabela 4. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) dos FSs em etanol.	28
Tabela 5. Valores de IC_{50} (μM) dos compostos AM, AM-NMP e AM-I em células MDA-MB-231 sob efeito da irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$), utilizando dois métodos de viabilidade celular: MTT e resazurina.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizadores
AM	Azul de Metileno
ER	Receptores de estrogênio
PR	Receptores de progesterona
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
Ki-67	Índice de proliferação celular
S₀	Estado fundamental singlete
S₁	Estado excitado singlete
T₁	Estado excitado triplete
ISC	Cruzamento intersistemas, (do inglês <i>intersystem crossing</i>)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
O₂^{-•}	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
³O₂	Oxigênio molecular
¹O₂	Oxigênio singlete
Φ_A	Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete
Φ_f	Rendimento Quântico de Fluorescência
DPBF	1,3- difenilisobenzofurano
PBS	Tampão Fosfato Salino
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
λ_{máx}	Comprimento de onda no máximo de absorção
IC₅₀	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer	1
1.2	Câncer de mama	1
1.3	Tratamentos convencionais e seus obstáculos	3
1.4	Terapia fotodinâmica (TFD).....	4
1.5	Fotossensibilizadores	5
1.6	Azul de metileno	6
2	OBJETIVO.....	9
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3	METODOLOGIA.....	10
3.1	Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes	10
3.2	Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ)	10
3.3	Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)	11
3.4	Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ)	11
3.5	Estudo de fotoestabilidade dos compostos por UV-Vis	13
3.6	Ensaio biológico	14
3.7	Linhagem celular e preparo	14
3.8	Viabilidade celular pelo método MTT	15
3.9	Viabilidade celular pelo método resazurina	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1	Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes	19
4.2	Coeficiente de absortividade molar (ϵ).....	20
4.3	Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)	23
4.4	Rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ).....	25
4.5	Fotoestabilidade	29
4.6	Ensaio de viabilidade celular	30
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	34
6	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer consiste em um grupo de doenças caracterizado pela proliferação celular de forma desordenada e que são capazes de invadirem tecidos e órgãos diversos. Células saudáveis se multiplicam de forma controlada por meio da divisão celular ordenada, sendo responsáveis pela regeneração de tecidos e órgãos. Células cancerosas, no entanto, apresentam crescimento desordenado formando células anômalas causando problemas na área afetada e o organismo como um todo (OLIVEIRA, 2020).

Os casos de câncer, em sua maioria (80 a 90%), são causados por fatores ambientais que compreendem estilo e hábitos de vida, como a exposição excessiva ao sol, tabagismo, manuseio de produtos químicos, dentre outros. Fatores internos como pré-disposição genética, condições imunes e alterações hormonais também podem levar ao surgimento de câncer (COLEMAN; TSONGALIS, 2002).

Os dados do *Global Cancer Observatory* mostraram que em 2022 o câncer foi responsável pela segunda maior causa de morte no mundo, com uma estimativa de 9,7 milhões de mortes e 20 milhões de novos casos sendo o câncer de pulmão o mais incidente (2,5 milhões de casos), em seguida o de mama feminino (2,3 milhões), câncer colorretal (1,9 milhões), seguidos pelo câncer de próstata e o de estômago (BRAY et al., 2024) Sendo que 1 a cada cinco pessoas desenvolve câncer ao longo da vida, em relação a taxa de mortalidade, 1 em cada 9 homens e 1 em cada 12 mulheres morrem da doença (BRAY et al., 2024).

Sabe-se que o tipo de câncer varia em cada região, de acordo com fatores sociais e com o desenvolvimento econômico do país. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima cerca de 704 mil novos casos por ano para o triênio 2023-2025, sendo os mais incidentes: câncer de pele não melanoma (31,3%), mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2023).

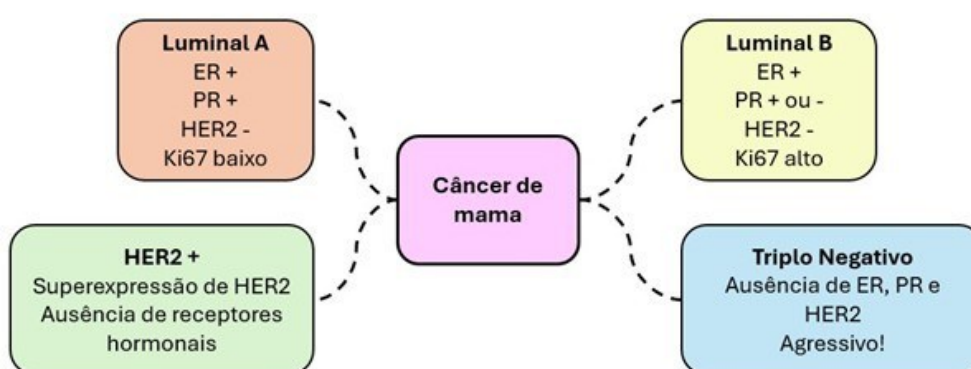
1.2 Câncer de mama

Dentre os tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama feminino por sua grande incidência na população, ficando atrás somente do câncer de pulmão mundialmente e do câncer de pele não melanoma no Brasil. Uma das classificações de câncer de mama se baseia na expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), bem como no índice de proliferação celular Ki-67,

expresso como a porcentagem de células tumorais ativas. Sendo que, valores baixos estão associados a tumores com crescimento mais lento apresentando melhor prognóstico e valores elevados são associados a tumores mais agressivos, com maior risco de reincidência. (PRAT; PEROU, 2011)

Na **Figura 1** é apresentado um esquema dos subtipos de câncer de mama e suas principais características.

Figura 1. Subtipos de câncer de mama e seus marcadores.



Fonte: Adaptado de (ARANHA, 2025).

Dentre os subtipos, o mais agressivo é o câncer de mama triplo negativo (CMTN), caracterizado pela ausência de receptores de ER, PR e HER2, o que elimina opções de terapias-alvo. Logo, seu tratamento fica limitado à quimioterapia (PRAT; PEROU, 2011). Outro aspecto é seu perfil “*basal-like*”, que consiste em uma alta instabilidade genômica, uma elevada proliferação celular, além de apresentar vias de reparo de DNA defeituosas (BAIRD; CALDAS, 2013). Seu curso clínico agressivo também é ligado a sua maior propensão à metástase precoce para o pulmão e sistema nervoso central, apresentando o pior prognóstico dentre os subtipos de câncer de mama (BIANCHINI et al., 2016).

No Brasil, um estudo com 447 pacientes apontou que 19,5 % dos casos de câncer de mama eram do tipo triplo negativo, com sobrevida em 5 anos de apenas 62,1 %, comparado a 80,8 % aos outros subtipos (GONÇALVES et al., 2018). Uma pesquisa do MSD Brasil de 2024, apontou que 10 a 15% dos casos de câncer de mama são do tipo triplo negativo. Sendo que 1 em cada 3 pacientes com o diagnóstico pode apresentar recorrência da doença dentro de até 3 anos (MSD, 2024).

1.3 Tratamentos convencionais e seus obstáculos

Para o tratamento de câncer existem diferentes abordagens terapêuticas que podem ser empregadas de forma isolada ou combinada. A escolha do tratamento é dada de acordo com a localização do tumor, tipo histológico, estágio da doença e as condições clínicas do paciente. Os tratamentos convencionais incluem quimioterapia, radioterapia, cirurgias, hormonoterapia e terapias alvo (MAYO CLINIC, 2025; PETRELLIS, 2014). Em relação ao câncer de mama triplo negativo, as opções são limitadas e seu tratamento se torna desafiador.

- Cirurgia: Consiste na remoção cirúrgica do tumor ou de toda a área afetada. Para o câncer de mama é realizada a tumorectomia (retirada do tumor com uma margem de segurança) ou a mastectomia (retirada total da mama). Para estágios iniciais pode ser curativa, mas em estados avançados, apenas paliativo. Pode apresentar complicações pós-operatórias e gera impactos psicológicos e na autoestima da paciente (MAYO CLINIC, 2025).
- Quimioterapia: No tratamento é utilizado fármacos com caráter citotóxico, capazes de inibir a divisão celular. Sua utilização gera efeitos adversos como alopecia (queda de cabelo), náuseas e vômitos, fadiga, mielossupressão e imunossupressão. Além disso o tratamento pode apresentar efeitos cardiotóxicos e nefrotoxicidade, reduzindo a qualidade de vida do paciente (MAYO CLINIC, 2025).
- Radioterapia: Emprega radiação ionizante para destruir células tumorais, geralmente indicada para tratamento complementar da cirurgia e quimioterapia. Pode causar lesões em tecidos saudáveis adjacentes, descamação e eritema cutâneo, fibrose local e alteração da textura da mama (MAYO CLINIC, 2025).
- Hormonoterapia: Sua ação é bloquear os receptores de ER e PR, reduzindo a progressão de tumores hormônio-dependentes, não sendo eficaz contra o câncer de mama triplo negativo. Pode aumentar o risco de trombose, de doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral (AVC), altera o humor e libido, além de facilitar o ganho de peso (MAYO CLINIC, 2025).
- Terapias alvo: Atua nos receptores de HER2, responsáveis por proliferação celular excessiva, inibindo esses receptores, a terapia diminui a carcinogênese do tumor. Pode apresentar cardiotoxicidade, problemas gastrointestinais, além de toxicidade hepática e cutânea (MAYO CLINIC, 2025).

Os tratamentos convencionais em sua maioria não apresentam uma boa opção para o câncer de mama triplo negativo, devido à sua ausência de alvos terapêuticos e sua alta

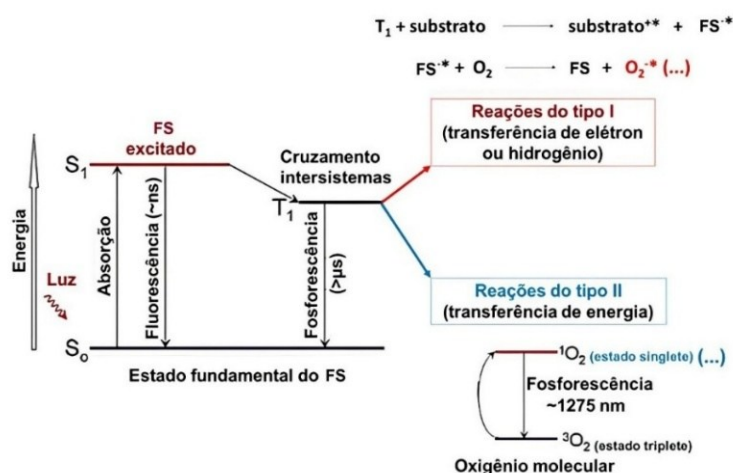
heterogeneidade molecular. Além disso, os tratamentos que podem ser utilizados, apresentam efeitos adversos indesejáveis para as pacientes. Diante disso, terapias alternativas emergentes como a terapia fotodinâmica (TFD) são estudadas como uma alternativa promissora para o tratamento de câncer de mama triplo negativo, garantindo uma maior sobrevida e qualidade de vida para as pacientes.

1.4 Terapia fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) combina um composto fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz com comprimento de onda específico e o oxigênio molecular. Essa combinação é capaz de gerar espécies reativas que apresentam citotoxicidade, sendo capazes de destruir células tumorais e vasos sanguíneos tumorais o que reduz o suprimento de nutrientes e oxigênio para estas células. Bem como induzir uma resposta imunológica, pela liberação de antígenos tumorais. A seletividade e eficácia deste tratamento parte do princípio de acumular o FS diretamente nas células do câncer e sua atividade somente é ativada na presença de luz com comprimento de onda específico, sem causar danos a tecidos adjacentes (TOREZAN et al., 2009).

Para uma melhor visualização das reações que podem ocorrer com a ativação de um FS, temos o diagrama de Jablonski (**Figura 2**), uma representação esquemática das transições de energia que podem ocorrer com essa ativação,

Figura 2. Processos que ocorrem para fotossensibilizadores ao serem ativados por luz ilustrado por um diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de (SANTOS, 2016).

As etapas principais consistem na excitação do FS pela absorção de luz, partindo de seu estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). O decaimento para o estado fundamental (S_0) pode ser realizado com emissão de fluorescência ou pela conversão para um estado excitado triplete (T_1), pelo cruzamento intersistemas (ISC, do inglês *intersystem crossing*). A partir do estado excitado triplete (T_1), o FS reage com o oxigênio molecular para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis pela ação fototóxica do FS nas células (SANTOS, 2016).

As EROs podem ser geradas por dois mecanismos principais após a excitação do FS pela luz:

- Mecanismos tipo I: O FS em seu estado triplete reage diretamente com biomoléculas e outros componentes do sistema, como oxigênio, para gerar radicais livres: Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).
- Mecanismo tipo II: O FS transfere energia para o oxigênio molecular (3O_2), convertendo-o em oxigênio singlete (1O_2), sendo a principal espécie na atividade fototóxica da TFD.

Essas espécies são quimicamente muito reativas podem levar a uma gama de efeitos oxidativos em biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA, promovendo danos celulares o suficiente para que ocorra a destruição da célula e de tecidos. Em relação à qual mecanismo será favorecido ou não na TFD, isso depende da capacidade do FS de gerar EROs e baixa emissão de fluorescência, bem como da concentração de oxigênio presente e da distância entre o fármaco e o alvo (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019)

1.5 Fotossensibilizadores

Dentre os fatores importantes para que a TFD ocorra, como a fonte de luz e o oxigênio, é fundamental que o FS empregado seja capaz de absorver luz em um comprimento de onda específico para que gere um estado excitado triplete levando a formação de EROs de forma efetiva. Sendo um tratamento emergente, vários estudos foram e são realizados para potencializar a ação e aumentar a seletividade de moléculas fotoativas (SANTOS, 2018).

As classes de FS mais estudadas são as fenotiazinas, fulerenos, ftalocianinas e porfirinas, além de produtos naturais como a curcumina e a hipericina. Existem fotossensibilizadores, listados na **Tabela 1**, que possuem testes clínicos reconhecidos mundialmente para o tratamento de câncer por TFD.

Tabela 1. Fotossensibilizadores reconhecidos mundialmente para tratamento de câncer, com testes clínicos aprovados e/ou comercialmente disponíveis.

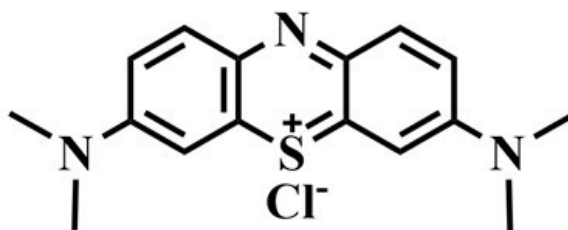
Nome comercial do composto	Tipo	Aplicações em câncer
<i>Photofrin®</i>	Porfirina	Pulmão, esôfago, ducto biliar, bexiga, cérebro e ovário
Levulan (ALA) – <i>Levulan®</i>	Porfirina	Pele, bexiga, cérebro e esôfago
Foscan (mTHPC) - <i>Foscan®</i>	Clorina	Cabeça e pescoço, pulmão, cérebro, pele e ducto biliar
Verteporfin - <i>Visudyne®</i>	Clorina	Oftálmico, pâncreas e pele
Photochlor (Feoformida) - <i>Photochlor®</i>	Clorina	Cabeça e pescoço, esôfago e pulmão
Laserphyrin - <i>Laserphyrin®</i>	Clorina	Fígado, cabeça e pescoço
Tookad - <i>Tookad®</i> <i>Soluble</i>	Clorina	Próstata

Fonte: Adaptado de (SANTOS, 2016).

1.6 Azul de metileno

Dentre os tipos de FS estudados para aplicação na TFD, destaca-se os corantes da família das fenotiazinas, como o azul de metileno (AM). O composto foi sintetizado pela primeira vez em 1876 por Heinrich Caro, possui uma estrutura aromática (**Figura 3**), caráter pouco tóxico, boa estabilidade em água e solventes orgânicos e baixo custo. Apresenta histórico de segurança em aplicações médicas diversas, como no tratamento de infecção urinária e malária (OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 3. Estrutura química do Azul de Metileno (AM).



Fonte: A autora (2025).

Em relação a TFD, suas vantagens consistem na sua baixa toxicidade na ausência de luz e boa geração de oxigênio singlete ao ser ativado por irradiação em seu comprimento de onda de máxima de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), em torno de 640 nm (PELOI, 2007). Estudos *in vitro* realizados por Dos Santos *et al.* (2017) apontaram que o AM aplicado na TFD induziu a morte celular

massiva de forma seletiva de linhagens de câncer de mama, sendo uma linhagem de câncer de mama triplo negativo a (MDA-MB-231) e outra de adenocarcinoma de mama metastático (MCF-7). A taxa de morte celular para as células de MDA-MB-231 foi de 97,3%, 78% para MCF-7 e apenas 18% para células epiteliais mamárias normais (MCF-10A), empregando 2 μM de AM e uma dose de luz de 4,5 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (DOS SANTOS et al., 2017)

Estratégias para modificações estruturais do azul de metileno são avaliadas e estudadas para otimizar o desempenho do composto como FS na terapia fotodinâmica. Como a substituição dos grupos dimetilamino por grupos mais volumosos ou polares capazes de aumentarem o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}), pela diminuição das vias não radiativas de liberação de energia, bem como a intensificação do acoplamento spin-órbita (FELGENTRAGER et al., 2013)

Em estudos recentes, derivados de AM que possuam cadeias alquílicas apresentam uma maior lipoficidade, fazendo que possam atravessar membranas celulares mais facilmente e consequentemente, melhoram o acúmulo tumoral e aumentam sua eficiência fotodinâmica (GOLLMER et al., 2015). O AM e seus derivados possuem a tendência de formar agregados em soluções aquosas ou muito concentradas. Isso ocorre devido a presença da estrutura aromática plana, caráter catiônico, e a natureza anfifílica (presença de grupos hidrofílicos e lipofílicos) desses tipos de compostos, essas características favorecem interações π - π e hidrofóbicas, levando a formação de agregados.

Essa agregação modifica as propriedades espectroscópicas e pode reduzir a eficiência fotodinâmica do composto, uma vez que, a capacidade de absorção de luz é reduzida em uma solução com agregados. Sabendo que esta propriedade diminui a atividade fotodinâmica destes compostos, modificações na estrutura do AM que aumentem o impedimento estérico ou facilitem a conjugação covalente a nanopartículas e polímeros, são capazes de contribuir com diminuição da formação de agregados, assegurando um elevado valor de Φ_{Δ} e garantindo boa atividade fotodinâmica (TALDAEY et al., 2023; WAINWRIGHT, 2005).

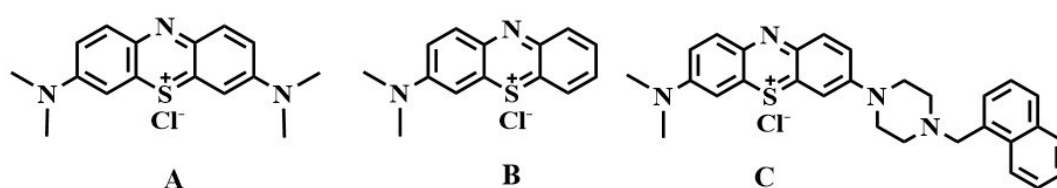
Trabalhos indicam que a presença de substituintes catiônicos no azul de metileno são capazes de potencializar a interação do FS com membranas carregadas negativamente de células cancerígenas, aumentando o efeito terapêutico do composto (TALDAEY et al., 2023; WAINWRIGHT, 2005). Logo, para além de modificações na estrutura química do azul de metileno, abordagens híbridas de formulações (complexos metálicos, nanopartículas etc.) também são capazes de maximizar a eficiência do composto na TFD, garantido aumento do Φ_{Δ} ,

maior seletividade por células cancerígenas e redução da capacidade de agregação. (KOHLE et al., 2020; SANTOS et al., 2019).

2 OBJETIVO

Avaliar as propriedades fotofísicas de novos derivados do azul de metileno (AM-NMP e AM-I – **Figura 4**), bem como avaliar a fototoxicidade dos compostos em linhagem de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

Figura 4. Estrutura química dos compostos (A) azul de metileno (AM), (B) azul de metileno intermediário (AM-I) cloreto de 3-(dimetilamino)fenotiazina-5-io e o derivado com um grupo dimetilamino do AM substituído por um grupo naftil-metil-piperazina (AM-NMP).



Fonte: A autora (2025).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização espectroscópica de absorvância e emissão de fluorescência do AM-NMP e AM-I,
- Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do AM-NMP e AM-I,
- Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e oxigênio singleto (Φ_Δ) do AM-NMP e AM-I,
- Avaliação da fotoestabilidade do AM-NMP e AM-I,
- Avaliação da fototoxicidade dos novos compostos em células do câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

3 METODOLOGIA

A síntese dos novos derivados do Azul de Metileno, denominados AM-NMP e AM-I (**Figura 4**) foi realizada no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LaSFar) pela Doutoranda Ieda Vieira da Cunha sob orientação do Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

3.1 Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes

Para avaliar a solubilidade dos compostos AM-NMP e AM-I utilizou-se um espectrofotômetro UV-Visível (Marca: Shimadzu, Modelo: UV-2501 PC), disponível no Laboratório Interdisciplinar de Fototerapia e Biomoléculas (LIFeBio) do Instituto de Química da UFU, Campus Santa Mônica. Inicialmente preparou-se uma solução estoque concentrada dos compostos em 2 mL de metanol. Em seguida, um volume de estoque foi otimizado na cubeta para uma leitura de Abs \approx 1 por meio da diluição em metanol. Para a leitura deste ensaio foi utilizado uma cubeta de vidro com caminho óptico igual a 1 cm.

Definido o volume de solução estoque necessário, o mesmo foi transferido para vials limpos, sendo seis para cada composto. O solvente metanol foi evaporado utilizando a bomba de vácuo do LaSFar e deixados em dessecador até estarem completamente secos. Adicionou-se então 2 mL dos solventes água, PBS, DMSO, etanol, metanol e clorofórmio. Para a completa solubilização foi utilizado um banho de ultrassom (Marca: 7Lab, Modelo: SSBu 3,8L), em seguida os espectros de UV-Vis de cada solução foram lidos.

3.2 Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ)

Após definir o solvente que melhor solubiliza os compostos em estudo, para o ensaio de determinação do coeficiente de absorvidade molar, inicialmente pesou-se cerca de 1 mg de cada composto utilizando a balança analítica com 5 casas após a vírgula (Marca: Pírix, Modelo: Toledo Mod. AS82/220 R2), localizada no RELAM – Campus Santa Mônica da UFU. Em seguida, a massa pesada foi solubilizada no solvente escolhido e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, completado o volume, a concentração da solução resultante foi calculada em mol/L. A partir deste estoque, foram preparadas cinco diluições que abrangessem Abs = 0,1 até Abs = 1 para um volume total de 2 mL em uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm. Calculou-se as concentrações para cada diluição em mol/L e seus espectros de absorção no UV-Vis foram lidos. A partir dos espectros registrados encontrou-se a absorbância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) para cada concentração.

Para definir o coeficiente de absortividade molar (ϵ), um gráfico das $\lambda_{\text{máx}}$ em função das concentrações em mol/L calculada para cada diluição foi plotado, obtendo uma reta de função $y = ax + b$ (MOREIRA; SANTOS; COSTA JUNIOR, 2016). O experimento foi realizado em triplicata.

3.3 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

Os espectros de fluorescência (emissão na faixa de 600–800 nm, excitação a 580 nm) foram obtidos em um espectrofotômetro de fluorescência (Marca: Varian, Modelo: Cary Eclipse), localizado na Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM) da UFU, Campus Santa Mônica com a colaboração da doutoranda Ieda Vieira da Cunha. Os rendimentos quânticos de fluorescência para os compostos foram determinados a partir do método relativo de Fery-Forgues e Lavabre (1999), que consiste em relacionar o Φ_f de um composto padrão descrito na literatura azul de metileno ($\Phi_f = 0,04$ em etanol) (Bacellar et al., 2014) com as amostras presente trabalho a serem analisadas por meio da seguinte equação (FERY-FORGUES; LAVABRE, 1999)

$$\Phi_f^a = \Phi_f^{AM} \cdot \frac{F_a}{F_{AM}} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo,

Φ_f^a : Rendimento quântico de fluorescência da amostra.

Φ_f^{AM} : Rendimento quântico de fluorescência do padrão (azul de metileno).

F_a e F_{AM} : Integral da área de emissão de fluorescência da amostra e do padrão respectivamente.

Para evitar o efeito do filtro interno, o valor de absorbância dos compostos foi mantido em 0,1 no comprimento de onda de absorbância máxima (655 nm), com fendas de excitação e emissão em 10 e 20 nm respectivamente para um experimento e 20 excitação e 10 emissão para outro, em duplicata para cada condição. O ensaio foi realizado utilizando uma cubeta de quartzo para fluorescência ($l = 1,0$ cm).

3.4 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ)

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) foi determinado a partir do método indireto via UV-vis, aplicando 1,3- difenilisobenzofurano (DPBF) como sonda. O método

consiste em acompanhar a cinética de degradação da sonda (DPBF) pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) produzido a partir da irradiação dos compostos em estudo, comparando com a cinética de degradação da mesma sonda por um padrão conhecido (neste caso, azul de metileno). O corante azul de metileno ($\Phi_\Delta = 0,52$ em etanol) foi utilizado como padrão (BACELLAR et al., 2014) e a partir da equação 2 abaixo os valores de Φ_Δ foram determinados (RAMOS et al., 2015).

$$\Phi_\Delta^a = \Phi_\Delta^{AM} \cdot \frac{k_a}{k_{AM}} \cdot \frac{I_{AM}}{I_a} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo,

Φ_Δ^a : Rendimento quântico de oxigênio singlete da amostra

Φ_Δ^{AM} : Rendimento quântico de oxigênio singlete do padrão (azul de metileno)

k_a e k_{AM} : *Constantes de velocidade de degradação do DPBF ($\lambda_{\text{máx}} = 411$ nm) na presença da amostra e do padrão (azul de metileno), respectivamente.

I_a e I_{AM} : Intensidades de absorvância da amostra e do padrão (azul de metileno) no comprimento de onda que o LED emite ($\lambda_{\text{emissão}} = 633$ nm).

*Coeficientes angulares das curvas cinéticas $\ln(I/I_0)$ *versus* tempo de irradiação das amostras e do padrão. Sendo I e I_0 as absorvâncias do DPBF ($\lambda_{\text{máx}} = 411$ nm) ao longo do tempo e zero.

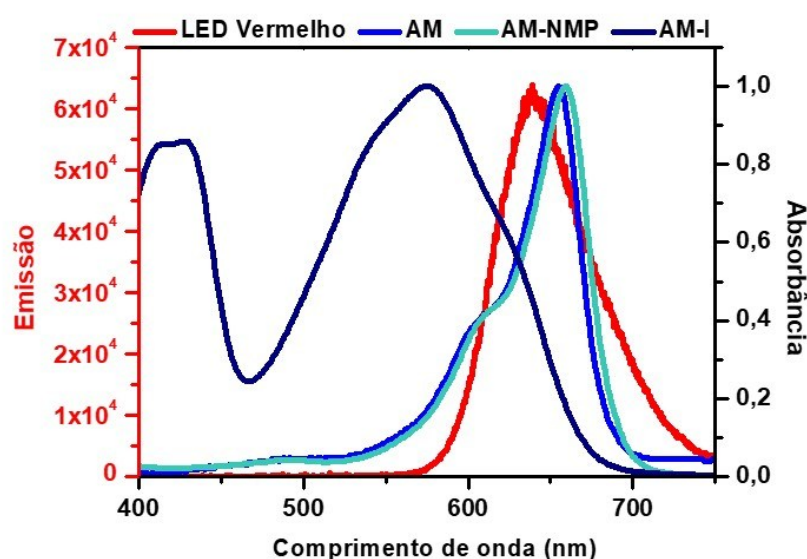
O experimento foi realizado utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, sendo a leitura do branco realizada no início com o solvente etanol. A solução de DPBF ($\lambda_{\text{máx}} = 411$ nm) foi preparada dissolvendo o composto em etanol e sua absorvância foi corrigida para 0,8 utilizando seu valor de $\varepsilon = 24320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZHANG; LI, 2011) para um volume de 3000 μL . A partir de soluções estoque dos FSs, a absorvância no comprimento de onda com banda mais intensa foi corrigida para aproximadamente 0,2 no comprimento de onda máximo de cada composto num volume final de 3000 μL de solução. Com os volumes definidos, na cubeta de quartzo foram adicionados o composto em estudo e a sonda DPBF (absorvâncias em aproximadamente 0,2 e 0,8 no pico da banda mais intensa, respectivamente), a mistura foi homogeneizada e mantida no escuro, seu espectro de absorvância na região do UV-Vis foi registrado marcando o início do experimento, isto é, o tempo zero (antes da irradiação).

Em seguida, com o auxílio de uma chapa agitadora e uma barra magnética em um sistema com garras, a cubeta com a mistura foi posicionada e mantida sob agitação constante. A mistura foi irradiada à 40 cm de distância por um LED vermelho ($\lambda_{\text{emissão}} = 633$ nm, potência $0,943 \text{ mW/cm}^2$) em intervalos de tempo definidos (2 em 2 minutos), sendo os espectros

registrados por no mínimo 25 minutos de irradiação observando o decaimento da banda máxima de absorção do DPBF. O mesmo procedimento foi realizado para o padrão, AM.

A escolha do LED para irradiação dos compostos, foi determinada analisando a sobreposição dos espectros de emissão do LED e a absorbância dos compostos em estudo (**Figura 5**), é possível observar que se tem fótons absorvidos na região em torno de 600 e 750 nm por todos os compostos.

Figura 5. Espectro de sobreposição da emissão do LED vermelho utilizado no trabalho e a região de absorbância das moléculas estudadas.



Fonte: A autora (2025).

3.5 Estudo de fotoestabilidade dos compostos por UV-Vis

A fotoestabilidade ou fotodegradação dos compostos foram estudadas em triplicata por meio de soluções em etanol com absorbância corrigida para 1 no comprimento de onda máximo de cada composto. As soluções foram transferidas para uma microplaca e irradiadas com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, potência $6,98 \text{ mW/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra), em intervalos de 2 e 4 minutos durante 22 minutos. A absorbância na região do UV-Vis dos compostos foi monitorada por uma leitora de microplacas (Marca: Biotek-Agilent, Modelo: EPOCH-SN). Por fim, os dados obtidos foram utilizados para plotar um gráfico da absorbância em função do tempo de irradiação.

3.6 Ensaios biológicos

3.6.1 Linhagem celular e preparo

Para os ensaios biológicos, células de câncer de mama humano triplo-negativo (MDA-MB-231) foram utilizadas. O cultivo das células foi realizado pela Doutoranda Patrícia Alves de Matos do LIFeBio. A etapa de manipulação das células foi apoiada pela Doutoranda Maynne Duarte Suriani Franco.

Inicialmente, para o subcultivo das células, 100 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) foi preparado e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo antibióticos. Em seguida, o meio do frasco de cultivo foi descartado e ele foi lavado com tampão fosfato alcalino (PBS, do inglês *Phosphate Saline Buffer*). Para suspender as células aderidas nas paredes, adicionou-se tripsina (tripsina-EDTA em 90 mL de PBS) que foi desativada após a suspensão adicionando meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. As células suspensas no meio foram transferidas para um tubo Falcon e centrifugadas, o meio contendo tripsina foi descartado e adicionado o meio de cultura preparado previamente.

A contagem das células foi realizada em uma câmara de Neubauer. Inicialmente, para o plaqueamento, cerca de 25000 células/poço foram transferidas para duas placas de 96 poços (100 µL em cada poço) e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ para adesão celular nas placas. Os FSs foram solubilizados em DMSO e diluídos em DMEM nas concentrações desejadas garantindo < 1% de DMSO nas soluções finais.

Após a adesão das células ao fundo dos poços, o meio de cultura foi descartado e os poços lavados com PBS, por fim, foram adicionadas as soluções com diferentes concentrações dos FSs diluídos em DMEM (< 1% de DMSO), a distribuição na placa está representada na

Figura 6 abaixo:

Figura 6. Esquema representativo de microplaca com 96 poços, sendo a linha A o controle (CT) apenas células sem composto, as colunas 1, 2, 3 e 4 incubadas com AM, as colunas 5, 6, 7 e 8 com AM-NMP e 9, 10, 11 e 12 com AM-I em diferentes concentrações.

	AM				AM-NMP				AM-I			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
B	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M
C	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
D	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M
E	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M	2,5 μ M
F	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M
G	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M	7,5 μ M
H	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M	10 μ M

Fonte: A autora (2025)

As concentrações foram dispostas da seguinte forma para cada composto:

Linha B - 0,1 μ M

Linha C - 0,5 μ M

Linha D - 1,0 μ M

Linha E - 2,5 μ M

Linha F - 5,0 μ M

Linha G - 7,5 μ M

Linha H - 10,0 μ M

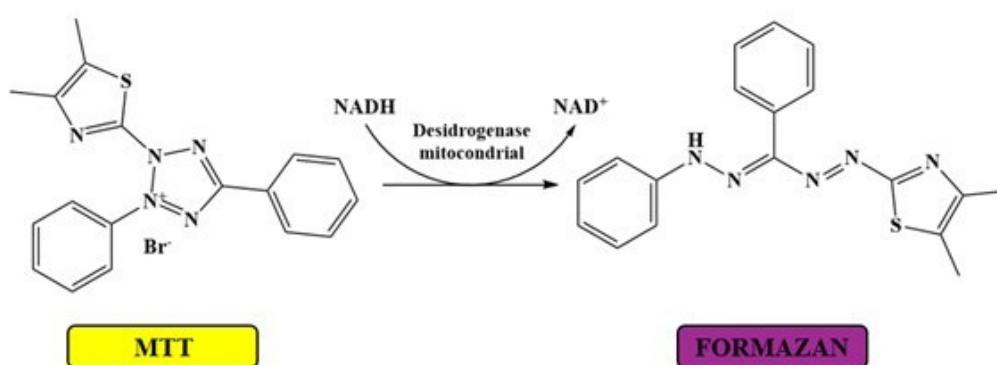
3.7 Viabilidade celular pelo método MTT

Para o ensaio com MTT, as células foram incubadas com os compostos por 24 horas em estufa (37°C, 5% de CO₂). Após o tempo de incubação, o composto diluído no meio de cultura foi retirado e realizada a lavagem com PBS. Adicionou-se novamente PBS em uma das placas

para a irradiação com o LED vermelho (sobreposição da Figura 5) por 12 minutos, com a placa dentro de uma caixa preta à 7 cm de distância do LED onde temos $6,98 \text{ mW/cm}^2$ de potência e uma dose de luz de 5 J/cm^2 . Já para a outra placa, adicionou-se meio de cultura e foi mantida no escuro.

Após o tempo de irradiação, retirou-se o PBS e foi adicionado novamente $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura e a placa foi deixada para incubar em estufa (37°C , 5% de CO_2) por 24 horas pós irradiação. Dado o tempo pós irradiação, foram adicionados $13 \mu\text{L}$ de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] (MTT) 3 mg/mL em cada poço, resultando numa concentração final de $0,35 \text{ mg/mL}$ MTT no poço, e as placas foram novamente incubadas com MTT por 3 horas na estufa (37°C , 5% de CO_2). Durante esse período, cristais de formazan são formados pela redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais geradas pelo metabolismo de células (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018) a reação é apresentada na **Figura 7** abaixo.

Figura 7. Reação de redução do MTT (sal amarelo solúvel em água) a formazan (sal de cor roxa insolúvel em água e solúvel em DMSO).



Fonte: A autora, adaptado de (MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018).

Dado o tempo de incubação com MTT, o meio de cultura foi removido cuidadosamente de cada poço e os cristais de formazan foram solubilizados em $100 \mu\text{L}$ de DMSO. Realizou-se a leitura de absorbância em 570 nm dos poços na leitora de microplacas (Marca: Biotek-Agilent, Modelo: EPOCH-SN), localizada no LIFeBio. Em seguida os cálculos de viabilidade celular foram realizados pela equação 4 e o valor de IC_{50} para os compostos foram determinados pela construção e análise da curva dose-resposta utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{Strat}} (570 \text{ nm})}{\text{Abs}_{\text{CT}} (570 \text{ nm})} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo,

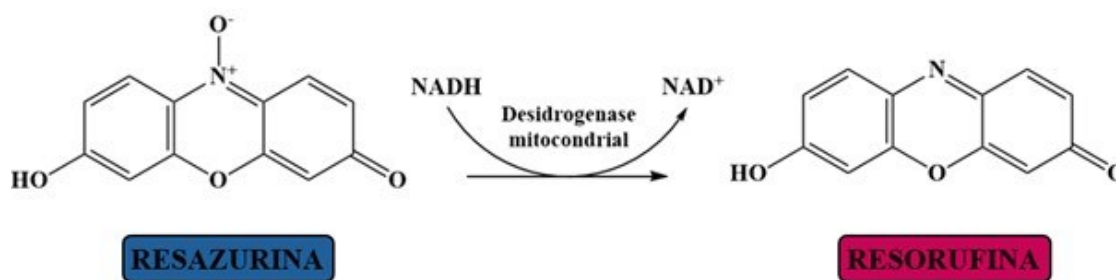
Ab_{Strat} : Absorbância para as células tratadas em 570 nm

Ab_{SCT} : Absorbância para as células controle em 570 nm

3.8 Viabilidade celular pelo método resazurina

A resazurina é um composto redox que em solução de tampões fisiológicos apresenta cor azul intensa e na presença do metabolismo de células viáveis é reduzido a resorufina, um produto de coloração rosa conforme apresentado na reação da **Figura 8** abaixo.

Figura 8. Reação de redução da resazurina (cor azul em solução) a resorufina (coloração rosa em solução com PBS).



Fonte: A autora, adaptado de (SANTOS et al., 2020).

A principal vantagem do método com resazurina é o fato do composto não ser tóxico e permeável na membrana celular, sem a necessidade que ocorra lise e morte celular para a detecção, diferente do protocolo com MTT. Sendo assim, as células podem ser empregadas em outros protocolos de análise em estudos complementares (RISS et al., 2016)

Para o ensaio, o preparo da placa foi realizado de forma similar ao protocolo com MTT. Após a incubação com os compostos por 24 horas e lavagem com PBS, adicionou-se 250 μ L de solução de resazurina 0,03 mg/mL. As placas então foram incubadas por no mínimo 1 hora, não excedendo o limite de 4 horas de incubação em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (RISS et al., 2016). Dado o tempo de incubação com resazurina, as placas foram retiradas da estufa e seus espectros de absorbância em 570 e 600 nm foram obtidos pela leitora de microplacas localizada no LIFeBio.

Em seguida os cálculos de viabilidade celular foram realizados pela equação 5 (RISS et al., 2016) e o valor de IC₅₀ para os compostos foram determinados de forma similar ao ensaio com MTT.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{strat}(570\ nm) - Abs_{strat}(600\ nm)}{Abs_{CT}(570\ nm) - Abs_{CT}(600\ nm)} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que,

Abs_{Strat} : Absorbância lida para as células tratadas em 570 e 600 nm.

Abs_{CT} : Absorbância lida para as células controle em 570 e 600 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

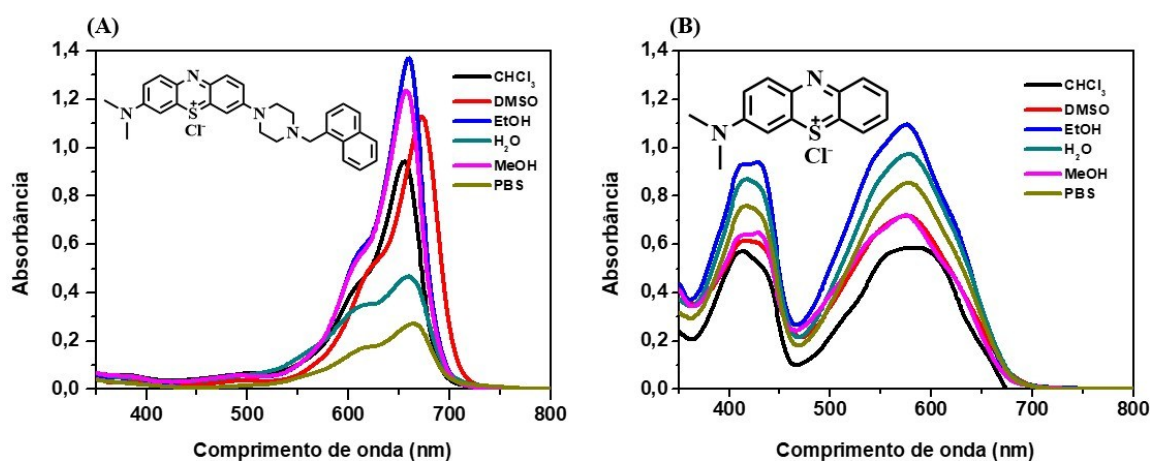
4.1 Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes

A solubilidade é uma propriedade físico-química importante para entender o comportamento de um determinado soluto em diferentes solventes. Para os derivados do AM é importante analisar como os compostos se comportam em diferentes solventes. O AM possui a tendência de formar agregados, devido a presença de anéis aromáticos que podem gerar um empilhamento π - π (forma de sanduíche), sua propriedade catiônica também pode gerar interações eletrostáticas, além disso, o corante em solução pode gerar interações hidrofóbicas (FREDERICE et al., 2011),

Os agregados gerados são do tipo *J* e *H*, o primeiro são agregados de moléculas alinhados linearmente, já para o segundo, as moléculas se organizam na forma de “sanduíche”. Esses agregados podem gerar dímeros e até grandes aglomerados, e sua formação depende de fatores como, temperatura, concentração e o tipo de solvente, seja polar ou apolar (FREDERICE et al., 2011).

Sendo assim, a análise da solubilidade dos derivados do AM em diferentes solventes é fundamental para garantir sua aplicação na TFD, uma vez que, a formação de agregados pode afetar a fotossensibilização dos compostos, interferindo na formação de EROs, são capazes também de deslocar as bandas de absorção no UV-vis o que pode comprometer a correspondência com a luz empregada na irradiação (DUTRA, 2013).

Figura 9. Espectros de absorção no UV-vis dos compostos AM-NMP (A) e AM-I (B) nos solventes clorofórmio (CHCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol (EtOH), água (H_2O), metanol (MeOH) e tampão fosfato salino (PBS).



Fonte: A autora (2025).

A partir dos espectros apresentados na **Figura 9** é possível perceber que ambos os compostos apresentaram boa solubilidade em etanol. Para o composto AM-NMP em DMSO, observa-se um leve deslocamento batocrômico, caracterizado por um deslocamento da banda de maior intensidade para um comprimento de onda maior. O que pode ser explicado por uma maior interação ou estabilização do solvente com o estado excitado da molécula (π^*) e menor com o estado fundamental (π), fazendo com que a transição eletrônica ($\pi \rightarrow \pi^*$) neste caso necessite de menor energia para acontecer (RAMOS, 2015). Assim a banda se desloca para um comprimento de onda maior (de menor energia).

A solubilidade baixa em água e PBS pode estar relacionada com a formação de agregados a partir de interações hidrofóbicas, além disso, a presença de mais dois anéis benzênicos no derivado confere um caráter menos polar para a molécula e favorecendo sua solubilidade em solventes orgânicos, como o etanol e metanol. Já para o derivado AM-I, observa-se uma inversão nos espectros, apresentando uma maior solubilidade em água e PBS devido, possivelmente, ao tamanho menor da molécula juntamente ao seu caráter catiônico, o que confere uma maior solvatação da molécula por esses solventes e uma menor solubilidade em DMSO.

Considerando que etanol foi o solvente no qual obteve-se maior absorção numa mesma quantidade de mol para ambos os compostos (Figura 9), este foi o solvente escolhido para os próximos estudos.

4.2 Coeficiente de absortividade molar (ϵ)

Neste ensaio foram analisados os valores de absortividade molar (ϵ) para os dois compostos em etanol, esta propriedade é responsável por quantificar a capacidade que uma determinada substância possui de absorver luz em comprimento de onda determinado. A partir do valor de ϵ encontrado é possível realizar análises quantitativas, como a determinação precisa da concentração dos compostos em solução (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Empregando a Lei de *Lambert-Beer* temos que a absorbância é linearmente proporcional à concentração da amostra:

$$Abs = \epsilon lc$$

Onde,

Abs = Absorbância da amostra (adimensional)

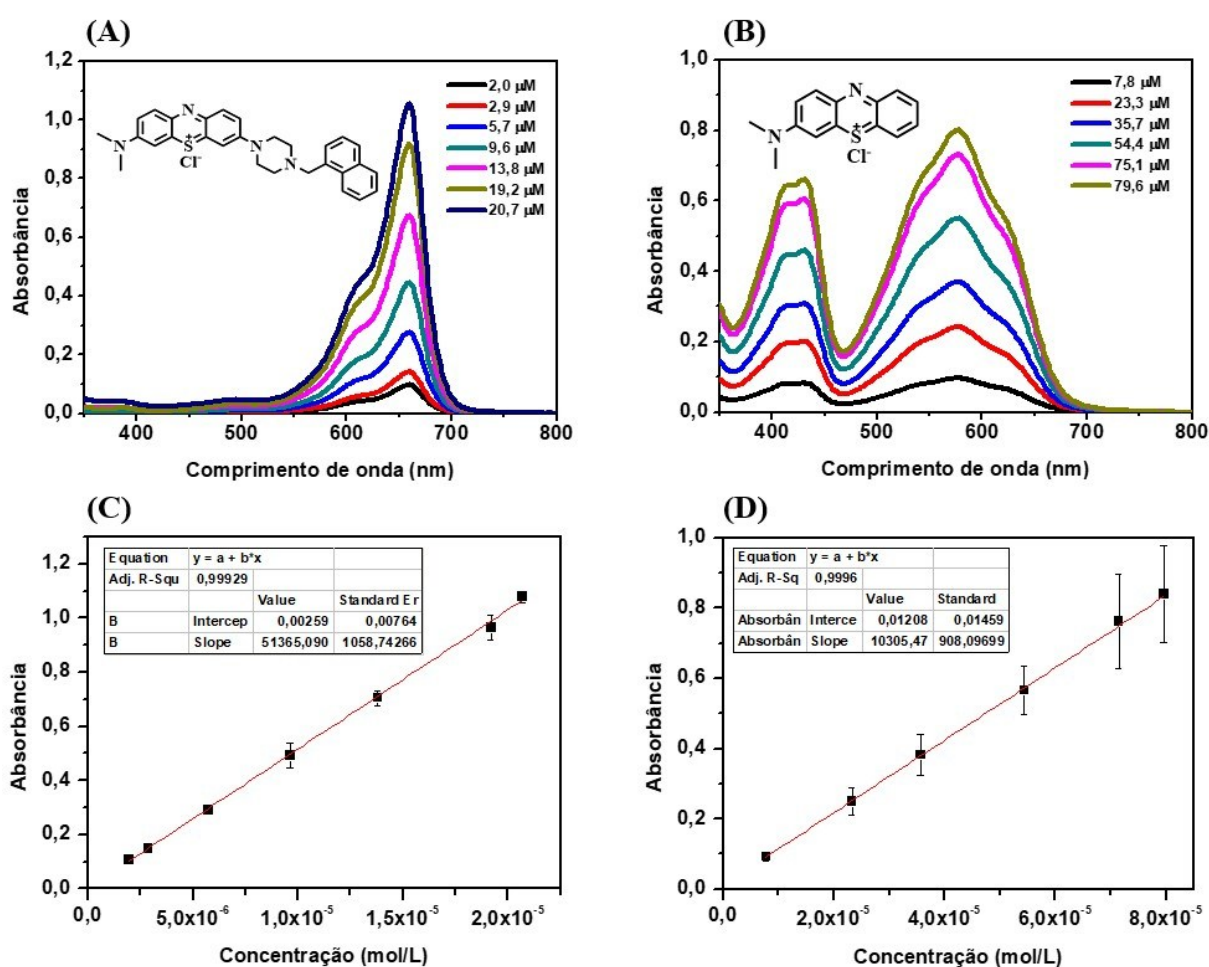
ϵ = Absortividade molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l = Caminho óptico da cubeta (cm)

c = Concentração da amostra (mol/L)

Sendo assim, como o caminho óptico da cubeta é de 1 cm para este experimento, o coeficiente angular da reta construída com os dados de $\lambda_{\text{máx}}$ em função das concentrações em mol/L corresponde ao coeficiente de absorvidade molar (ϵ) dos compostos. Analisando os espectros e os gráficos na **Figura 10**, e os dados dispostos na **Tabela 2**, temos:

Figura 10. Espectros de absorvância do (A) AM-NMP e (B) AM-I nas diferentes concentrações em etanol. Relação linear entre o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorvância (655 nm AM-NMP e 580 nm AM-I) e a concentração de (C) AM-NMP e (D) AM-I. Os ensaios foram realizados em triplicata, portanto cada ponto refere-se à barras de erro o desvio médio das replicatas.



Fonte: A autora (2025).

Tabela 2. Dados referentes ao comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorbância dos FS e seus respectivos valores de absortividade molar (ϵ).

FS	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
AM	650	96000 ^a
AM-NMP	655	51365 ^b
AM-I	580	10305 ^b

^aFonte: (BACELLAR et al., 2014) ^bFonte: A autora (2025).

A partir dos espectros de AM-NMP (Figura 10A) observa-se uma banda de absorção definida em aproximadamente 650 nm. A linearidade apresentada para a faixa de concentração de 2,0 à 20,7 μM é ótima ($R^2 = 0,99929$), ou seja, temos uma excelente relação entre absorbância e concentração (Figura 10C). Seu valor encontrado para ϵ é de aproximadamente $5,14 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Tabela 2).

Já para o derivado AM-I é possível identificar sua banda característica próxima de 580 nm, mas também uma banda em torno de 620-650 nm e outra em 540-550 nm, podendo indicar a formação de agregados. Visto que, o experimento foi realizado com uma concentração partindo de 7,8 a 79,6 μM , comparado ao derivado AM-NMP, concentrações mais elevadas que, como apresentado no tópico anterior, podem levar a diferentes tipos de agregados que resultam em um deslocamento da banda de absorção do composto.

Além disso, o valor de ϵ encontrado para AM-I foi de $1,03 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Tabela 2), um valor 5x inferior comparado ao ϵ AM-NMP e 9x inferior ao ϵ do AM. Como explicado, a formação de agregados leva a uma diminuição da capacidade de absorver luz, o que pode comprometer a sua geração de EROs, diminuindo a sua eficiência fotodinâmica.

Quando comparado o valor referência de absortividade molar do AM com o AM-NMP observamos um valor 2x menor para o novo derivado, mas sem a evidência de formação de agregados, o que nos sugere que suas modificações estruturais mantêm sua forma monomérica predominante.

Em relação às transições eletrônicas, o azul de metileno apresenta predominantemente transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, associadas ao seu sistema aromático conjugado da fenotiazina e aos heteroátomos de nitrogênio e enxofre respectivamente. Sua banda de

absorção mais intensa em torno de 660 nm é resultado da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, responsável pela cor azul característica do composto. Para os derivados em estudo, o AM-NMP (grupo dimetilamino substituído por naftil-metil-piperazina), sua maior extensão da conjugação e a presença de grupos doadores de elétrons promovem deslocamentos batocrômicos (para comprimentos de onda maiores) e aumento na intensidade de absorção, uma vez que essas condições favorecem o estado excitado π^* (RAMOS, 2015).

Já no derivado em que um dos grupos dimetilamino é substituído por um hidrogênio, temos a diminuição da densidade eletrônica e da conjugação, o que reduz a estabilização do estado excitado, levando a um deslocamento hipocrômico (para comprimentos de onda menores) e uma menor intensidade de absorção. Logo, essas mudanças estruturais e estudo dos espectros de absorção no UV-Vis dos compostos, evidencia o papel fundamental dos grupos amino nas propriedades eletrônicas e fotofísicas do azul de metileno (RAMOS, 2015).

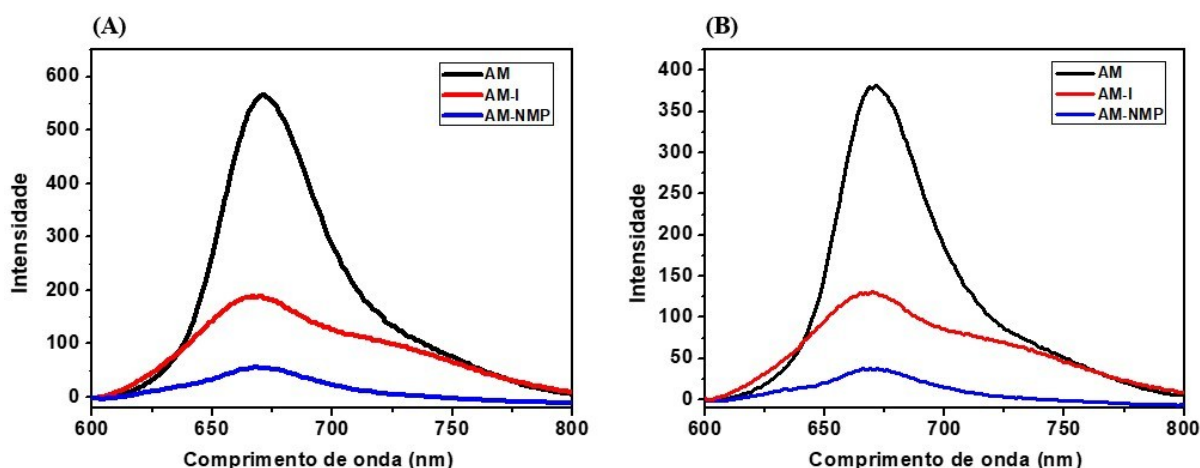
4.3 Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

A fluorescência é um fenômeno que consiste na absorção de radiação eletromagnética, geralmente na região ultravioleta em um determinado comprimento de onda por uma molécula e sua posterior emissão em um comprimento de onda maior. Ao absorver energia, elétrons passam para o estado excitado e, ao retornarem para o estado fundamental, fótons fluorescentes são emitidos e sua energia é menor que os fótons de excitação, isso ocorre, pois, parte da energia é perdida em processos de relaxamento vibracional e de conversão de energia, caracterizando o deslocamento de Stokes (PIMENTEL et al., 2014).

Para a TFD, este ensaio é importante pois a partir dele é possível determinar que, a energia que não é emitida como fluorescência, pode ser utilizada para a formação de EROs, conforme o diagrama de Jablonski. Entretanto, algumas moléculas podem apresentar baixo Φ_f devido a interações com solventes, oxigênio e até íons, além do pH do meio. Mudanças na estrutura química podem influenciar diretamente nos estados excitados, geometria molecular e relaxamento vibracional (SHAHINYAN; AMIRBEKYAN; MARKARIAN, 2019).

Como o presente estudo trata de derivados de AM com estrutura modificada, a determinação e análise do Φ_f é fundamental para um melhor entendimento de sua aplicação na TFD. Nos espectros apresentados na **Figura 11** podemos avaliar a intensidade de emissão dos compostos comparado ao padrão AM.

Figura 11. Espectros de emissão de fluorescência do AM, AM-NMP e AM-I em etanol. $\lambda_{exc} = 580$ nm, e fenda de excitação 10 nm e fenda de emissão 20 nm. Experimento realizado em duplicata, portanto este é apenas o espectro representativo de cada composto.



Fonte: A autora (2025)

Os cálculos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foram realizados utilizando a equação 1 apresentada no item 3.3 na seção de metodologia. O padrão utilizado foi AM em etanol ($\Phi_f = 0,04$) (BACELLAR et al., 2014) os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) calculados, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de fluorescência em 670 nm. Experimento realizado em duplicata, portanto os valores representam a média e desvio padrão (DP).

FS	$\Phi_f \pm DP$
AM	0,04 ^a
AM-NMP	0,0041 \pm 0,0002 ^b
AM-I	0,020 \pm 0,001 ^b

^aFonte: (BACELLAR et al., 2014).^bFonte: A autora (2025).

Para o derivado AM-NMP observa-se uma diminuição de 10x do rendimento quântico de fluorescência comparado ao padrão AM (**Tabela 3**), ou seja, ele é menos eficiente na emissão luminosa quando absorve energia. Logo, ao ser excitado, esse composto tende a dissipar mais sua energia por processos não radiativos do que emitir por fluorescência. Possivelmente sendo melhor na TFD para a geração de EROs ao ser irradiado. Sua estrutura

química modificada está diretamente ligada a isso, uma vez que apresenta uma cadeia lateral longa capaz de rotacionar em solução, favorecendo vibrações internas e conversão de energia em calor e não fluorescente (DUTRA, 2013).

Já para o derivado AM-I não observamos uma mudança muito expressiva, mas também se observa uma diminuição em seu Φ_f . O grupo dimetilamino ($-N(CH_3)_2$) atua como forte doador eletrônico na estrutura do AM, contribuindo com a conjugação eletrônica da estrutura e estabilizando seu estado excitado, o que favorece a emissão de fluorescência. Sendo assim, ao remover o grupo, temos uma redução da densidade eletrônica da conjugação, comprometendo assim a ressonância da estrutura e conseqüentemente, favorecendo a dissipação de energia por outros meios que não seja a fluorescência (DUTRA, 2013).

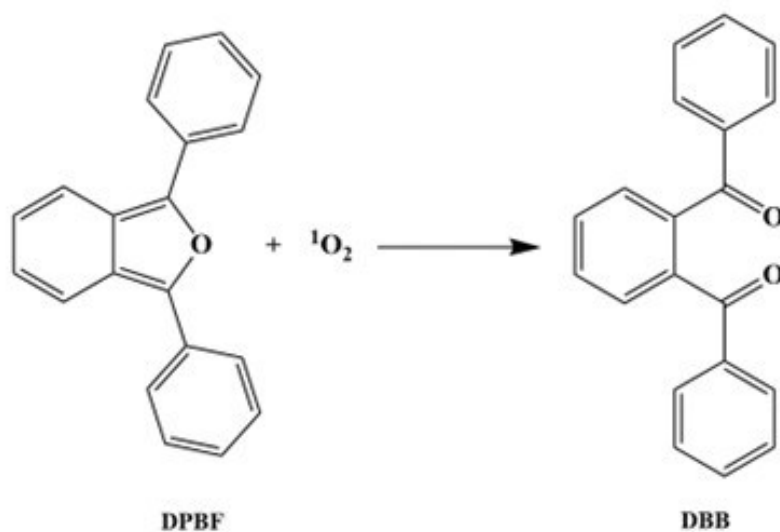
Logo, as modificações realizadas implicaram em uma fluorescência menos intensa dos compostos e um Φ_f inferior ao padrão AM. Destacando o impacto da modificação estrutural na capacidade de emissão de fluorescência da molécula.

4.4 Rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ)

Sendo a geração de 1O_2 uma etapa fundamental na aplicação da TFD, o rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) é um parâmetro importante na avaliação de um fotossensibilizador, uma vez que indica a eficiência com que a energia absorvida pela molécula leva a geração de oxigênio singleto (1O_2), fenômeno descrito no diagrama de Jablonski (**Figura 2**, pág. 4). O azul de metileno apresenta um valor de Φ_Δ considerado elevado, em torno de 0,5, o que significa que 50% dos fótons absorvidos pela molécula geram 1O_2 (SANTOS, 2018) Seus derivados para aplicação na TFD devem apresentarem Φ_Δ similares ou maiores, ampliando o potencial fotodinâmico do composto.

O método indireto para detecção de 1O_2 pela sonda DPBF, consiste em uma reação (**Figura 12**) irreversível entre os compostos que consiste na decomposição do DPBF pelo 1O_2 gerado pela irradiação do fotossensibilizador por uma fonte de luz. Como produto desta decomposição temos o 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB), e observa-se uma diminuição da absorbância do DPBF em 411 nm (ENTRADAS; WALDRON; VOLK, 2020).

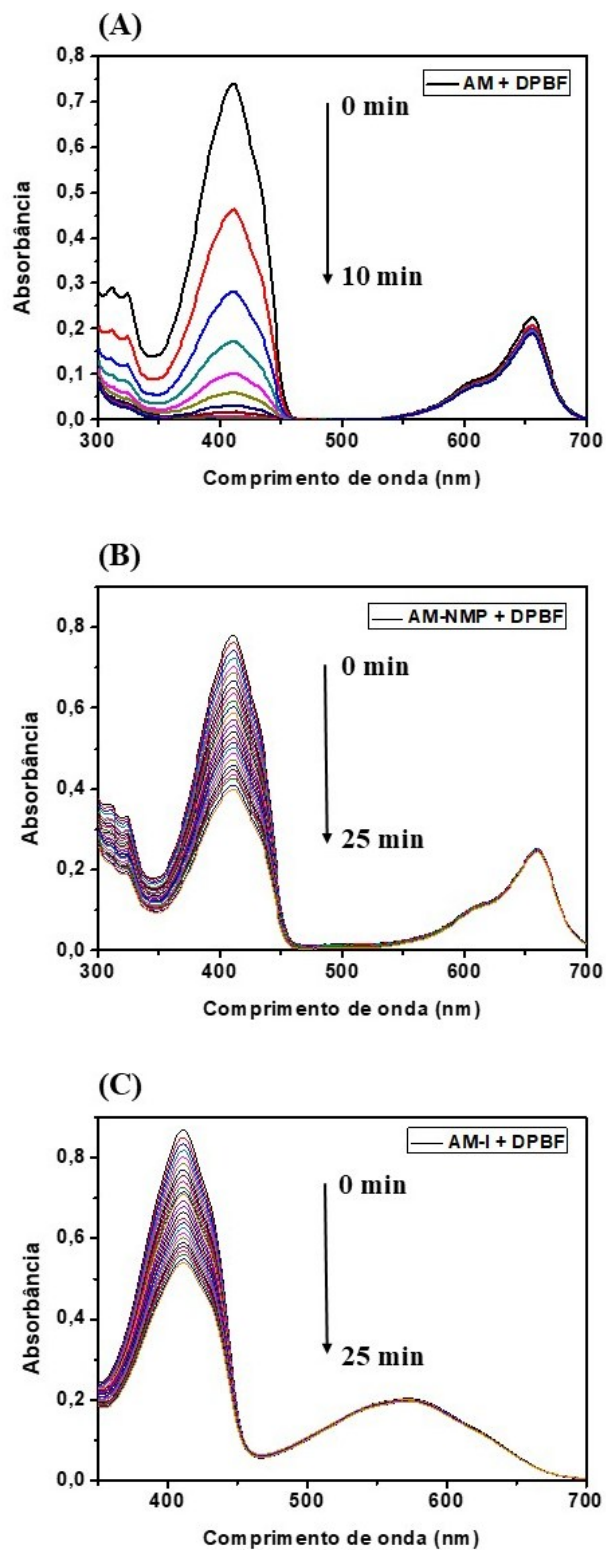
Figura 12. Reação de fotodegradação do DPBF pelo oxigênio singlete.



Fonte: A autora (2025)

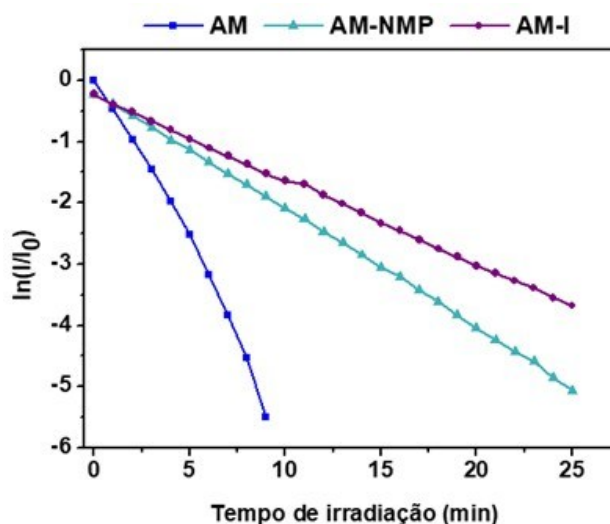
Os espectros de decaimento de absorvância do DBPF estão apresentados na **Figura 13**. O gráfico apresentado na Figura 14 foi construído para uma melhor visualização comparativa entre os três compostos e sua influência na fotodegradação do DPBF pelo $^1\text{O}_2$, gerado durante a irradiação do fotossensibilizador.

Figura 13. Espectros de absorvância do DPBF em função do tempo de irradiação na presença de (A) AM, (B) AM-NMP e (C) AM-I. Amostra irradiada com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$), potência $0,943 \text{ mW/cm}^2$ à $40,0 \text{ cm}$ de distância da amostra.



Fonte: A autora (2025)

Figura 14. Curvas cinéticas do consumo de DPBF (em 411 nm) em função do tempo de irradiação dos FSs com LED vermelho. ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$), potência $0,943 \text{ mW/cm}^2$ à $40,0 \text{ cm}$ de distância da amostra.



Fonte: A autora (2025).

Os valores de Φ_{Δ} foram calculados usando os dados da regressão linear da **Figura 14** e a equação 2 apresentada no item 3.4 na seção de metodologia. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4**. O AM foi utilizado como padrão, com valor de referência Φ_{Δ} de 0,52 em etanol (BACELLAR et al., 2014).

Tabela 4. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) dos FSs em etanol.

FS	Φ_{Δ}
AM	0,52 ^a
AM-NMP	0,0209 ^b
AM-I	0,0215 ^b

^aFonte:(BACELLAR et al., 2014). ^bFonte: A autora (2025).

Os resultados encontrados são inferiores ao composto de referência, indicando que as modificações na estrutura química do mesmo não favoreceram a formação de $^1\text{O}_2$ pela irradiação com LED vermelho. Sabe-se que a geração de $^1\text{O}_2$ corantes do tipo fenotiazinas dependem da sua eficiência na conversão intersistema (ISC). Essa conversão é caracterizada pela transição de um estado singlete excitado (S_1) para um estado triplete (T_1) capaz de transferir energia para o oxigênio molecular que se encontra em estado triplete para seu estado singlete de maior reatividade (SINGH; SEN GUPTA; BOSE, 2024).

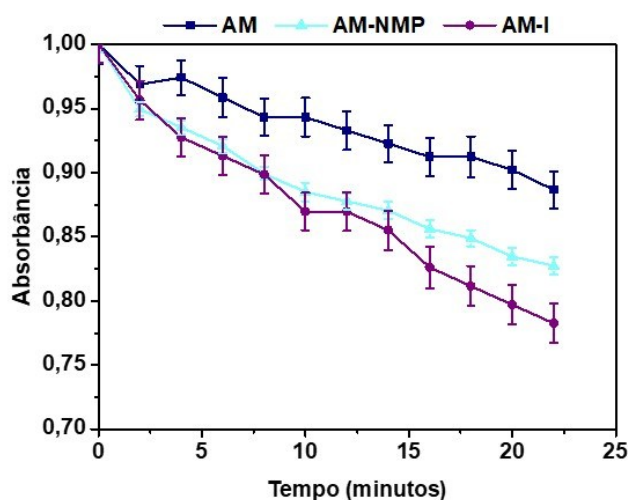
Mudanças estruturais são capazes de reduzir a ISC ou favorecer vias de perda não-radiativa, e podem facilitar a aglomeração, esses fatores tendem a diminuir o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$. Para o derivado AM-I, a substituição de um grupo $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$ por um hidrogênio é capaz de reduzir a densidade eletrônica do sistema conjugado da molécula de azul de metileno, o que afeta sua distribuição de carga e desloca seu comprimento de onda de absorção. Com isso, é provável uma diminuição na eficiência de absorção de fótons pela molécula, fato que foi observado para seu valor de absortividade molar bem menor que o AM. Essa menor absorção é capaz de reduzir a ISC, o que conseqüentemente diminui a transferência de energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) para a formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

4.5 Fotoestabilidade

O estudo da fotoestabilidade de FSs se faz importante pois, à medida que o composto é irradiado, ocorrer sua degradação e conseqüente redução na capacidade de absorção de fótons de luz. Essa redução afeta diretamente a ação do FS na geração de EROs. Sendo assim, uma elevada taxa de fotodegradação pode levar a uma diminuição da concentração do FSs antes mesmo que ele possa gerar danos significativos para que ocorra a morte celular. Logo, quanto mais fotoestável, melhor será seu desempenho na TFD (BAPTISTA et al., 2017)

Para o presente trabalho, uma análise qualitativa foi realizada para a avaliação da fotoestabilidade dos derivados de AM via absorção na região do UV-Vis. Para comparação entre os compostos AM, AM-NMP e AM-I, o gráfico dos valores de absorbância no comprimento de onda máximo em função do tempo de irradiação foi construído (**Figura 15**).

Figura 15. Representação gráfica comparativa dos espectros de absorção dos compostos sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{emissão}} = 633 \text{ nm}$), potência $6,98 \text{ mW/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata; cada ponto corresponde à média e as barras de erro representam o desvio padrão.



Fonte: A autora (2025).

A partir do gráfico comparativo da **Figura 15**, observa-se que, após 22 minutos de irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$), potência $6,98 \text{ mW/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra, não houve fotodegradação significativa dos compostos em estudo frente ao LED utilizado no intervalo de tempo avaliado. Considerando que, nos ensaios biológicos, a dose de luz utilizada (5 J/cm^2) corresponde a um tempo de irradiação de 12 minutos, a fotoestabilidade dos FSs observada até 22 minutos pode ser considerada satisfatória e demonstra-se adequada para a aplicação proposta.

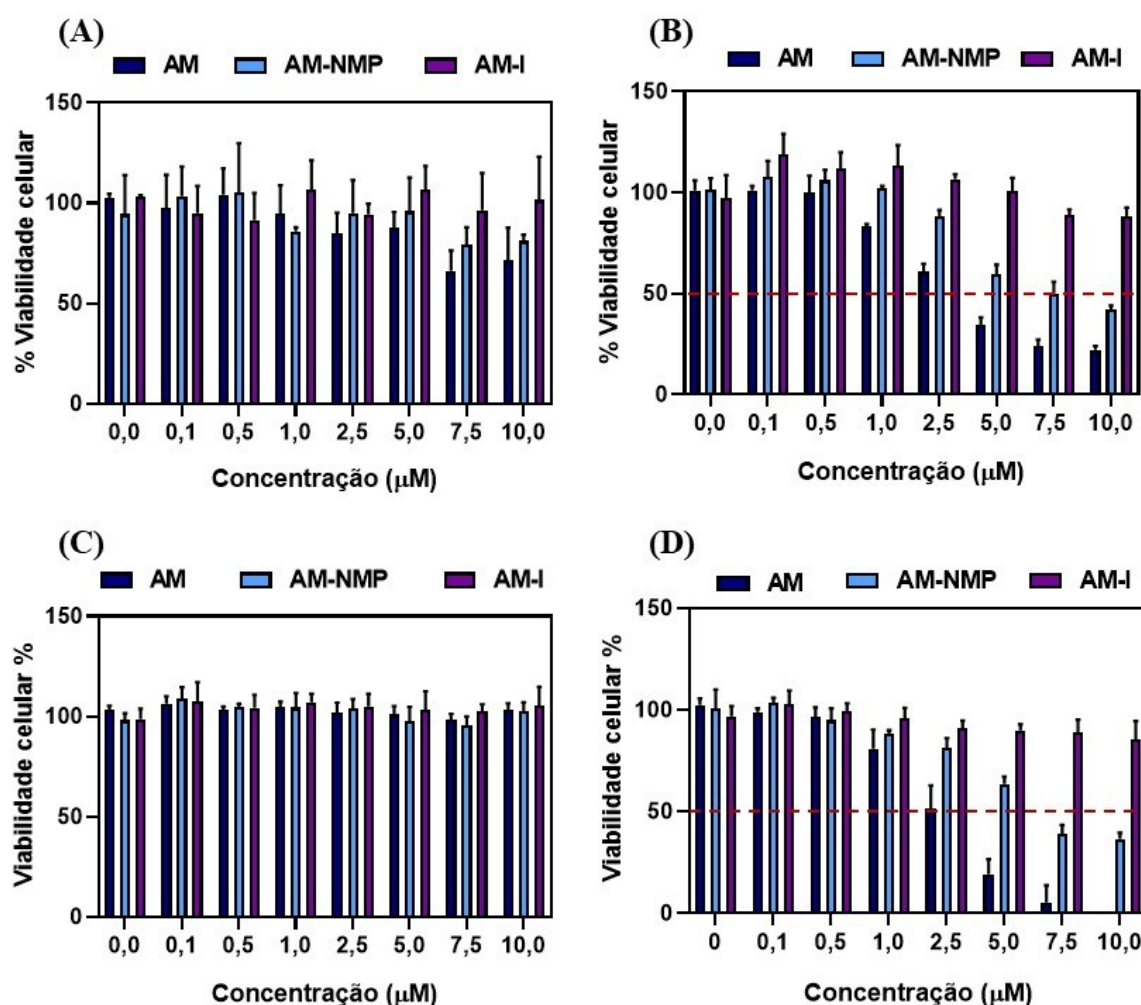
4.6 Ensaios de viabilidade celular

Os testes *in vitro* atualmente estão em ascensão e compreendem uma importante ferramenta para o desenvolvimento de pesquisas farmacológicas que visam o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos. Isto porque, testes *in vivo* em pesquisas com ensaios biológicos necessitam de um melhor mapeamento *in vitro* para que sejam realizados testes seguros e efetivos em animais (SILVA et al., 2023). A fim de investigar a citotoxicidade e fototoxicidade dos derivados do azul de metileno em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), duas metodologias foram empregadas, utilizando MTT e resazurina. Os ensaios foram realizados na ausência e presença de luz, com concentrações dos FSs variando de 0 a $10 \mu\text{M}$. Os resultados obtidos estão apresentados na

Figura 16.

Figura 16. Gráficos de % viabilidade celular em função da concentração (μM) do AM, AM-NMP e AM-I pelo método MTT (A) no escuro, (B) irradiado e pelo método com resazurina (C) no escuro e (D) irradiado após 2 horas de incubação do FS. As barras representam a média \pm desvio médio de quatro réplicas ($n = 4$) realizadas num mesmo dia.

Sistema de irradiação utilizado foi LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).resazurina (C) no escuro e (D) irradiado após 2 horas de incubação do FS. As barras representam o desvio médio.



Fonte: A autora (2025)

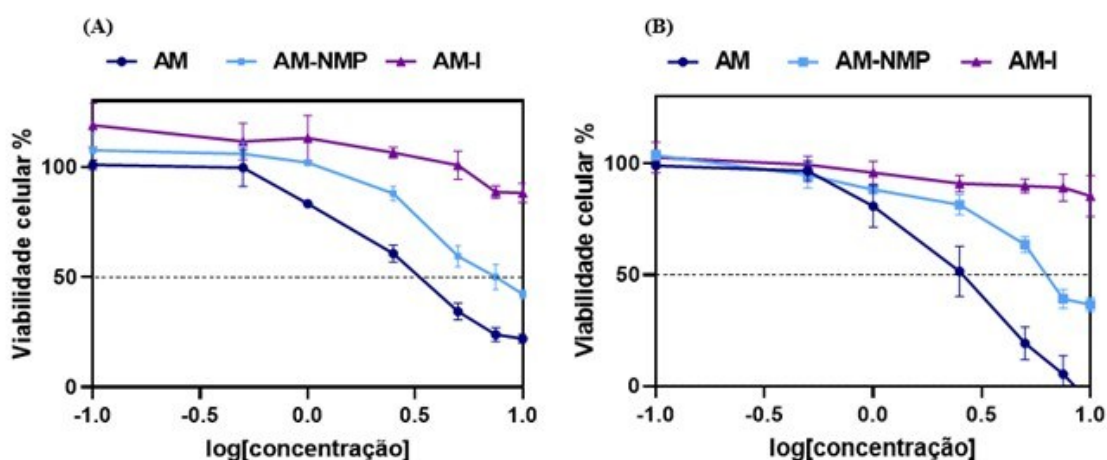
Conforme apresentado na

Figura 16, é possível observar que o azul de metileno e seus derivados não apresentaram toxicidade para as células mantidas no escuro, em nenhuma das concentrações estudadas (0,1 μM à 10 μM), evidenciado em ambos os métodos de viabilidade utilizados (MTT e

resazurina). Em contrapartida, para o ensaio com irradiação com LED Vermelho, o AM apresentou toxicidade a partir de 1,0 μM , para seu derivado AM-NMP observa-se uma maior citotoxicidade a partir de 2,5 μM . Já para o derivado AM-I não é observado fototoxicidade significativa do composto na faixa de concentração estudada.

Os valores de IC_{50} (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) dos FSs nas células irradiadas foram determinados pelos gráficos de % viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ dos compostos (**Figura 17**), os valores estão apresentados na **Tabela 5**. Valores de IC_{50} (μM) dos compostos AM, AM-NMP e AM-I em células MDA-MB-231 sob efeito da irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$), utilizando dois métodos de viabilidade celular: MTT e resazurina..

Figura 17. Gráficos de %viabilidade celular *versus* $\log[\text{concentração}]$ do FS para determinação do IC_{50} para os compostos AM, AM-NMP e AM-I. Resultados dos ensaios de viabilidade celular obtidos pelos métodos (A) MTT e (B) resazurina. LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).



Fonte: A autora (2025).

Tabela 5. Valores de IC_{50} (μM) dos compostos AM, AM-NMP e AM-I em células MDA-MB-231 sob efeito da irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$), utilizando dois métodos de viabilidade celular: MTT e resazurina.

FS	$\text{IC}_{50} \pm \text{DP} (\mu\text{M})$	
	MTT	Resazurina
AM	$3,3 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,6$
AM-NMP	$6,9 \pm 0,9$	$6,5 \pm 0,8$
AM-I	> 10	> 10

Fonte: A autora (2025)

O AM-NMP apresentou um valor de IC_{50} aproximadamente duas vezes maior que o do azul de metileno, enquanto o AM-I não exibiu fototoxicidade nas concentrações testadas. Esses resultados sugerem que as modificações estruturais não foram suficientes para melhorar a atividade fototóxica do azul de metileno na linhagem MDA-MB-231, possivelmente em função do menor coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e do baixo rendimento quântico de oxigênio singlete. Ressalta-se, entretanto, que o IC_{50} obtido para o AM-NMP ainda é considerado promissor ($< 10 \mu M$).

No caso do derivado AM-I, a ausência de fototoxicidade pode ser justificada pelo menor coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e pela limitada sobreposição entre o espectro de emissão do LED e o espectro de absorbância do composto (**Figura 5**). Em conjunto, esses fatores reduzem a quantidade de fótons efetivamente absorvidos pelo AM-I em relação ao AM e ao AM-NMP. Fato que pode comprometer a sua geração de EROs, diminuindo a sua eficiência fotodinâmica.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades fotofísicas e a atividade biológica de dois novos derivados do azul de metileno (AM), denominados AM-NMP e AM-I, visando seu potencial como fotossensibilizadores (FS) para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD) contra células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

Os resultados demonstraram que o AM-NMP apresentou coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon \approx 5,1 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e comportamento espectroscópico estável, sem evidências de agregação significativa. Em contrapartida, o AM-I exibiu baixo ϵ ($\approx 1,0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), associado à formação de agregados e à diminuição da eficiência de absorção de fótons. No estudo de fluorescência, ambos os derivados mostraram rendimentos quânticos (Φ_f) inferiores ao AM, com destaque para o AM-NMP, que apresentou redução de cerca de 10 vezes, o que pode indicar maior propensão à dissipação não radiativa e, potencialmente, maior geração de espécies reativas de oxigênio.

Entretanto, os rendimentos quânticos de oxigênio singlete (Φ_Δ) foram baixos para os dois derivados ($\approx 0,021$), quando comparados ao AM (0,52), sugerindo que as modificações estruturais não favoreceram a transferência intersistemas necessária para a eficiente geração dessa espécie reativa. Apesar disso, os três compostos apresentaram boa fotoestabilidade até 22 minutos de irradiação com LED Vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, $6,98 \text{ W/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra), o que garante desempenho satisfatório dentro das condições experimentais utilizadas nos ensaios biológicos (12 minutos de irradiação).

Nos ensaios biológicos, observou-se que o AM manteve maior fototoxicidade ($\text{IC}_{50} \approx 3,0 \text{ } \mu\text{M}$), enquanto o AM-NMP apresentou IC_{50} cerca de duas vezes maior ($\approx 6,7 \text{ } \mu\text{M}$), mas ainda dentro de uma faixa promissora ($< 10 \text{ } \mu\text{M}$) para TFD. Já o AM-I não apresentou efeito fototóxico nas concentrações avaliadas. Esses resultados indicam que o AM-NMP se destaca como derivado promissor, embora demande estudos adicionais para confirmar seu potencial terapêutico e compreender melhor a relação entre estrutura química e atividade fotodinâmica.

De forma geral, o trabalho contribui para a compreensão das relações estrutura-atividade em derivados do azul de metileno, apontando limitações importantes, como menor coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e a baixa eficiência de geração de oxigênio singlete comparado com AM.

Em relação às perspectivas futuras, destacam-se a necessidade de realizar ensaios para avaliar a geração de outras espécies reativas de oxigênio, como o radical ânion superóxido

($O_2^{\bullet-}$), bem como a detecção intracelular de EROs (1O_2 , H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e $\bullet OH$) por meio do ensaio com a sonda DCFH-DA (Diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína). Bem como avaliar o AM nos ensaios iniciais de solubilidade e determinação do coeficiente de absortividade molar. Pretende-se, ainda, investigar o grau de interação dos FS com biomoléculas (proteínas e lipídios), além de determinar a taxa de foto-oxidação em lipossomos e proteína modelo. Complementarmente, torna-se necessário avaliar a porcentagem de incorporação dos FS em células tumorais (MDA-MB-231) e não tumorais (MCF-10A), bem como calcular o índice de seletividade, definido pela razão entre os valores de IC_{50} obtidos para ambas as linhagens (MDA-MB-231 e MCF-10A).

6 REFERÊNCIAS

ARANHA, Raquel. O papel da imunohistoquímica após o diagnóstico do câncer de mama. Disponível em: <https://raquedaranha.com.br/o-papel-da-imunohistoquimica-apos-o-diagnostico-do-cancer-de-mama>. Acesso em: 07 set. 2025.

BACELLAR, Isabel O. L. et al. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, v. 90, n. 4, p. 801–813, 2014.

BAIRD, Richard D.; CALDAS, Carlos. Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine? *BMC Medicine*, 18 jun. 2013.

BAPTISTA, Maurício S. et al. Type I and Type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and Photobiology*, v. 93, n. 4, p. 912–919, 1 jul. 2017.

BIANCHINI, Giampaolo et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 13, n. 11, p. 674–690, 1 nov. 2016.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.

COLEMAN, William B.; TSONGALIS, Gregory J. (eds.). *The molecular basis of human cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2002.

DOS SANTOS, Ancély F. et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, 15 mar. 2017.

DUTRA, D. A. M. AVALIAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE METILENO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA. Dissertação (mestrado)—Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, RS, Brasil, 2013.

ENTRADAS, Tiago; WALDRON, Sarah; VOLK, Martin. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 204, 1 mar. 2020.

FELGENTRÄGER, Ariane et al. Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

FERY-FORGUES, Suzanne; LAVABRE, Dominique. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationery products. *Journal of Chemical Education*, v. 76, n. 9, p. 1260, 1999.

FREDERICE, R. et al. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29 a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.sbq.org.br/29ra/cdrom/resumos/T0710-1.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2025.

GOLLMER, Anita et al. A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling: a structure-response study. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 14, n. 2, p. 335–351, 4 fev. 2015.

GONÇALVES, Homero et al. Survival study of triple-negative and non–triple-negative breast cancer in a Brazilian cohort. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, v. 12, 26 jul. 2018.

INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 07 set. 2025.

KOHLE, Ferdinand F. E. et al. Ultrasmall PEGylated and targeted core-shell silica nanoparticles carrying methylene blue photosensitizer. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 6, n. 1, p. 256–264, 13 jan. 2020.

MAGALHÃES, Luiz Esteves Washington; THÁ, Emanoela Lundgren; LEME, Daniela Moraes. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. In: *Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2018.

MAYO CLINIC. Breast cancer. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/breast-cancer/diagnosis-treatment/drc-20352475?p=1>. Acesso em: 14 set. 2025.

MOREIRA, Alex Ferreira; SANTOS, Sérgio Ricardo Bezerra dos; COSTA JUNIOR, Ademir Gonçalves da. Construção e caracterização de um fotômetro destinado ao uso de aulas experimentais de química sobre a Lei de Beer-Lambert. *HOLOS*, v. 2, p. 142–151, 20 abr. 2016.

MSD. Estudo sobre câncer de mama triplo negativo discute a jornada de tratamento e utilização de recursos de saúde na rede privada brasileira – MSD Brasil, 2024.

OLIVEIRA, Fabiana Cristina Sales et al. Azul de metileno para fins terapêuticos. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR*, v. 27, n. 2, p. 66–70, 2019.

OLIVEIRA, Geângela de Fátima Sousa. Complexo heteroléptico de Rutênio(II) acoplado à biotina (Ru(BPY-ANTH)(BPY-BIOT)(DPPZ)₂): síntese, caracterização, estudos de reatividade e ensaios biológicos. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

PELOI, Lilian Somenci. Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica. / Lilian Somenci Peloi. –Maringá, PR, 2007. 67 f.

PETRELLIS, M. C. Avaliação dos efeitos do azul de metileno fotoativado no modelo experimental do tumor de Walker 256. 2014. 158 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade São Paulo, São Paulo, 2014.

PIMENTEL, Jorge Roberto et al. Uma sugestão para a interação multidisciplinar: a observação do fenômeno da fluorescência. *Caderno Brasileiro de Ensino de Física*, v. 31, n. 2, p. 365, 12 maio 2014.

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, v. 5, n. 1, p. 5–23, 2011.

RAMOS, Aline A. et al. Photochemical and photophysical properties of phthalocyanines modified with optically active alcohols. *Molecules*, v. 20, n. 8, p. 13575–13590, 1 ago. 2015.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual*, 2013.

RAMOS, Tárcius Nascimento. Efeitos de Solventes nos Espectros de Absorção e Emissão da Dimethoxy Curcumin. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. Física Geral. São Paulo, 2015.

ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 807–812, 2004.

SANTOS, Aline Magalhães dos. Atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores clorina e6 e azul de metileno associados a nanopartículas de ouro sintetizadas por ablação a laser. Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2018.

SANTOS, Ancély Ferreira dos. Estudo das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumores mamários humanos. Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica, 2016.

SANTOS, Darcy de A. et al. A novel technique of antimicrobial photodynamic therapy – aPDT using 1,9-dimethyl-methylene blue zinc chloride double salt (DMMB) and polarized light on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 200, 1 nov. 2019.

SHAHINYAN, Gohar A.; AMIRBEKYAN, Aren Yu; MARKARIAN, Shiraz A. Photophysical properties of methylene blue in water and in aqueous solutions of dimethylsulfoxide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 217, p. 170–175, 15 jun. 2019.

SILVA, Beatriz de Castro et al. Experimentação farmacológica in vitro: explorando novas fronteiras no desenvolvimento de fármacos. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 6, n. 6, p. 28032–28056, 15 nov. 2023.

SINGH, Neetika; SEN GUPTA, Ria; BOSE, Suryasarathi. A comprehensive review on singlet oxygen generation in nanomaterials and conjugated polymers for photodynamic therapy in the treatment of cancer. *Nanoscale*, Royal Society of Chemistry, 24 jan. 2024.

TALDAEV, Amir et al. Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies. *Frontiers in Pharmacology*, 2023.

TOREZAN, Luís et al. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 91, n. 4, p. 475–482, 2016.

TSUBONE, Tayana Mazin; BAPTISTA, Mauricio S.; ITRI, Rosangela. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. *Biophysical Chemistry*, v. 254, 1 nov. 2019.

WAINWRIGHT, Mark. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 4, p. 263–272, dez. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Cancer Burden growing, Amidst Mounting Need for Services. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>>. Acesso em: 08 set. 2025.

ZHANG, Xian Fu; LI, Xiaoli. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence*, v. 131, n. 11, p. 2263–2266, nov. 2011.