

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

ATHIRSON RUAN BARBOSA LOURENÇO

**Interação do azul de metileno-naftil-metil-piperazina com lipídio,
proteína e células de câncer de pulmão: implicações para Terapia
Fotodinâmica.**

Uberlândia

2026

ATHIRSON RUAN BARBOSA LOURENÇO

**Interação do azul de metileno-naftil-metil-piperazina com lipídio,
proteína e células de câncer de pulmão: implicações para Terapia
Fotodinâmica.**

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito necessário para obtenção do título de
bacharel em Química Industrial

Área de concentração: Química

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

Uberlândia

2026

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

L892 2026	Lourenco, Athirson Ruan Barbosa, 2000- Interação do azul de metileno-naftil-metil-piperazina com lipídio, proteína e células de câncer de pulmão: implicações para Terapia Fotodinâmica. [recurso eletrônico] / Athirson Ruan Barbosa Lourenco. - 2026. Orientadora: Tayana Mazin Tsubone . Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Química Industrial. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. 1. Tecnologia química. I. , Tayana Mazin Tsubone ,1989-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Química Industrial. III. Título. CDU: 660.2
--------------	---

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

ATHIRSON RUAN BARBOSA LOURENÇO

Interação do azul de metileno-naftil-metil-piperazina com lipídio, proteína e células de câncer de pulmão: implicações para Terapia Fotodinâmica.

Trabalho de Conclusão de Curso da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito necessário para obtenção do título de
bacharel em Química Industrial

Área de concentração: Química

Uberlândia, 19 de maio de 2026

Banca Examinadora:

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

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

Prof.^a Dr.^a Marcela Piassi Bernardo (Examinadora)

Dedico este trabalho ao meu pai João Batista
não somente pelo apoio e ajuda, mas também
por me permitir ser completo e verdadeiro
perante ele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai João Batista, por todo apoio a mim prestado durante o período da graduação. Sou eternamente grato, não somente pelas ajudas financeiras, mas também pelo carinho e voto de confiança, assim depositados em mim e em meus sonhos. Um homem que nunca deixou de acreditar no meu potencial, nem mesmo quando eu era um segredo para ele. Agradeço imensamente, por estar comigo no começo e agora no final desta etapa de minha vida, e espero ainda estar contigo em muitas conquistas, para sempre juntos pai.

Quero agradecer as mulheres da minha vida, minhas avós Esmeralda Barbosa e Nair Almeida que tiveram partes importantes na minha criação e que nunca perdem a oportunidade de falar que estão orando por mim. Desculpa não responder todas as mensagens vó Esmeralda, a distância dói, não poder abraça-la de novo, mas agradeço por sempre estar pensando em mim e por nunca esquecer de me enviar uma foto de bom dia nas mensagens, pois sei que esse gesto simples sempre demonstra que cada uma ainda roga e pensa na minha vida, na minha saúde e nos meus sonhos. Agradeço por cada oração, cada foto, cada vídeo chamada, cada almoço e janta preparado, cada pedido oferecendo refrigerante, cada dinheiro entregue como se fosse droga, cada pedido de ajuda com o celular, cada palavrão falado sem querer e os sorrisos vindo em seguida. Agradeço a minha mãe Joana D'arc, uma mulher que me ensinou a ser forte, como ela, do jeitinho dela, mas me ensinou. Obrigado por estar comigo independente da situação, e muito obrigado pelo voto de confiança, foi difícil conquistar, mas nunca vou esquecer que a aceitação e acolhimento partiram de você e a partir daquele dia deixar de ser um segredo foi algo incrível de se viver. Estaremos para sempre juntos mãe.

Agradeço as companheiras de minha jornada e vice-versa. A pessoa que conheci no ensino médio e que por mais que estamos distantes sempre conseguimos voltar a conversar como se nada tivesse acontecido. Agradeço a você Sthefânia Oliveira, pela amizade a mim oferecida naquela manhã de quarta-feira na sala de multimídia da escola. Obrigado por sempre acreditar em mim, agradeço imensamente pelos encontros e conversas, pelos filmes assistidos e pelos açaís tomados, pelos momentos de alegria e também pelos consolos prestados. Agradeço pelos mapas astrais, informações sobre astrologia e kpop não requisitados, todas as caminhadas de volta depois da escola todo trabalho de grupo feito. Estará sempre no meu coração. Obrigado Ananda Mori e Lara Hewilin, a amizade de vocês duas foi um divisor de águas na minha vida e vou sempre guardá-las em meu coração. Saibam que possuem um peso imenso na minha vida podem ter certeza que existem um Athirson antes e depois de vocês e quero deixar isso bem claro, pois vocês duas são muito importantes na minha vida. Obrigado por deixar essa fase leve e agradável. Obrigado por cada post enviado no Instagram, desculpa não responder e não ver

com frequência, mas acreditem que eu sempre fico muito feliz de receber e mesmo não usando o aplicativo com frequência sempre vou me esforçar e buscar meios para acompanhar o que vocês gostam e curtem. Sempre ficarei feliz com a felicidade de vocês três! Conta comigo.

Agradeço a professora Tayana Mazin, pela oportunidade de trabalhar no laboratório LiFEBio, assim também pela ótima orientação prestada neste trabalho. Quero agradecer pela paciência, compreensão e a didática a mim fornecido. Agradeço a professora Sheila Canobre, pela oportunidade de trabalho em iniciação científica durante o período da graduação, uma etapa com bastante aprendizados e experiências, assim também agradeço a doutorando Leticia Poggere por toda ajuda fornecida durante esse período.

Agradeço imensamente a professora Elaine Kikuti, obrigado pelo prazer de ter te conhecido. Uma mulher forte e decidida que criou um dos projetos mais lindos e interessantes que já vi na graduação e não somente isso fez com que eu não desistisse desse processo. Obrigado pelo período na gastronomia molecular, por cada prato feito, por cada minicurso apresentado e cada horas de conversa, definitivamente foi de uma imensa felicidade me deparar neste processo com algo que eu amo bastante que é a cozinha. Você vai brilhar muito!

Obrigado as integrantes do laboratório LiFEBio, Maynne Duarte, Patricia Alves e Ieda Cunha, por toda a paciência e ajuda, cada experimento auxiliado e cada conhecimento transferido. Obrigado por me ajudarem neste processo.

Sou eternamente grato a oportunidade de emprego a mim oferecida. Obrigado, Flavia Nogueira pela indicação e perseverança em mim depositados, pelas orientações e conhecimentos passados no início da jornada no mercado de trabalho. Quero agradecer a Andreia Lopes e Tuwane Ludmila pela paciência e orientações durante o processo de conclusão da minha graduação. Assim também, expresso minha sincera gratidão a Thales Azevedo e Francielly Amorin, pelos ensinamentos, feedbacks e pela indicação à vaga de emprego, oportunidade esta que vai contribuiu significativamente para minha formação profissional e crescimento pessoal. Agradeço também a Marina dos Reis e Wenya Aparecida, pela orientação, amizade, paciência nesta etapa de aprendizado. Sou imensamente grato ao Renato Andrelo, pelo voto de confiança a mim depositado, acredito que tudo feito com amor vale a pena o caminho a qual tenha que percorrer, quero e espero aprender muito com você.

Agradeço a professora Marcela Piassi Bernardo e ao professor Celso de Oliveira Rezende Júnior por aceitarem compor a minha banca de TCC. Agradeço a UFU pela oportunidade conquistada de cursar química industrial, Agradeço à FAPEMIG (APQ-02393-24, APQ-00864-25), 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.

Aqueles que desperdiçam a própria vida obcecados em como são enxergados, nunca vão conseguir experienciar o que é viver por completo.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais de câncer, devido à sua seletividade e menor toxicidade sistêmica. Nesse contexto, o trabalho teve como objetivo investigar as propriedades fotoquímicas e biológicas de derivados do azul de metileno, avaliando sua potencial aplicação como fotossensibilizantes no tratamento de câncer de pulmão. Foram estudados o azul de metileno (AM), seu derivado contendo grupo naftil-metil-piperazina (AM-NMP) e um intermediário de síntese (AM-I), com ênfase na relação entre lipofilicidade, interação com biomoléculas e atividade fotodinâmica. Inicialmente, avaliou-se a fotodegradação dos compostos sob irradiação com LED vermelho ($\lambda = 633 \text{ nm}$), observando-se menor estabilidade fotodinâmica para AM e AM-NMP em comparação ao intermediário AM-I. A lipofilicidade foi determinada por meio do coeficiente de partição (LogP), evidenciando maior caráter predominantemente hidrofílico para o AM-NMP ($\text{LogP} = -0,7 \pm 0,4$) e AM ($\text{LogP} = -1,4 \pm 0,3$), porém com o derivado possuindo uma lipofilicidade ligeiramente maior que seu precursor. Ensaios de ligação em lipossomos corroboraram esse resultado, demonstrando maior afinidade do AM-NMP por sistemas lipídicos. A interação com albumina de soro bovino (BSA) foi investigada por espectroscopia de fluorescência, revelando constantes de ligação na ordem de $10^3\text{--}10^5 \text{ M}^{-1}$ e estequiometria aproximada de 1:1, indicando interação moderada e potencial capacidade de transporte plasmático. Ademais, a foto-oxidação da BSA mostrou diminuição de fluorescência mais rápida quando em presença de AM, sugerindo degradação mais rápida comparada com os outros compostos. Ao avaliar a taxa de incorporação em células A549, nota-se valores maiores para AM-NMP, atribuído à sua maior lipofilicidade. Nos testes de viabilidade celular por MTT, os compostos não apresentaram toxicidade significativa no escuro, porém sob irradiação o AM e o AM-NMP demonstraram atividade fototóxica significativa, enquanto o intermediário AM-I não apresentou efeito satisfatório. Os resultados evidenciam que modificações estruturais no azul de metileno influenciam diretamente suas propriedades fotofísicas, interação com biomoléculas e atividade fotodinâmica. O derivado AM-NMP destacou-se pela maior lipofilicidade e incorporação celular, e com eficiência fotodinâmica similar à do AM. Assim, AM-NMP se mostra como candidato promissor para aplicação em terapia fotodinâmica em células de câncer de pulmão.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; azul de metileno; fotossensibilizantes; câncer de pulmão; fenotiazinas.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has emerged as a promising alternative to conventional cancer treatments due to its selectivity and lower systemic toxicity. In this context, this study aimed to investigate the photochemical and biological properties of methylene blue derivatives, evaluating their potential application as photosensitizers in the treatment of lung cancer. Methylene blue (MB), its derivative containing a naphthyl-methyl-piperazine group (MB-NMP), and a synthesis intermediate (MB-I) were studied, with emphasis on the relationship between lipophilicity, interaction with biomolecules, and photodynamic activity. Initially, the photodegradation of the compounds under irradiation with red LED ($\lambda = 633 \text{ nm}$) was evaluated, observing lower photodynamic stability for MB and MB-NMP compared to the intermediate AM-I. Lipophilicity was determined using the partition coefficient (LogP), showing a predominantly hydrophilic character for AM-NMP ($\text{LogP} = -0.7 \pm 0.4$) and AM ($\text{LogP} = -1.4 \pm 0.3$), although the derivative had a slightly higher lipophilicity than its precursor. Liposome binding assays corroborated this result, demonstrating a greater affinity of AM-NMP for lipid systems. The interaction with bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence spectroscopy, revealing binding constants on the order of $10^3\text{--}10^5 \text{ M}^{-1}$ and an approximate stoichiometry of 1:1, indicating moderate interaction and potential plasma transport capacity. Furthermore, photo-oxidation of BSA showed a faster decrease in fluorescence when in the presence of AM, suggesting faster degradation compared to the other compounds. When evaluating the incorporation rate in A549 cells, higher values were observed for AM-NMP, attributed to its greater lipophilicity. In MTT cell viability tests, the compounds did not show significant toxicity in the dark; however, under irradiation, AM and AM-NMP demonstrated significant phototoxic activity, while the intermediate AM-I did not show a satisfactory effect. The results show that structural modifications in methylene blue directly influence its photophysical properties, interaction with biomolecules, and photodynamic activity. The AM-NMP derivative stood out for its greater lipophilicity and cellular incorporation, and with photodynamic efficiency similar to that of AM. Thus, AM-NMP shows promise as a candidate for application in photodynamic therapy in lung cancer cells.

Keywords: photodynamic therapy; methylene blue; photosensitizers; lung cancer; phenothiazines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama de Jablonski. Processos que ocorrem com fotossensibilizadores (FS) ao serem ativados por luz.	21
Figura 2. Diagrama de Jablonski. Processos que ocorrem com fotossensibilizadores (FS) ao serem ativados por luz.	21
Figura 3. Desenho esquemático da organização dos compostos AM (1A), C2 (2A) e C1 (3A) na placa de 96 poços.	27
Figura 4. Eppendorffs com o sobrenadante e precipitado coletados para os compostos AM (A) e C2 (B).....	29
Figura 5. Células de câncer de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano (A594) cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sob temperatura controlada à 37°C.	32
Figura 6. Esquema da organização dos compostos AM (1A:C) e C2 (2A:C) incubados com células de câncer A549 à (37 °C, 5% de CO ₂) em uma placa de 12 poços.	33
Figura 7. Esquema representativo de microplaca com 96 poços, sendo a linha H o controle (CT) com apenas células sem composto, as colunas 1, 2, 3 e 4 incubadas com AM, as colunas 5, 6,7 e 8 com C2 e 9, 10, 11 e 12 com C1 em diferentes concentrações.....	34
Figura 8. Espectros de absorbância dos compostos AM (A), C2 (B) e C1 (C) com sua irradiação de 0 a 50 minutos.	36
Figura 9. Representação gráfica comparativa dos espectros de absorção dos compostos sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{em} = 633 \text{ nm}$), potência 6,98 mW/cm ² à 7,0 cm de distância da amostra.	37
Figura 10. Espectros de absorbância da partição aquosa e a absorção total do (A) AM e (B) C2.	39
Figura 11. Valores de porcentagem de ligação dos FS, AM e C2, em lipossomos de lecitina de soja.	41
Figura 12. Espectros de fluorescência da BSA (3,0 μM) em presença de diferentes concentrações do (A) AM, (B) C2 e (C) C1, em tampão Tris (pH 7,4), $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, fendas de excitação e emissão de 5,0 nm.	42
Figura 13. Gráfico de $\log[(F_0/F) / F]$ em função de $\log [FS]$ com BSA (3 μM) em tampão Tris 10mM, pH 7,4.	42
Figura 14. Espectro de fluorescência da BSA (3,0 μM) na presença de (A) AM (15 μM) (B) C2 (15 μM) e (C) C1 (15 μM) em solução tampão Tris (pH = 7,4) a 25°C, sob irradiação LED vermelho, $\lambda_{m\acute{a}x} = 633 \text{ nm}$, potência 6,98 mW/cm ² à 7,0 cm de distância da amostra.	44

Figura 15. Espectro de fluorescência da BSA (3,0 μM) na ausência dos FS em solução tampão Tris (pH = 7,4) a 25°C, sob irradiação LED vermelho, $\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, potência 6,98 mW/cm ² à 7,0 cm de distância da amostra.....	45
Figura 16. Valores de porcentagem de incorporação dos FS (4 μM), AM e C2, incubados por 24 h em células A549.....	46
Figura 17. Gráficos de % viabilidade celular <i>versus</i> concentração do FS (μM), dos compostos AM, C2 e C1, (A) na ausência de luz e (B) irradiado com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de cada FS em tampão tris 10mM pH = 7,4.	30
Tabela 2. Concentrações de cada fotossensibilizante em tampão tris 10mM pH = 7,4.....	31
Tabela 3. Valores do coeficiente de partição (Log P) calculados, com $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção. Experimento realizado em triplicata, portanto os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (DP).	39
Tabela 4. Constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) dos FS em BSA.	43
Tabela 5. Valores de IC50 (μM) dos compostos AM e Composto 2 em células A549, na ausência e na presença de irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
A549	Células de adenocarcinoma de pulmão
AM	Azul de metileno
AM-I	Azul de metileno intermediário
AM-NMP	Azul de metileno-naftil-metil-piperazina
BSA	Albumina do soro bovino
°C	Grais Celsius
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido e carbono
CT	Controle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração Inibitória Máxima Média
ISC	<i>Intersystem crossing</i>
J/cm ² .	Joules por centímetro quadrado
K _b	Constante de ligação
K _{sv}	Constante de supressão
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
Log P	Logaritmo de partição
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros

mm	Milímetros
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio]
nm	Nanômetros
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
(³ O ₂),	Oxigênio tripleto
(¹ O ₂),	Oxigênio singleto
(O ₂ ⁻),	Ânion superóxido
([•] OH)	Radicais hidroxila
PBS	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
(Phe	fenilalanina
RELAM	Rede de Laboratórios Multiusuário
S ₀	Estado singleto
S ₁ ou S _n .	Estado singleto excitado
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
T ₁	Estado Tripleto
TFD	Terapia fotodinâmica
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp)	triptofano
(Tyr)	tirosina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV-Vis	Ultravioleta - visível
mM	Milimolar
μL	Microlitros
λ _{máx}	Comprimento de onda máximo
λ _{exc}	Comprimento de onda de excitação
μM	Micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1.1. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (TFD)	20
1.2. Fotossensibilizadores (FS)	22
1.3. Interação dos FS com biomoléculas	24
2. OBJETIVO	25
2.1 Objetivos específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Avaliação da fotodegradação do AM, C1 e C2.	27
3.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P).....	27
3.3 Ligação dos FS em lipossomos	28
3.4 Interação dos FSs com Albumina de Soro Bovino (BSA)	29
3.5 Foto-oxidação da Albumina de Soro Bovino (BSA)	31
3.6 Cultivo das células A549	32
3.7 Incorporação dos FSs em células A549	33
3.8 Fototoxicidade dos compostos em células A594	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Avaliação da fotodegradação do AM, AM-NMP e AM-I.....	36
4.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P).....	38
4.3 Ligação dos FS em lipossomos	40
4.4 Interação dos FSs com proteína (BSA)	41
4.5 Foto-oxidação da proteína (BSA) causada pelos FS	44
4.6 Taxa de incorporação dos FSs em células A549.....	46
4.7 Fototoxicidade dos compostos em células A549	47
5. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	51

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão constitui um dos principais problemas de saúde pública em escala global, destacando-se tanto pela elevada incidência quanto pela alta taxa de mortalidade associada. Atualmente, é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado no mundo e permanece como a principal causa de mortes relacionadas ao câncer. Estimativas globais indicam que, apenas no ano de 2020, aproximadamente 2,2 milhões de novos casos foram diagnosticados, resultando em cerca de 1,8 milhão de óbitos atribuídos à doença. (Zhou et al., 2024)

Apesar dos avanços nas estratégias de diagnóstico e tratamento, o câncer de pulmão continua apresentando taxas de sobrevida relativamente baixas, o que reforça sua relevância como um grave desafio para os sistemas de saúde. Ademais, a incidência e a mortalidade associadas a essa neoplasia variam significativamente entre diferentes regiões geográficas, atrelado a poluição urbana, e entre os sexos, fato conectado a uso do tabagismo, sendo observada uma carga particularmente elevada em países asiáticos, devido a alta densidade industrial e em indivíduos do sexo masculino. (Zhou et al., 2024)

De forma consistente com esse cenário, estimativas mais recentes indicam que, em 2022, o câncer de pulmão foi o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em todo o mundo, com aproximadamente 2,48–2,5 milhões de novos casos, permanecendo simultaneamente como a principal causa de mortes por câncer, com cerca de 1,8 milhão de óbitos no ano. (Bray et al., 2024; Zhou et al., 2024)

Do ponto de vista clínico-patológico, o câncer de pulmão é classicamente dividido em dois grandes grupos: câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês *non-small cell lung cancer*) e câncer de pulmão de pequenas células (SCLC, do inglês *small cell lung cancer*). O NSCLC engloba principalmente adenocarcinoma, carcinoma espinocelular e carcinoma de grandes células, que, embora se originem de diferentes tipos celulares, compartilham características semelhantes em termos de abordagem terapêutica e prognóstico. Já o SCLC, menos frequente, é biologicamente mais agressivo, apresenta crescimento rápido e alta propensão à disseminação metastática precoce, o que se associa a maior risco de recidiva. (American Cancer Society, 2024)

Diante da elevada incidência e mortalidade do câncer de pulmão, o manejo clínico geralmente combina diferentes modalidades terapêuticas, selecionadas de acordo com o subtipo histológico, o estágio da doença, a extensão tumoral e as condições clínicas do paciente. Os principais tratamentos atualmente empregados incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, radioterapia corporal estereotáctica, terapias-alvo e imunoterapia (Mayo Clinic, 2024)

Na cirurgia, podem ser realizadas desde ressecções em cunha ou segmentares até lobectomia ou pneumonectomia, visando a remoção completa do tecido tumoral sempre que possível. A radioterapia utiliza feixes de alta energia, como raios X ou prótons, frequentemente em associação à quimioterapia, que emprega fármacos citotóxicos sistêmicos capazes de inibir a divisão celular, mas que também causam efeitos adversos relevantes, como mielossupressão e imunossupressão. Na radioterapia corporal estereotática, doses elevadas de radiação são dirigidas com alta precisão a tumores pulmonares pequenos, especialmente em pacientes inoperáveis. As terapias-alvo e a imunoterapia, por sua vez, atuam sobre vias moleculares específicas ou modulam a resposta imune antitumoral, sendo particularmente indicadas em casos avançados ou metastáticos com perfis moleculares definidos. (Mayo Clinic, 2024)

Apesar de avanços relevantes, os tratamentos convencionais ainda estão associados a toxicidades significativas e nem sempre resultam em controle duradouro da doença, contribuindo para impactos físicos e psicológicos importantes na qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, terapias emergentes potencialmente mais seletivas, como a terapia fotodinâmica (TFD), têm sido investigadas como alternativas seguras e eficazes para o tratamento do câncer de pulmão. (Crous; Abrahamse, 2022a)

A TFD é utilizada clinicamente para o tratamento do câncer de pulmão desde a década de 1990, com o fotossensibilizador (FS) derivado de hematoporfirina (hematoporphyrin derivative, HpD), comercialmente conhecido como Photofrin®. Em 1993, esse composto foi aprovado para o tratamento de câncer de pulmão em estágio inicial e avançado em diversos países, e, em 1998, recebeu aprovação da agência regulatória norte-americana (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer de pulmão em estágio inicial (Crous; Abrahamse, 2022). O Laserphyrin® (mono-L-aspartil cloro e6, NPe6) é um fotossensibilizador (FS) de segunda geração, aprovado pelo governo japonês e utilizado desde 2004 para tratamento de câncer de pulmão em estágio inicial. (Usuda et al., 2006)

Ao longo dos anos, os ensaios clínicos demonstraram que a TFD prolongou a sobrevivência e proporcionou palição em casos de NSCLC inoperável, parcialmente ou totalmente obstrutivo (Diaz-Jiménez et al., 1999), eficaz na palição de NSCLC/SC em estágio avançado (Moghissi et al., 1999), não apresentou morbidade ou mortalidade e melhorou os sintomas e a qualidade de vida quando usada em conjunto com a quimioterapia em casos de NSCLC avançado em que as operações curativas eram contraindicadas. (Kimura et al., 2015)

Apesar de suas vantagens, a TFD apresenta limitações importantes no tratamento de tumores volumosos, sobretudo devido à restrita profundidade de penetração da luz nos tecidos. Em geral, apenas lesões superficiais se beneficiam plenamente da TFD, uma vez que a luz

visível atinge tipicamente de 5 a 10 mm de profundidade (Crous; Abrahamse, 2022a). Para contornar essa limitação física, têm sido desenvolvidas novas tecnologias de fibra óptica e dispositivos microendoscópicos, que permitem a entrega intersticial, endoscópica, intraoperatória ou laparoscópica da luz diretamente no interior do tumor. (Crous; Abrahamse, 2022a)

Desde a aprovação da TFD para o tratamento clínico do câncer de pulmão, diversos fotossensibilizadores (FS) e fontes de luz vêm sendo investigados com o objetivo de otimizar a eficácia terapêutica. O interesse nesse aperfeiçoamento decorre do fato de a TFD, em geral, cursar com menos efeitos colaterais sistêmicos do que quimio- e radioterapia, o que torna crucial compreender em detalhe a interação do FS com o microambiente tumoral, os mecanismos desencadeados após a ativação luminosa e as propriedades fotofísicas e de localização celular que definem o desempenho fotodinâmico de um FS. (Crous; Abrahamse, 2022)

Nesse contexto, a compreensão detalhada do mecanismo de ação da TFD – desde a ativação do fotossensibilizador até a geração de espécies reativas de oxigênio e a indução de morte celular – é fundamental para orientar o desenvolvimento de protocolos mais eficazes e seguros, sendo o foco da seção a seguir.

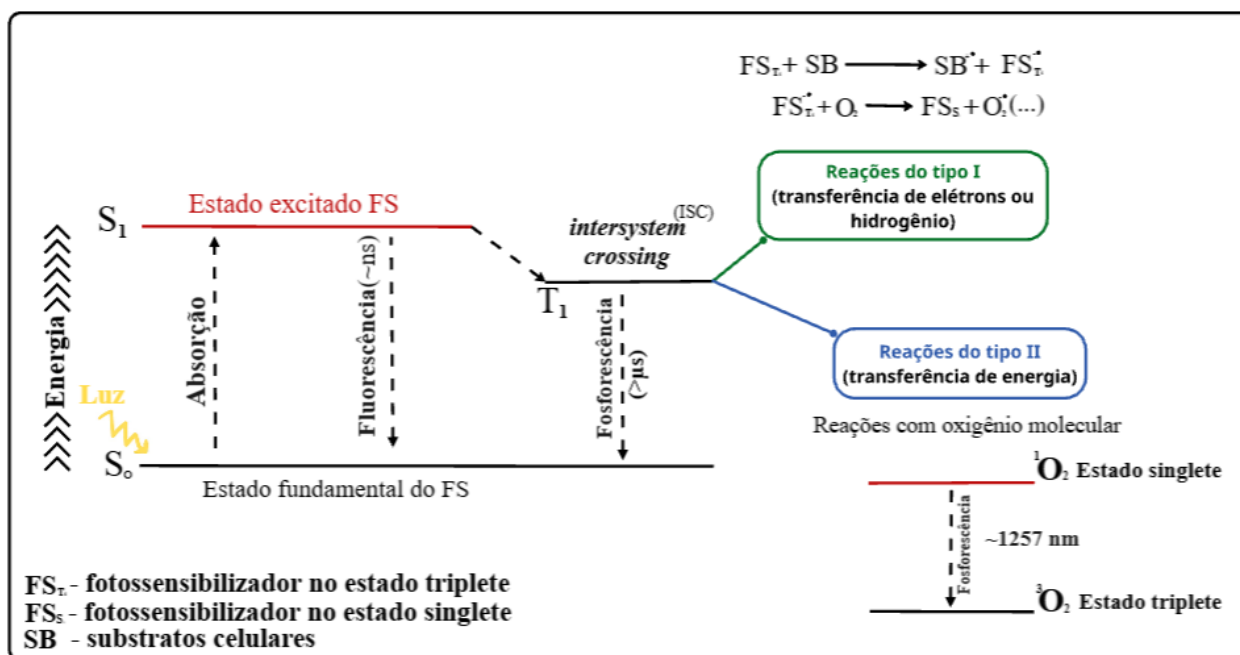
1.1. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD baseia-se na interação de três componentes fundamentais: um fotossensibilizador (FS), luz em comprimento de onda adequado e oxigênio molecular presente nos tecidos. Após administração e acúmulo preferencial do FS em tecido tumoral ou em estruturas associadas ao tumor, a região alvo é irradiada com luz de comprimento de onda correspondente à banda de absorção do FS. Esse processo desencadeia uma sequência de eventos fotoquímicos e fotofísicos que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na destruição seletiva das células-alvo. (Correia et al., 2021)

Do ponto de vista fotofísico, o mecanismo da TFD pode ser descrito com base no diagrama de Jablonski (Figura 1), que representa os estados eletrônicos do FS e as transições entre eles. No estado fundamental, o FS encontra-se em um estado singleto de menor energia (S_0). Quando absorve um fóton de luz, um elétron é promovido a um estado singleto excitado (S_1 ou S_n). A partir desse estado, o FS pode retornar a S_0 por decaimento radiativo (emissão de fluorescência) ou por processos não radiativos, liberando energia em forma de calor. Alternativamente, pode ocorrer “*intersystem crossing*” (ISC), no qual o FS sofre uma conversão não radiativa do estado singleto excitado para um estado tripleto excitado (T_1), de maior tempo

de vida, etapa crucial para a geração eficiente de ERO na TFD. (Santos, 2016; Torezan et al., 2009a)

Figura 1. Diagrama de Jablonski. Processos que ocorrem com fotossensibilizadores (FS) ao serem ativados por luz.



Fonte: Autor (2026) com base em (Santos, 2016).

No estado tripleto, o FS pode seguir dois caminhos principais, conhecidos como reações tipo I e tipo II. Na via tipo II, geralmente predominante para FS aprovados clinicamente, o FS em T_1 transfere sua energia diretamente ao oxigênio molecular em estado tripleto presente no tecido (3O_2), gerando oxigênio singleto (1O_2), uma espécie altamente reativa responsável por grande parte do dano oxidativo em biomoléculas (Tsubone; Baptista; Itri, 2019a). Na via tipo I, o FS em T_1 participa de reações de transferência de elétrons ou de hidrogênio com substratos celulares, originando radicais livres e espécies reativas derivadas do oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na prática, ambos os tipos de reação podem ocorrer simultaneamente, e o balanço entre eles depende de características intrínsecas do FS, da concentração de oxigênio e da composição do microambiente tumoral. (Cai et al., 2025)

As EROs geradas têm tempo de vida muito curto e raio de ação limitado, o que faz com que o dano seja altamente localizado nas proximidades onde o FS se encontra (Tsubone et al., 2021). Dependendo da localização subcelular do FS (membrana plasmática, mitocôndrias,

lisossomos, núcleo), podem ocorrer diferentes formas de morte celular, incluindo apoptose, necrose e morte autofágica (Tsubone et al., 2021a). Além do dano direto às células tumorais, a TFD também pode comprometer a vasculatura tumoral, levando à isquemia local, e modular a resposta imune, promovendo liberação de antígenos tumorais que favorecem a ativação de células do sistema imune (Crous; Abrahamse, 2022). Em conjunto, esses efeitos contribuem para a seletividade espacial da TFD e para seu potencial como estratégia terapêutica adjuvante ou combinada no tratamento do câncer de pulmão.

1.2. Fotossensibilizadores (FS)

Os fotossensibilizadores (FS) constituem o elemento central da TFD, pois determinam, em grande medida, a eficiência de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a seletividade tumoral e o perfil de toxicidade do tratamento. As principais gerações de FS incluem porfirinas e derivados (como o Photofrin®), clorinas e bacterioclorinas, ftalocianinas, além de corantes orgânicos como as fenotiazinas. Para uso oncológico, FSs ideais devem apresentar elevada absorção na janela terapêutica (600–800 nm), alto rendimento quântico de oxigênio singlete, adequada solubilidade, baixa agregação e acúmulo preferencial em células tumorais, com rápida depuração de tecidos saudáveis. (MAGALHAES DOS SANTOS, 2018; Torezan et al., 2009)

Entre os diferentes grupos de FS, compostos derivados do núcleo fenotiazínico, como azul de metileno (AM) e azul de toluidina, têm atraído interesse pela combinação de baixo custo, fácil síntese e propriedades fotofísicas favoráveis (Wainwright, 2005). Esses corantes possuem um cromóforo fenotiazínico que lhes confere forte absorção na região de 630 a 680 nm (Moreira et al., 2012), dentro da janela óptica de maior penetração tecidual, e rendimento quântico relevante de oxigênio singlete, em torno de 0,5 para o azul de metileno em meio aquoso (Wainwright, 2005). Além disso, fenotiazinas apresentam carga positiva e caráter anfifílico (González-González et al., 2021; National Library of Medicine, 2025; Zou; Xie, 2025) o que favorece a interação com membranas biológicas e ácidos nucleicos, contribuindo para acúmulo seletivo em células tumorais e organelas como mitocôndrias.

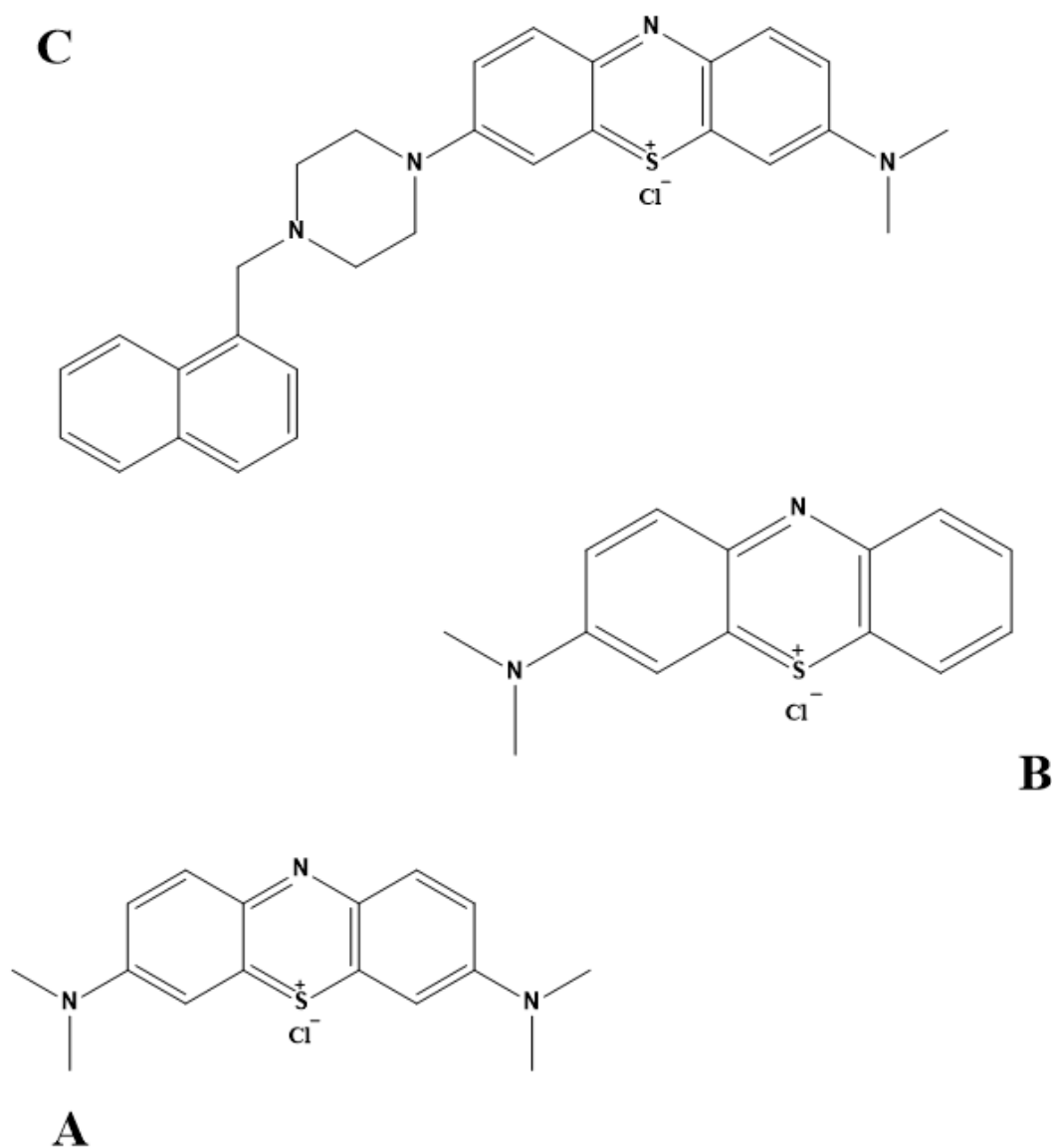
Em células de adenocarcinoma de pulmão (A549), a TFD mediada por azul de metileno (AM) foi associada à geração de espécies reativas de oxigênio, perda do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases e indução de apoptose, com modulação de proteínas pró- e anti-apoptóticas (Lim et al., 2013). Revisões recentes destacam que, graças ao cromóforo fenotiazínico, o azul de metileno combina forte ação fotossensibilizante com histórico de uso clínico em outras indicações, o que reforça seu potencial como plataforma para o

desenvolvimento de novos derivados com propriedades fotodinâmicas otimizadas. (Taldaev et al., 2023)

Nesse contexto, a síntese e avaliação de novos derivados de azul de metileno emergem como uma estratégia promissora para aprimorar parâmetros como lipofilicidade, taxa de fotodegradação, força de interação com biomoléculas (lipídios e proteínas), taxa de incorporação celular, e efeito fotooxidativo em proteínas. A investigação do efeito fotodinâmico desses derivados em linhagens de câncer de pulmão, como as células A549, permite não apenas comparar sua eficácia em relação ao azul de metileno convencional, mas também elucidar relações estrutura-atividade que podem orientar o desenho racional de fotossensibilizadores fenotiazínicos de próxima geração.

Sendo assim, neste trabalho foram estudadas as propriedades lipofílicas, força de interação com biomoléculas e o efeito fotodinâmico de derivados do azul de metileno (Figura 2), sintetizados pela Doutoranda Ieda Vieira da Cunha em parceria com Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LaSFar).

Figura 2. Estrutura química do (A) Cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina-5-io ou Azul de metileno (AM), (B) Cloreto de 3-dimetilamino-fenotiazina-5-io ou Metileno Azul (C2) e (C) Cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina-5-io ou Azul de metileno (AM) na placa de 96 poços. met



Fonte: Autor (2026)

1.3. Interação dos FS com biomoléculas

A eficiência da terapia fotodinâmica depende não apenas das propriedades fotofísicas do FS, mas também da sua interação com biomoléculas presentes no microambiente celular, em especial lipídios de membrana e proteínas. Como as espécies reativas geradas pela TFD possuem tempo de vida e raio de ação muito reduzidos, o dano fotooxidativo ocorre predominantemente nas estruturas que se encontram em proximidade nanométrica ao FS

(Tsubone; Baptista; Itri, 2019). Dessa forma, a afinidade do FS por determinados compartimentos ou alvos moleculares é determinante para a extensão e o tipo de lesão celular induzida (Tsubone et al., 2021; Tsubone; Baptista; Itri, 2019).

No caso dos lipídios de membrana, a localização do FS próxima a fosfolipídios insaturados favorece a formação de radicais lipídicos e hidroperóxidos (Bacellar; Baptista, 2019; Rezende et al., 2022), desencadeando cadeias de peroxidação lipídica que alteram fluidez, permeabilidade e integridade das membranas celulares (Tsubone et al., 2019). Estudos mostram que a peroxidação de lipídios de membrana durante a TFD pode comprometer o potencial de membrana mitocondrial (Klosowski et al., 2020), favorecer a liberação de citocromo c e contribuir para vias de morte celular como apoptose e, em certas condições, morte ferroptose-like (Overchuk et al., 2025). De modo análogo, a proximidade do FS a proteínas estruturais ou enzimáticas leva à oxidação de resíduos suscetíveis, formação de carbonilas e agregados, com perda de função e desregulação de vias de sinalização pró- e antiapoptóticas (De Melo Gomes et al., 2023).

Para corantes fenotiazínicos, como o AM, há forte evidência de que a interação com membranas, proteínas e ácidos nucleicos potencializa o dano fotoinduzido, aumentando níveis de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e disfunção mitocondrial (De Melo Gomes et al., 2023; Klosowski et al., 2020b). Ensaio *in vitro*, utilizando modelos simplificados de lipídios e proteínas, são particularmente úteis para elucidar essas interações, quantificar a extensão da oxidação e estabelecer relações entre interação do FS com biomolécula, dano fotooxidativo em lipídios e proteínas e a eficiência da TFD em causar morte celular.

No contexto deste trabalho, a caracterização da interação de novos derivados de AM com lipídios e proteínas visa compreender se a proximidade com essas biomoléculas pode maximizar reações fotooxidativas e, conseqüentemente, modular a resposta fotodinâmica em células A549 de câncer de pulmão,

2. OBJETIVO

Investigar o potencial fotodinâmico dos derivados de AM, sendo eles o composto 1 e composto 2 a qual conten um grupo substituinte naftil-metil-piperazina, em células A549 de adenocarcinoma de pulmão humano, avaliando se existe relação entre atividade fototóxica em células de câncer de pulmão, com a força de interação com biomoléculas (lipídios e proteínas).

2.1 Objetivos específicos

- Determinar o coeficiente de partição (LogP) dos compostos AM, composto 1 e composto 2,
- Avaliar a interação dos compostos em lipossomos,
- Avaliar a interação dos FSs com a proteína albumina do soro bovino (BSA),
- Investigar a fotooxidação promovida na BSA,
- Determinar a taxa de incorporação celular dos FSs em células de câncer de pulmão A549,
- Avaliação da fototoxicidade dos compostos em células do câncer de pulmão (A549).

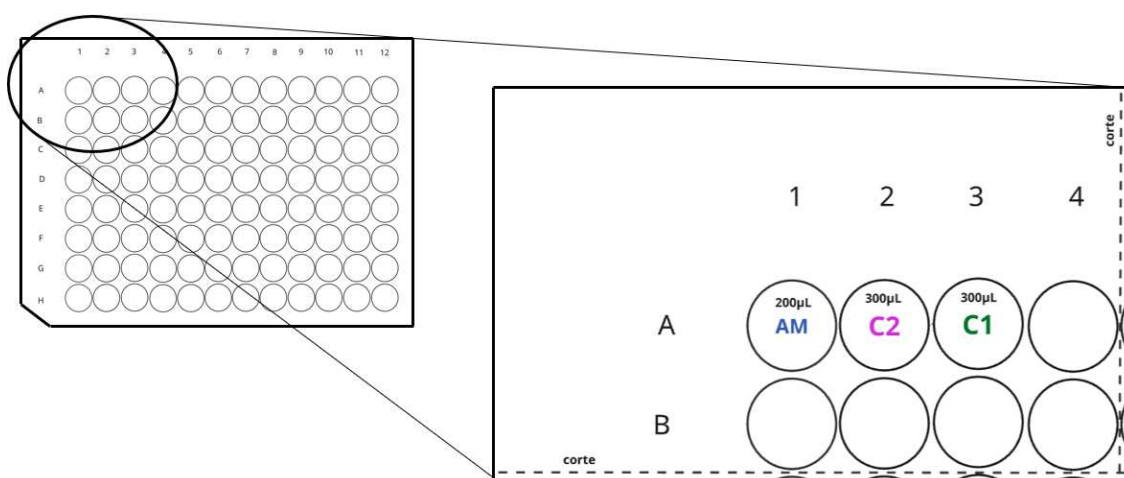
3. METODOLOGIA

3.1 Avaliação da fotodegradação do AM, C1 e C2.

Neste experimento, o intuito era investigar de forma qualitativa a capacidade de fotodegradação dos fotossensibilizadores AM, C1 e C2 mediante a irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm} \pm 0,17$), à $6,98 \text{ mW/cm}^2$ de potência aplicado a 7 cm de distância da amostra. Dessa forma, preparou-se uma solução de cada FS em tampão fosfato a 0,1 M com pH de 7,5 e foi adicionado em uma placa os seguintes volumes: 200 μL para o AM, 300 μL para o C1 e 300 μL para o C2, volumes esses ajustados para uma absorbância máxima de aproximadamente 0,5.

Após a montagem da placa, conforme esquematizado na Figura 4, as amostras foram submetidas a ciclos de irradiação sequenciais, entre 0 e 50 minutos, totalizando 10 pontos de tempo para cada FS. A leitura foi feita na leitora de microplacas (Modelo: EPOCH-SN, Marca: Biotek-Agilent), com os gráficos sendo elaborados utilizando o software Origin Pro 8.0.

Figura 3. Desenho esquemático da organização dos compostos AM (1A), C2 (2A) e C1 (3A) na placa de 96 poços.



Fonte: Autor (2026)

3.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P)

Com o intuito de investigar a lipofilicidade dos compostos fotossensibilizadores AM, C1 e C2, foram feitos ensaios para calcular o seu Log P, logaritmo esse de partição do FS entre uma solução aquosa e de 1-octanol (Işık et al., 2020). Os dados de intensidade de absorção foram coletados por meio de um espectrofotômetro UV-Visível (Marca: Shimadzu, Modelo: UV-2501 PC).

Foram inicialmente preparados três estoques concentrados de cada FS em água. A partir desses estoques, realizaram-se diluições em cubetas com etanol, com dois objetivos: determinar a concentração real dos estoques e ajustá-los para uma concentração final de 30 µM, considerada como absorvância total, para cada FS em triplicata.

Em seguida, foram preparados sistemas bifásicos adicionando-se 1 mL do estoque ajustado e 1 mL de 1-octanol em tubos Falcon de 15 mL, em triplicata para cada FS, os quais foram tampados e agitados por 2 minutos em vórtex em velocidade máxima. Após a agitação, os tubos foram protegidos da luz com papel alumínio e mantidos sob temperatura ambiente por 24 h para permitir o equilíbrio de partição. Decorrido esse período, a fase orgânica (1-octanol) foi cuidadosamente separada com pipeta volumétrica e transferida para novos tubos. Da fase aquosa, retirou-se o mesmo volume utilizado no ajuste da absorvância total, e a absorvância foi medida novamente após a partição com o solvente apolar. Com os valores de absorvância da fase aquosa, calcularam-se os coeficientes de partição (LogP) de cada FS, conforme a equação 1 (Wainwright et al., 2009).

$$\log P = \log \left(\frac{Abs_{total} - Abs_{\text{água}}}{Abs_{total}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

3.3 Ligação dos FS em lipossomos

Em continuidade à investigação da lipofilicidade dos fotossensibilizadores, foram realizados ensaios de porcentagem de ligação a vesículas lipídicas (lipossomas). Essas estruturas supramoleculares são formadas por anfifílicos que organizam bicamadas contendo pequena fração aquosa, de modo que vesículas compostas por fosfolipídios naturais mimetizam adequadamente membranas biológicas (Paul; Guchhait, 2012).

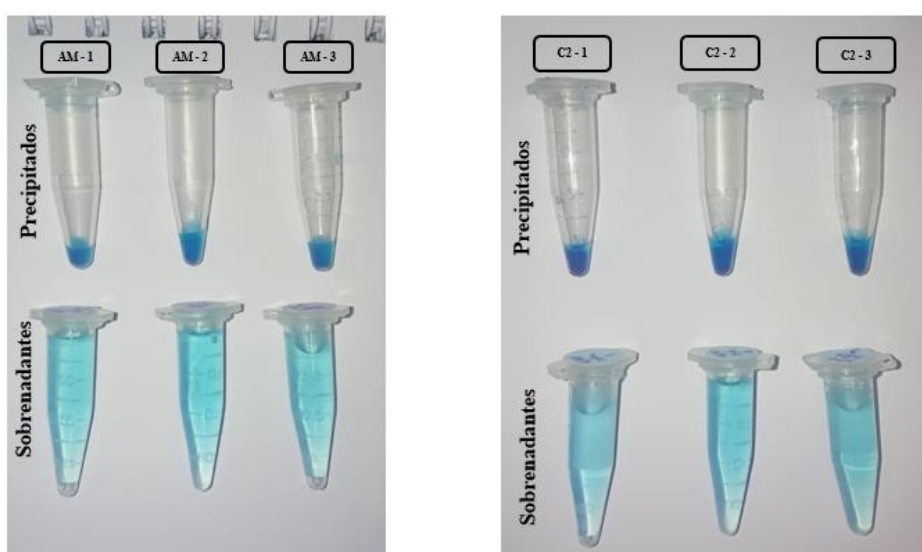
Inicialmente, foram pesados 30 mg de lecitina de soja em balança analítica de cinco casas decimais (Prix, Toledo AS82/220 R2, RELAM – Campus Santa Mônica/UFU). O lipídio foi dissolvido em aproximadamente 1 mL de clorofórmio e o solvente removido em rotaevaporador, formando um filme lipídico. Em seguida, o filme foi hidratado com 2 mL de tampão Tris 5 mM, pH 7,4, previamente ajustado em pHmetro, para obtenção das vesículas lipossomais.

Com os lipossomos prontos, foram preparadas soluções de fotossensibilizadores AM e C2 e posteriormente adicionado em 2 eppendorffs de 1500µL a qual foi tirado uma alíquota de 1000µL para a leitura da absorvância total por meio de espectrofotômetro UV-Visível (Marca: Shimadzu, Modelo: UV-2501 PC). Logo, preparou-se 6 eppendorffs de 1500µL com a solução cada de FS mais a solução de lipídeos seguindo a proporção de 1300µL para 200µL

respectivamente. Após a mistura, os eppendorffs foram centrifugados a 10000rpm por 6 minutos. Posteriormente, foi separado o sobrenadante do precipitado como mostra a Figura 5, para ser feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro com a diluição de 1:1 em etanol. Os cálculos das porcentagens de ligação para cada FS foram feitos seguindo a equação 2.

$$\% \text{ ligação} = \left(\frac{Abs_{precipitado}}{Abs_{precipitado} + Abs_{sobrenadante}} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

Figura 4. Eppendorffs com o sobrenadante e precipitado coletados para os compostos AM (A) e C2 (B)



Fonte: Autor (2026)

3.4 Interação dos FSs com Albumina de Soro Bovino (BSA)

Com o objetivo de avaliar a interação das fenotiazinas com a albumina de soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*), foi preparada uma solução tampão Tris 10 mM, pH 7,4, a qual foi utilizada como solvente para o preparo das soluções de BSA e dos FS. A solução de BSA foi preparada na concentração de 3 μ M. Para os FS, foram inicialmente preparadas soluções estoque, que posteriormente foram diluídas no tampão para obtenção das concentrações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de cada FS em tampão tris 10mM pH = 7,4.

FS	Concentração ($\times 10^{-5}$) em mol/L
AM	1,45
C2	2,84
C1	1,89

Fonte: Autor (2026)

O experimento foi conduzido em temperatura controlada de 21 °C. Inicialmente, 3000 μ L da solução de BSA foram adicionados a uma cubeta de quartzo. Em seguida, o FS foi adicionado sequencialmente em alíquotas de 30 μ L, sendo cada adição seguida por um período de interação de 2 min antes da realização das medidas. Após cada etapa, foram registradas as leituras de absorbância e de fluorescência.

As medidas de fluorescência foram realizadas com excitação em $\lambda_{exc} = 280$ nm, varredura de emissão entre 300 e 550 nm e fendas de excitação e emissão ajustadas para 5/5 nm. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo das constantes de Stern–Volmer (K_{SV}) e constante de ligação (K_b), ajustadas ao modelo de Lakowicz por meio de linearização, conforme descrito pelas Equações 3 e 4.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[FS] \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

- F_0 : a intensidade de fluorescência da biomolécula (BSA) na ausência do supressor (os complexos de rênio), representando a fluorescência inicial, antes de qualquer interação com o FS.
- F : a intensidade de fluorescência da biomolécula (BSA) na presença de uma determinada concentração do supressor (FS).
- K_{SV} (Constante de Stern-Volmer): quantifica a eficiência da supressão da fluorescência pelo FS. É a inclinação do gráfico de F_0/F versus $[FS]$.
- $[FS]$ (Concentração do Supressor): a concentração molar do supressor (os FSs) na solução.

$$\text{Log}\left(\frac{F_0}{F}\right) = \text{Log}(K_b) + n\text{Log}[FS] \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

- $\log(F_0/F)$: logaritmo da razão entre a intensidade de fluorescência da biomolécula (BSA) sem o ligante (F_0) e a intensidade de fluorescência da biomolécula na presença de uma determinada concentração do ligante (FS).
- $\log(K_b)$: logaritmo da constante de ligação (K_b), ou seja, medida da afinidade de ligação entre os FSs e a BSA.
- n (Número de Sítios de Ligação): representa o número de moléculas do ligante (FS) que podem se ligar a uma única molécula da BSA.
- $\log [FS]$: logaritmo da concentração molar do ligante (FS).

3.5 Foto-oxidação da Albumina de Soro Bovino (BSA)

Para investigar a foto-oxidação dos compostos, foi feito o ensaio da sua capacidade foto-oxidativa em albumina de soro bovino. Primeiramente, foi preparado uma solução de tampão tris 10mM de pH 7,4 a qual foi usada para preparar uma solução de BSA de 1,0 μ M, em consonância com o preparo das soluções dos FS, utilizando o mesmo solvente, com as concentrações organizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de cada fotossensibilizante em tampão tris 10mM pH = 7,4

Concentrações dos [FS] em mol/L	
[FS]	Concentração ($\times 10^{-5}$)
AM	1,45
C2	2,84
C1	1,89

Fonte: Autor (2026)

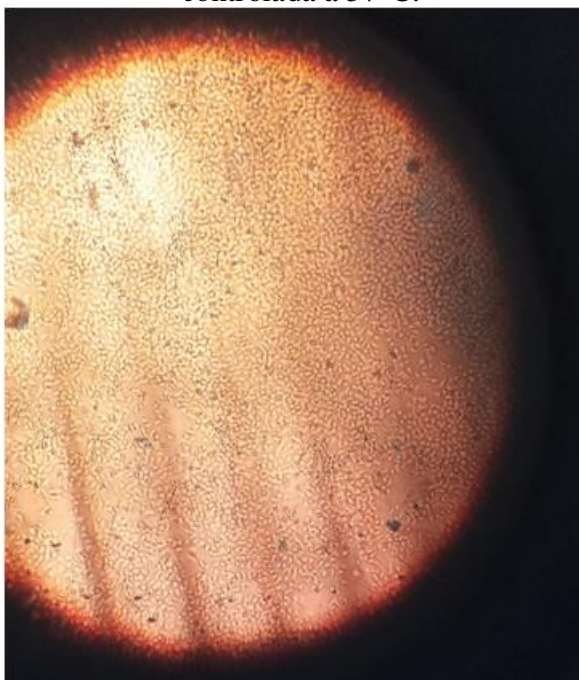
Após a finalização do preparo das soluções, foram feitas as medidas no espectrofotômetro de fluorescência (Marca: Varian, Modelo: Cary Eclipse), localizado na Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM) da UFU, Campus Santa Mônica com a colaboração da Doutoranda Patrícia Alves Matos. Diante disso, as amostras foram inseridas em uma cubeta de quartzo com irradiação de cada composto com LED vermelho de $\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm, potência 6,98 mW/cm² à 7,0 cm de distância da amostra sob agitação, sendo a leitura de fluorescência feita de 2 em 2 minutos após irradiação. Foi medido a fluorescência da BSA usando os parâmetros de $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, leitura de $\lambda_{\text{em}} = 300$ a 550 nm e fendas de 5/5 nm.

3.6 Cultivo das células A549

Para o ensaio de incorporação celular, os compostos foram testados em células de câncer de pulmão, linhagem essa de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano A594. As células foram cultivadas em meio de cultura, até estarem crescidas o suficiente para serem manipuladas como na Figura 6. Para o cultivo foi preparado 1000 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), a qual foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com antibiótico.

Primeiramente, o meio antigo no frasco foi descartado, e posteriormente, adicionado 1mL de PBS (*Phosphate Saline Buffer*) a fim de lavar o recipiente. Em seguida, para soltar as células aderidas ao frasco, foi adicionado 1,5mL de tripsina (tripsina-EDTA), em seguida o frasco foi agitado moderadamente e colocado por 5 minutos na estufa (37°C, 5% de CO₂). As células suspensas foram transferidas para um falcon adicionando-se meio de cultura completo para cortar o efeito da tripsina, assim o falcon foi centrifugado por 5 minutos a 1500rpm na centrífuga (marca: Kasvi modelo: K14-1215P) disponibilizada no LiFeBio. A quantificação do número de células foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer.

Figura 5. Células de câncer de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano (A594) cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sob temperatura controlada à 37°C.



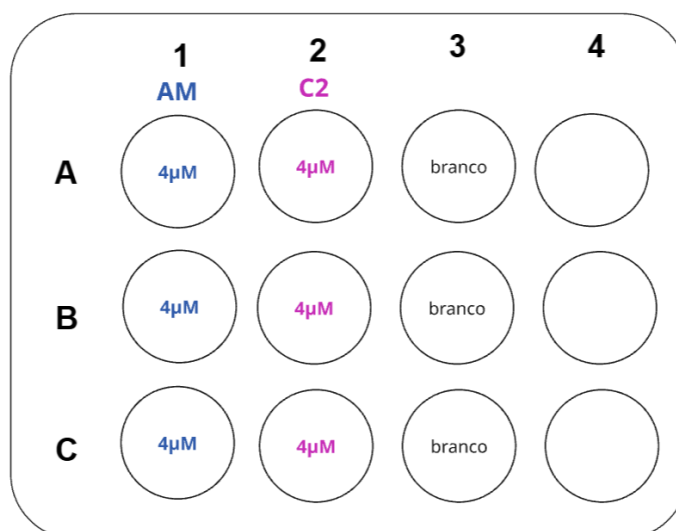
Fonte: Autor (2026)

3.7 Incorporação dos FSs em células A549

Para o plaqueamento, aproximadamente 300.000 células por poço foram semeadas em uma placa de 12 poços (2000 μ L por poço) e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C, 5% de CO₂) para permitir a adesão celular. Os FSs foram previamente solubilizados em DMSO e posteriormente diluídos em DMEM nas concentrações desejadas, assegurando-se que a porcentagem final de DMSO não excedesse 1%. Para as soluções dos FSs foram preparados 8mL de solução em meio de cultura DMEM a 4 μ M.

Após o período de adesão, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, adicionaram-se as soluções dos FSs diluídos em DMEM. A organização das amostras na placa encontra-se ilustrada na Figura 7.

Figura 6. Esquema da organização dos compostos AM (1A:C) e C2 (2A:C) incubados com células de câncer A549 à (37 °C, 5% de CO₂) em uma placa de 12 poços.



Fonte: Autor (2026)

Após 24h horas de incubação do FS (4 μ M) nas células A549, a placa foi retirada da estufa e coletado 1,5 mL o sobrenadante que foi transferido para uma outra placa de 12 poços a qual foi diluído com 1,5mL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*). Na placa onde as células estavam aderidas, elas foram lavadas com 1mL de PBS (*Phosphate Saline Buffer*) para posteriormente serem lisadas com a adição de 1,5mL de SDS à 10% (v/v). Posteriormente, o SDS nos poços das células aderidas foi diluído com 1,5mL de meio e cultura. Em seguida, ambas as placas, sobrenadante e lisado, foram lidas suas absorbâncias na leitora de microplaca entre 400 a 750nm. Os cálculos foram efetuados seguindo a equação 5.

$$\% \text{ Uptake} = \frac{Abs_{lise}}{(Abs_{lise} + Abs_{sobrenadante})} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

3.8 Fototoxicidade dos compostos em células A594

Aproximadamente 10.000 células por poço foram semeadas em duas placas de 96 poços (100 µL por poço) e incubadas por 24 horas em estufa (37 °C, 5% de CO₂) para permitir a adesão celular. Os FSs foram previamente solubilizados em DMSO e posteriormente diluídos em DMEM nas concentrações desejadas, assegurando-se que a porcentagem final de DMSO não excedesse 1%.

Após o período de adesão celular, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, adicionaram-se as soluções contendo diferentes concentrações dos FSs diluídos em DMEM. A organização das amostras, bem como suas respectivas concentrações, como disposto na Figura 8.

Figura 7. Esquema representativo de microplaca com 96 poços, sendo a linha H o controle (CT) com apenas células sem composto, as colunas 1, 2, 3 e 4 incubadas com AM, as colunas 5, 6, 7 e 8 com C2 e 9, 10, 11 e 12 com C1 em diferentes concentrações.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AM				C2				C1			
A	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM	10µM
B	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM	7,5µM
C	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM	5µM
D	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM	2,5µM
E	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM	1µM
F	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM
G	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM	0,1µM
H	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT

Fonte: Autor (2026)

Após 24h horas de incubação do FS nas células A549, as células foram lavadas com PBS. Em uma das placas, adicionou-se meio de cultura e foi mantida no escuro. Enquanto na

outra placa, adicionou-se meio de cultura sem fenol, e irradiou com LED vermelho de $\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, potência $6,98 \text{ mW/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra, irradiado por 15 minutos, resultando numa dose de luz de 6 J/cm^2 . Após a irradiação, retirou-se o meio de cultura sem fenol e foi adicionado novamente $100 \mu\text{L}$ de DMEM com fenol e a placa foi deixada para incubar em estufa (37°C , 5% de CO_2) por 24 horas pós irradiação.

Após 24 h da irradiação, adicionou-se $13 \mu\text{L}$ da solução de 3 mg/mL de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio] (MTT) a cada poço, obtendo-se uma concentração final de $0,35 \text{ mg/mL}$ de MTT no poço. As placas foram então incubadas por mais 3 h em estufa a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 .

Durante esse período, o MTT foi reduzido pelas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas, formando cristais insolúveis de formazan, os quais são diretamente proporcionais à viabilidade celular (Berridge; Tan, 1993; Luiz et al., 2019).

Concluída as 3 h de incubação do MTT nas células, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os cristais formados foram solubilizados em $100 \mu\text{L}$ de DMSO. A absorbância foi então mensurada a 570 nm utilizando uma leitora de microplacas (Biotek-Agilent, modelo EPOCH-SN), instalada no LIFeBio.

A viabilidade celular foi quantificada por meio da equação 6, e os valores de IC_{50} dos compostos foram obtidos pela construção e análise da curva dose-resposta no software GraphPad Prism 5.0.

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{ABS_{trat}(570nm) - ABS_{trat}(600nm)}{\sum_{i=1}^n ABS_{CT}(570nm) - \sum_{i=1}^n ABS_{CT}(600nm)} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

- ABS_{trat} : Absorbância em 570 nm ou 600 nm , das células tratadas com TFD
- ABS_{CT} : Absorbância em 570 nm ou 600 nm , das células controle (sem tratamento)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

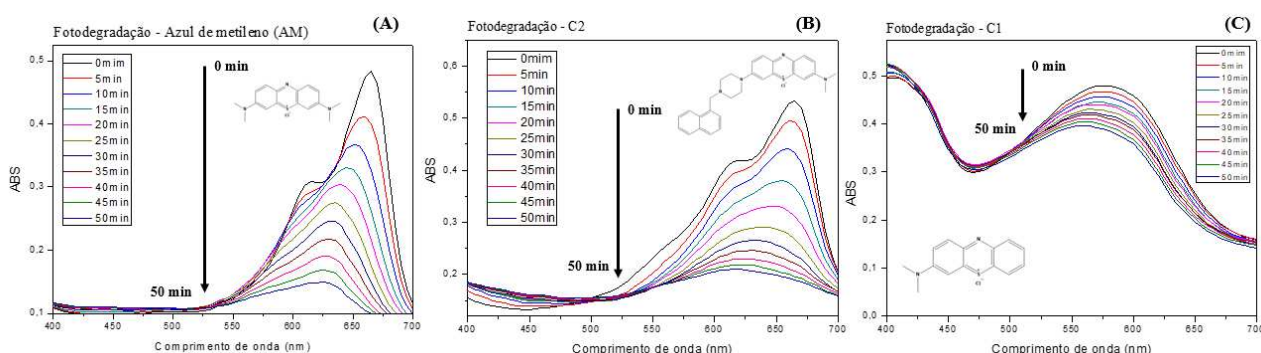
4.1 Avaliação da fotodegradação do AM, Composto 1 e Composto 2

O estudo da fotodegradação de fotossensibilizadores (FS) constitui um parâmetro relevante para a compreensão de seu comportamento fotoquímico e de sua eficiência em processos fotodinâmicos (Khan et al., 2022). A degradação do cromóforo sob irradiação está frequentemente associada à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que essas mesmas espécies podem participar de reações foto-oxidativas que levam à modificação estrutural do FS (Khan et al., 2022; Viola; Dall'acqua, 2006). Assim, a caracterização do perfil de fotodegradação dos diferentes FS permite não apenas comparar sua estabilidade fotoquímica, mas também obter informações sobre sua eficiência de participação nas reações fotooxidativas que culminam no dano celular desejado.

O equilíbrio entre reatividade fotoquímica e estabilidade estrutural é um aspecto crítico, pois taxas excessivamente elevadas de degradação podem comprometer a disponibilidade do FS ao longo do tratamento. A avaliação comparativa da fotodegradação permite correlacionar estabilidade fotodinâmica, geração de espécies reativas e desempenho biológico dos fotossensibilizantes estudados.

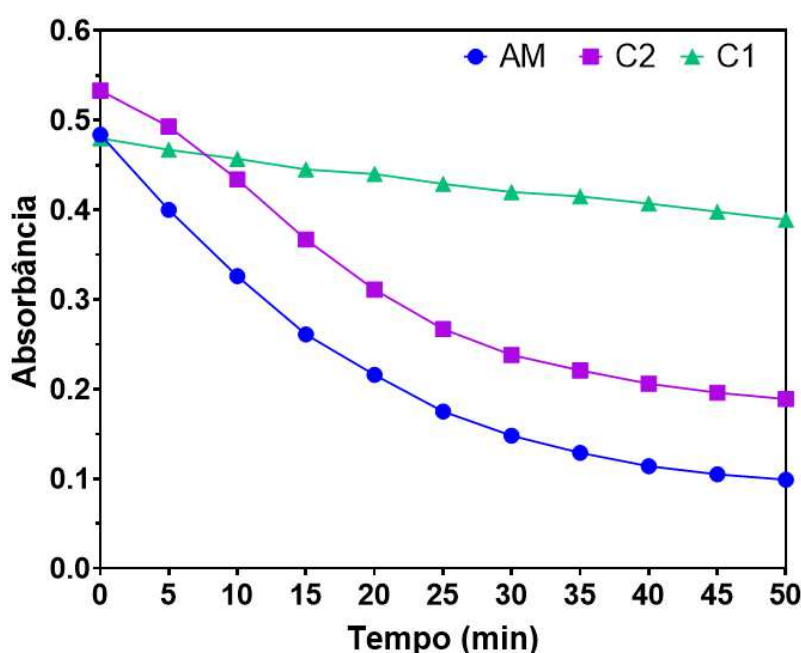
A Figura 9 apresenta os espectros de absorção UV–Vis das moléculas AM (A), C2 (B) e C1 (C) registrados ao longo do tempo de irradiação com LED vermelho. Para AM e C2 observa-se uma diminuição progressiva da intensidade das bandas de absorção características na região do visível à medida que o tempo de irradiação aumenta, indicando a ocorrência de fotodegradação. Em contraste, o composto C1 apresenta alterações espectrais significativamente menos pronunciadas ao longo do mesmo período de irradiação, sugerindo comportamento fotodegradativo menor.

Figura 8. Espectros de absorbância dos compostos AM (A), C2 (B) e C1 (C) com sua irradiação de 0 a 50 minutos.



Com o intuito de comparar de forma mais clara a fotodegradação dos compostos, foi construído o gráfico da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) em função do tempo de irradiação (Figura 10). Observa-se que todos os compostos apresentam diminuição da absorbância ao longo do tempo, indicando ocorrência de fotodegradação sob irradiação com LED vermelho. No entanto, a magnitude dessa diminuição varia significativamente entre os compostos analisados.

Figura 9. Representação gráfica comparativa dos espectros de absorção dos compostos sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$), potência $6,98 \text{ mW/cm}^2$ à $7,0 \text{ cm}$ de distância da amostra.



Fonte: Autor (2026)

O AM apresenta a maior taxa de decaimento da absorbância, evidenciando maior suscetibilidade à fotodegradação nas condições experimentais empregadas. O derivado C2 também apresenta redução progressiva da absorbância, porém com comportamento intermediário, indicando maior estabilidade fotodinâmica em comparação ao AM. Em contraste, o composto C1 apresenta a menor variação de absorbância ao longo do tempo, sugerindo elevada resistência à fotodegradação.

A maior fotodegradação observada para o AM pode ser associada à sua elevada eficiência fotodinâmica, uma vez que a degradação do cromóforo está frequentemente relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio durante o processo fotoquímico. A modificação estrutural presente no C2 parece conferir maior estabilidade ao sistema, possivelmente por

efeitos estéricos e eletrônicos associados ao grupo naftil-metil-piperazina, que podem reduzir a taxa de reações foto-oxidativas diretas sobre o cromóforo fenotiazínico.

Em conjunto, os resultados demonstram que modificações estruturais no AM influenciam significativamente sua estabilidade fotodinâmica. O derivado C2 apresenta um equilíbrio favorável entre estabilidade e reatividade fotoquímica. Assim, embora a fotodegradação represente uma limitação em termos de estabilidade, ela também se correlaciona com a atividade fotodinâmica desejada para aplicações em TFD.

4.2 Determinação do coeficiente de partição (Log P)

A lipofilicidade dos fotossensibilizadores, frequentemente expressa pelo coeficiente de partição octanol/água (Log P) (Myrzakhmetov et al., 2022), constitui um parâmetro físico-químico fundamental para compreensão de seu comportamento biológico em TFD (Benov, 2015). Valores de Log P refletem a tendência da molécula em se distribuir entre fases aquosa e lipofílica e estão diretamente relacionados à capacidade de partição em membranas, ao padrão de internalização celular e à localização subcelular do FS (Ben-Dror et al., 2006; Saenz et al., 2022), fatores que modulam a extensão e o local do dano fotooxidativo.

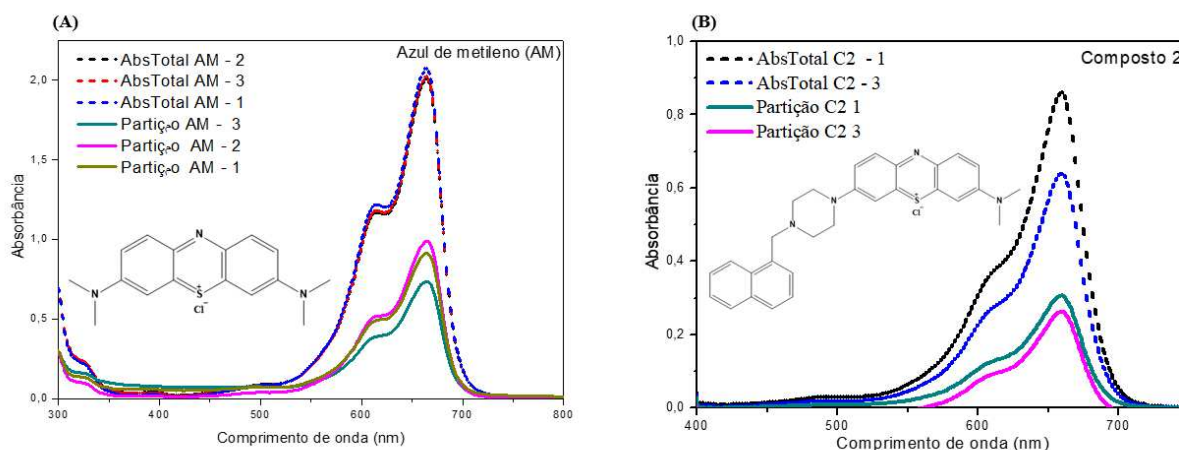
Estudos com diferentes classes de FS indicam que faixas intermediárias de lipofilicidade, associadas a caráter anfifílico, tendem a favorecer a interação com membranas e o acúmulo em compartimentos celulares relevantes (Okunaka et al., 1992; Pucelik et al., 2020), embora a relação entre Log P, ligação a lipossomas e incorporação celular nem sempre seja linear e também depende fortemente das especificidades de cada tipo celular.

Nesse contexto, a análise comparativa dos valores de Log P dos derivados fenotiazínicos estudados fornece subsídios para interpretar seus resultados de interação com modelos biomiméticos (lipossomos) e seu desempenho fotodinâmico em células A549, contribuindo para o entendimento de como modificações estruturais modulam o equilíbrio entre hidrofobicidade, afinidade por membranas e eficácia fotodinâmica.

A determinação experimental do coeficiente de partição (Log P) dos FS foi realizada a partir da comparação entre a absorbância total em meio aquoso e a absorbância remanescente na fase aquosa após o equilíbrio com 1-octanol. Na Figura 11 são apresentados os espectros de absorbância do AM (A) e do C2 (B) antes (curvas tracejadas) e após a partição (curvas contínuas) nas três réplicas analisadas, evidenciando a diminuição da intensidade da banda de absorção principal na fase aquosa após o contato com o solvente orgânico (octanol). Essa redução de absorbância foi utilizada para estimar a fração de FS transferida para a fase orgânica

e, conseqüentemente, calcular os valores de Log P de cada composto. Diante disso, por meio da equação 1, obteve-se os valores de LogP para cada FS (Tabela 3).

Figura 10. Espectros de absorbância da partição aquosa e a absorção total do (A) AM e (B) C2.



Fonte: Autor (2026)

Tabela 3. Valores do coeficiente de partição (Log P) calculados, com $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção. Experimento realizado em triplicata, portanto os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (DP).

[FS]	Log P $\pm$ DP
AM	-1,4 $\pm$ 0,3
C2	-0,7 $\pm$ 0,4

Fonte: Autor (2026)

No presente trabalho, o AM e o C2 apresentaram valores de Log P de $-1,4 \pm 0,3$ e $-0,7 \pm 0,4$ (Tabela 3), respectivamente, indicando caráter globalmente hidrofílico, porém com lipofilicidade moderadamente maior para o derivado C2. Esses resultados se situam na faixa de valores reportados na literatura para o AM, cujo Log P é descrito como $-0,9$ em análise comparativa de fenotiazínicos (Walker et al., 2004b), variando entre $-0,62$ (experimental) e $-0,51$ (cálculo *in silico*) em estudo recente (Pereira et al., 2023), e chegando a aproximadamente $-0,1$ em outro trabalho que empregou metodologia distinta de determinação (Bacellar et al., 2014a) Em conjunto, essa dispersão de valores evidencia que o Log P do AM apresenta sensível dependência das condições experimentais e do método de cálculo utilizados, o que impede a definição de um valor único “exato”. Além disso, a variação relativamente ampla de Log P

reportada para o próprio AM na literatura (Bacellar et al., 2014b; Pereira et al., 2023b; Walker et al., 2004a) bem como a natureza multifatorial da resposta celular à TFD, indicam que a lipofilicidade deve ser entendida como um entre vários parâmetros relevantes (incluindo agregação, carga, localização subcelular e fotostabilidade), e não como um preditor isolado e linear da eficácia fotodinâmica. Tal experimento não houve aplicação do C1, devido a sua alta capacidade de agregação o que impossibilitou a sua solubilidade em água no momento a qual foi efetuado as soluções estoque. Devido a essa capacidade, em alguns ensaios o composto C1 não foi adicionado aos testes, devido a persistência na dificuldade de solubilização nos solventes utilizados em consonância com os valores obtidos de decaimento baixos na foto degradação.

4.3 Ligação dos FS em lipossomos

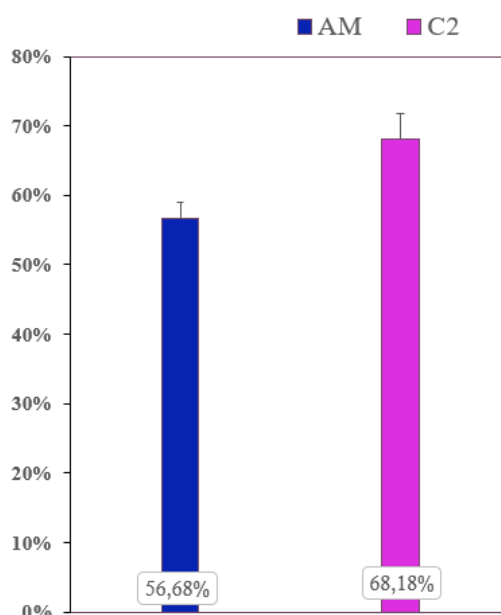
A interação de FS com membranas biológicas é importante para eficiência da terapia fotodinâmica, uma vez que o acúmulo dos FS em lipídios influencia tanto a incorporação celular quanto a localização subcelular e, conseqüentemente, o local onde as espécies reativas de oxigênio serão geradas (Tsubone et al., 2021c; Tsubone; Baptista; Itri, 2019c). Lipossomas formados por fosfolipídios naturais, como a lecitina de soja, são amplamente empregados como modelos biomiméticos de membranas, permitindo quantificar a fração de FS associada à fase lipídica e estimar sua afinidade por ambientes hidrofóbicos relevantes para o contexto biológico (Bacellar et al., 2018). Assim, a determinação da porcentagem de ligação dos derivados fenotiazínicos a lipossomas fornece um indicador experimental da propensão desses compostos a interagir com membranas, complementando os dados de Log P e auxiliando na interpretação de seu desempenho fotodinâmico.

A Figura 12 apresenta a porcentagem média de ligação dos fotossensibilizadores, AM e C2, a lipossomas de lecitina de soja, obtida a partir da diferença entre a absorbância total e a absorbância do sobrenadante após centrifugação. Observa-se que ambos os compostos apresentam elevada afinidade pelos lipossomas, com valores de ligação superiores a 50%, mas o C2 exibe uma fração ligada mais alta ($\approx 68\%$) em comparação ao AM ($\approx 57\%$). Essa diferença é consistente com o maior Log P determinado para o C2 ($-0,7 \pm 0,4$) em relação ao AM ($-1,4 \pm 0,3$), sugerindo que o aumento moderado de lipofilicidade favorece a partição em lipídios do modelo de membrana.

Esses resultados indicam que pequenas modificações estruturais no núcleo fenotiazínico são capazes de modular de forma significativa a interação com membranas, o que é relevante

para a TFD, pois FS mais associados à fase lipídica tendem a localizar-se nas proximidades de bicamadas celulares, onde a peroxidação de lipídios e o dano a proteínas de membrana desempenham papel central na indução de morte celular.

Figura 11. Valores de porcentagem de ligação dos FS, AM e C2, em lipossomos de lecitina de soja.



Fonte: Autor (2026)

4.4 Interação dos FSs com proteína (BSA)

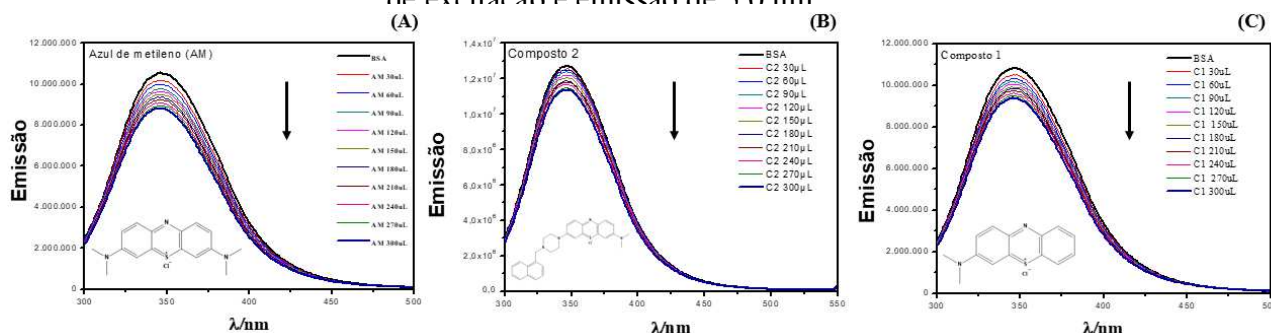
A albumina sérica bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) foi empregada como modelo de proteína globular para investigar a capacidade dos FS de interagir com proteínas em meio aquoso, independentemente de seu papel em transporte sérico. Proteínas como a BSA apresentam domínios hidrofóbicos e sítios de ligação bem caracterizados, o que as torna sistemas convenientes para avaliar afinidade, modo de ligação e possíveis alterações conformacionais induzidas por pequenas moléculas (De Lavor et al., 2024). A determinação das constantes de ligação entre os derivados fenotiazínicos e a BSA fornece, assim, um parâmetro experimental da propensão desses FS a se associar a proteínas, o que é relevante para antecipar potenciais alvos intracelulares e entender como a proximidade com estruturas proteicas pode modular o dano fotooxidativo gerado durante a TFD.

Albuminas emitem fluorescência devido à presença de três aminoácidos com grupos fluoróforos intrínsecos: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Contudo, a maior parte do sinal fluorescente observado provém de Trp e Tyr, uma vez que a Phe apresenta rendimento quântico de fluorescência muito reduzido (Lakowicz, 2006). Ainda nesse sentido,

quando ocorre uma ligação de alguma molécula na BSA gera alterações conformacionais, afetando a intensidade da fluorescência dessas albuminas (Bertucci; Domenici, 2002; De Lavor et al., 2024).

Portanto, para analisar a ligação dos FS nas proteínas de albumina do soro bovino, registrou-se os espectros de fluorescência da BSA (Figura 13), em paralelo com medidas de absorbâncias, sob adições sucessivas de FS.

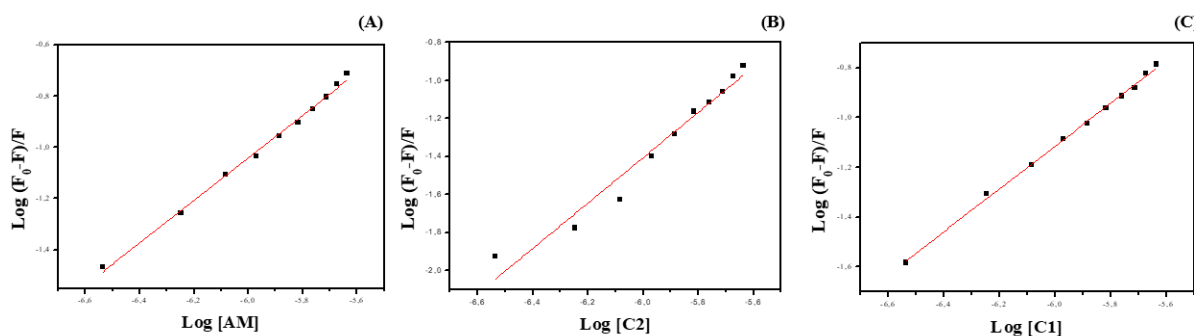
Figura 12. Espectros de fluorescência da BSA (3,0 μM) em presença de diferentes concentrações do (A) AM, (B) C2 e (C) C1, em tampão Tris (pH 7,4), $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, fendas de excitação e emissão de 5 $\text{\AA}$



Fonte: Autor (2026)

O espectro de fluorescência da BSA tem como pico de absorção no comprimento de onda máximo em torno de 340 nm que diminui a intensidade dessa emissão devido ao aumento da concentração das fenotiazinas (Figura 13), diminuição essa ocasionada por mudanças na conformação dessa proteína que ocorrem quando esses compostos interagem com parte hidrofóbica (Moreira et al., 2015). Diante disso, com os dados dos espectros de emissão foi possível calcular a constante de ligação (K_b) dos FS em BSA (Figura 14). Ademais, pela equação 4 também se obteve o número de sítios de ligação (n). Dessa forma, plotou-se os gráficos $\log[(F_0/F)/F]$ que estão descritos na Figura 14 em função do logaritmo da concentração dos FS com BSA. Os valores da constante de Ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) obtidos encontram-se na Tabela 4.

Figura 13. Gráfico de $\log[(F_0/F)/F]$ em função de $\log [\text{FS}]$ com BSA (3 μM) em tampão Tris 10mM, pH 7,4.



Fonte: Autor (2026)

Tabela 4. Constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) dos FS em BSA.

FS	$K_b (M^{-1})$	n	R^2
AM	$8,80 \times 10^3$	0,83	0,994
C1	$1,12 \times 10^4$	0,86	0,997
C2	$5,79 \times 10^5$	1,19	0,958

Fonte: Autor (2026)

A Tabela 4 apresenta as constantes de ligação (K_b) e os expoentes n obtidos para a interação dos FS com BSA. Para os três compostos, os valores de n situam-se próximos de 1, o que é consistente com um modelo de ligação predominante em um sítio equivalentes na proteína na proporção (1:1) (Moreira et al., 2015; Neto et al., 2020). As constantes de ligação encontram-se na faixa de 10^3 – 10^5 M^{-1} (Tabela 4), valores compatíveis com interações de afinidade moderada descritas para outros FS e pequenas moléculas com albumina (Lazniewska et al., 2021; Milutinović et al., 2017).

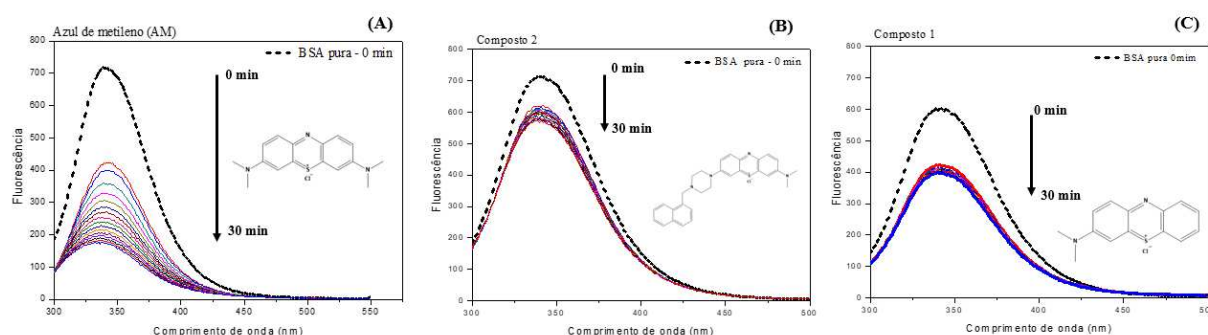
Observa-se uma clara tendência de aumento da afinidade na ordem $AM < C1 \ll C2$, indicando que a modificação estrutural introduzida em C2 favorece de forma marcada a associação com domínios proteicos da BSA. Considerando que estes ensaios foram concebidos como modelo simplificado de proteínas intracelulares, os resultados sugerem que o C2 possui maior propensão a interagir com proteínas, o que, em contexto de TFD, pode ampliar a probabilidade de dano oxidativo dirigido a alvos proteicos quando o FS é ativado pela luz. Já o AM, com K_b em torno de 10^3 M^{-1} , mostra interação detectável, porém menos intensa, compatível com uma associação mais fraca ou menos frequente com esses sítios de proteína.

Em conjunto com os dados de Log P e de ligação a lipossomas, a ordem crescente de K_b ($AM < C1 < C2$) reforça a ideia de que o aumento moderado de caráter lipofílico e anfifílico favorece não apenas a interação com fases lipídicas, mas também com superfícies proteicas, embora a relação entre lipofilicidade e afinidade por BSA não deva ser interpretada como estritamente linear, dado o papel das características específicas de cada derivado (carga, distribuição de grupos aromáticos, possibilidade de interações eletrostáticas e π – π).

4.5 Foto-oxidação da proteína (BSA) causada pelos FS

A fotooxidação de proteínas é um dos desfechos relevantes da terapia fotodinâmica, podendo levar à perda de função enzimática, alterações conformacionais e sinalização pró-morte celular. A albumina sérica bovina (BSA), que contém resíduos de triptofano fortemente fluorescentes, é frequentemente utilizada como modelo para monitorar dano oxidativo a proteínas por meio da diminuição da fluorescência intrínseca do Trp, a qual reflete preferencialmente modificações químicas ou microambientais na vizinhança desses resíduos (Kazutaka Hirakawa¹, 2012; Silvester; Timmins; Davies, 1998a) Nesse contexto, a avaliação da cinética de apagamento da fluorescência de triptofano em presença dos FS permite comparar, de forma indireta, a capacidade relativa de cada derivado em promover foto-oxidação em domínios proteicos específicos (Li et al., 2017; Reid et al., 2016; Silvester et al., 1998).

Figura 14. Espectro de fluorescência da BSA (3,0 μ M) na presença de (A) AM (15 μ M) (B) C2 (15 μ M) e (C) C1 (15 μ M) em solução tampão Tris (pH = 7,4) a 25°C, sob irradiação LED vermelho, $\lambda_{\text{máx}} = 633$ nm, potência 6,98 mW/cm² à 7,0 cm de distância da amostra.

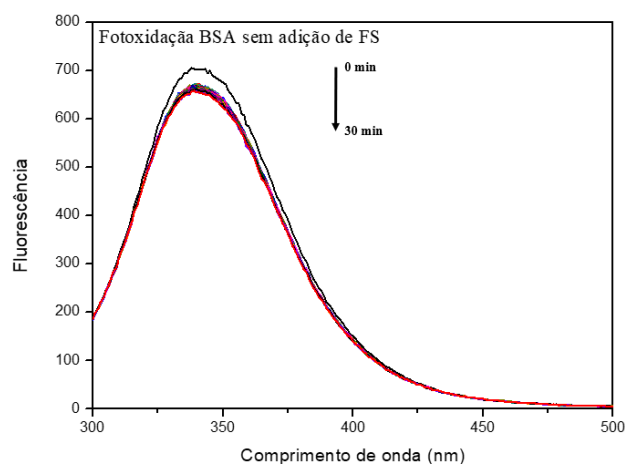


Fonte: Autor (2026)

Os espectros de fluorescência da BSA ao longo da irradiação na presença dos diferentes fotossensibilizadores mostram perfis distintos de decaimento do sinal de triptofano. Para o AM (Figura 14A), observa-se uma redução acentuada e progressiva da intensidade de fluorescência ao longo de 30 minutos, indicando que esse derivado é particularmente eficiente em promover modificações fotoquímicas na vizinhança dos resíduos de Trp da BSA. Já para o C2 (Figura 14B), o decréscimo de fluorescência é mais discreto, sugerindo uma taxa menor de fotooxidação diretamente detectável nesse cromóforo. O derivado C1 (Figura 14C) praticamente não altera a fluorescência do triptofano nas condições avaliadas, o que aponta para uma capacidade reduzida de oxidar esses sítios específicos da proteína.

Vale salientar que a irradiação da BSA na ausência de fotossensibilizador (controle, Figura 15) resultou em apenas uma ligeira diminuição da fluorescência do triptofano ao longo de 30 minutos, sem alterações significativas no perfil espectral. Esse comportamento confirma que, nas condições de LED vermelho utilizadas, a proteína isolada não sofre fotooxidação significativa, de modo que a queda acentuada de fluorescência observada na presença de AM, e em menor grau com C2, pode ser atribuída predominantemente à ação fotodinâmica mediada pelos FS, e não a um efeito direto da luz sobre a BSA.

Figura 15. Espectro de fluorescência da BSA (3,0 μM) na ausência dos FS em solução tampão Tris (pH = 7,4) a 25°C, sob irradiação LED vermelho, $\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, potência 6,98 mW/cm^2 à 7,0 cm de distância da amostra.



Fonte: Autor (2026)

Esses resultados são coerentes com o fato de que o ensaio monitora apenas alterações ligadas ao triptofano e ao seu microambiente: fotooxidação em outros resíduos ou regiões da BSA pode não ser captada por essa abordagem, de modo que a ausência de apagamento intenso não exclui completamente dano em outras porções da proteína (Reid et al., 2016),

Ainda assim, a comparação relativa indica que, entre os compostos estudados, o AM se destaca por uma maior reatividade dirigida a Trp, enquanto o C2, apesar de apresentar maior constante de ligação à BSA, induz um apagamento menos pronunciado, o que sugere que afinidade de ligação e eficiência de fotooxidação em um dado resíduo não são necessariamente proporcionais. Essa dissociação entre K_b e taxa aparente de fotooxidação reforça a natureza multifatorial das interações fotodinâmicas com proteínas, envolvendo não só quanto o FS se liga, mas também onde se liga, qual o tipo de espécie reativa predominante (tipo I/tipo II) e quão acessíveis são os resíduos alvo dentro da estrutura proteica.

4.6 Taxa de incorporação dos FSs em células A549

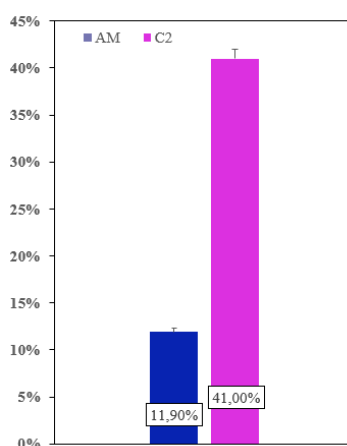
A incorporação de FS por células tumorais é um dos fatores centrais da eficácia da TFD, pois condiciona a quantidade de molécula disponível para gerar espécies reativas de oxigênio em alvos intracelulares (Pucelik et al., 2020). Fatores como lipofilicidade, carga, tendência à agregação e afinidade por membranas influenciam diretamente o padrão de captação e a distribuição subcelular dos FS, modulando o local e a extensão do dano fotooxidativo (Ben-Dror et al., 2006b; Ezzeddine et al., 2013; Pucelik et al., 2020). Assim, a quantificação da fração de FS internalizada por células A549 fornece um elo importante entre as propriedades físico-químicas dos derivados fenotiazínicos estudados (Log P, ligação a lipossomas) e sua resposta fotodinâmica observada nos ensaios de viabilidade celular.

A Figura 13 mostra a porcentagem de incorporação dos fotossensibilizadores AM e C2 em células A549, determinada a partir da redução da absorbância no sobrenadante após incubação por 24 h.

Observa-se que o AM apresenta incorporação relativamente baixa, em torno de 12%, enquanto o C2 atinge aproximadamente 41% de captação, indicando que o derivado é internalizado em proporção cerca de três vezes maior que o composto de referência, nas mesmas condições experimentais. Esse comportamento é coerente com o maior Log P do C2 ($-0,7 \pm 0,4$) em comparação ao AM ($-1,4 \pm 0,3$) e com a maior porcentagem de ligação do derivado a lipossomas, sugerindo que o aumento moderado de lipofilicidade favorece tanto a interação com membranas quanto a entrada na célula.

Embora esses dados indiquem uma tendência de associação entre propriedades anfífilas e captação em A549, a ausência de correlação perfeita entre esses parâmetros reforçam que a incorporação celular resulta de um conjunto de fatores estruturais e ambientais. Dessa forma, é necessário cautela ao avaliar se o aumento de internalização do C2 se traduz, de fato, em maior eficiência terapêutica nas condições deste estudo.

Figura 16. Valores de porcentagem de incorporação dos FS (4 μ M), AM e C2, incubados por 24 h em células A549.



Fonte: Autor (2026)

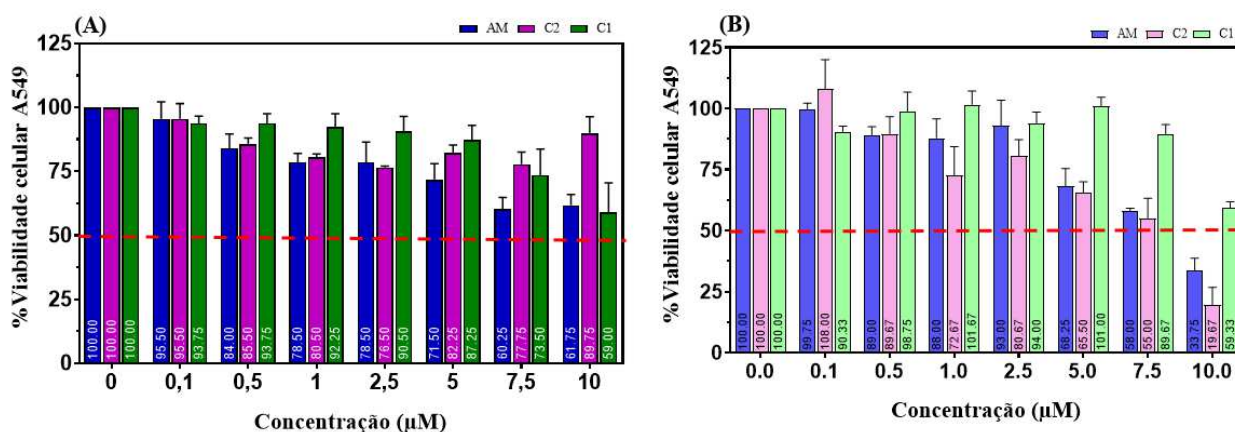
4.7 Fototoxicidade dos compostos em células A549

A avaliação da viabilidade celular após o tratamento com fotossensibilizadores é etapa essencial para determinar tanto a citotoxicidade intrínseca dos compostos (no escuro) quanto seu potencial fotodinâmico, isto é, a capacidade de induzir morte celular de forma dependente de luz.

Com o objetivo de analisar a fototoxicidade dos compostos derivados do azul de metileno (AM, C2 e C1) em células de câncer de pulmão A549, foi empregado a metodologia que utiliza o MTT. O ensaio foi realizado na ausência e presença de luz, sendo a irradiação feita por um LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$) com concentrações variando de 0 a $10 \mu\text{M}$ (Figura 14).

Na ausência de irradiação (Figura 14A), todos os FS apresentaram baixa citotoxicidade em A549 na faixa de 0,1 a $7,5 \mu\text{M}$, com viabilidade celular geralmente acima de 75% para todos os compostos. Após a irradiação nas mesmas concentrações, observou-se redução concentração-dependente da viabilidade celular (Figura 14B), com diferenças marcantes entre os derivados. O AM e C2 mostrara queda progressiva de viabilidade, cruzando a linha de 50% em torno de $7,5 \mu\text{M}$, enquanto o derivado C1 apresentou efeito fotodinâmico mais modesto, mantendo viabilidade acima de 50% mesmo na maior concentração utilizada de $10 \mu\text{M}$ (Figura 14B), o que indica menor capacidade de induzir morte celular sob as condições de luz empregadas.

Figura 17. Gráficos de % viabilidade celular *versus* concentração do FS (μM), dos compostos AM, C2 e C1, (A) na ausência de luz e (B) irradiado com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).



Com isso, os resultados organizados dos valores de IC_{50} (concentração a qual se inibi 50% da viabilidade celular) estão na Tabela 5. Ainda nesse sentido, os dados de IC_{50} puderam ser melhor analisados pela tabela em conjunto com o seu índice fototóxico.

Tabela 5. Valores de IC_{50} (μM) dos compostos AM e Composto 2 em células A549, na ausência e na presença de irradiação com LED vermelho ($\lambda_{m\acute{a}x} = 633 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 5 \text{ J/cm}^2$).

FS	$IC_{50} (\mu M) \pm DP$		Índice fototóxico
	Escuro	Irradiado	
AM	> 10	$8,1 \pm 0,2$	> 1,2*
C1	> 10	> 10	---
C2	> 10	$7,7 \pm 0,4$	> 1,3*

*Esses são valores aproximados considerando IC_{50} (escuro) = $10 \mu M$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os IC_{50} em condição irradiada para AM e C2 são muito próximos (ambos em torno de $8 \mu M$), sugerindo que, apesar de diferenças em Log P, ligação a lipossomas e incorporação, os dois compostos alcançam fototoxicidade semelhante em A549 nas condições de luz utilizadas. Já o derivado C1 apresenta IC_{50} irradiado maior, indicando menor potência fotodinâmica, o que é coerente com o comportamento mais hidrofílico e a menor interação com lipídios observado para esse composto. Por outro lado, a maior estabilidade espectral do C1 sugere menor reatividade fotoquímica, o que pode explicar sua baixa eficiência fotodinâmica observada neste ensaio.

O fato de todos os fotossensibilizadores exibirem IC_{50} no escuro superiores a $10 \mu M$ mostra que a citotoxicidade intrínseca é baixa na faixa de concentrações de interesse, com um índice de seletividade luz/escuro adequado para aplicação em TFD.

5. CONCLUSÃO

O trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência biológica e química de derivados do azul de metileno (AM), composto 1 (C1) e composto 2 (C2), a fim de serem usados na terapia fotodinâmica para tratamentos no câncer de pulmão da linhagem A549.

Dessa forma, a investigação começou analisando aspectos básicos quanto a sua capacidade de fotodegradação. Os dados construídos mostraram que o azul de metileno apresentou maior taxa de decaimento da absorbância, logo uma capacidade fotodegradativa considerável observada na figura 9A, com picos de absorbâncias decaindo degradativamente, o que denota uma elevada eficiência fotodinâmica, porém para o derivado C2, que também apresentou redução progressiva, contudo com caráter intermediário como observado na figura 9B. Destoando, o composto C1 apresentou baixa progressão, sendo assim menor variação de absorbância ao longo do tempo, sugerindo elevada resistência à fotodegradação comparado ao AM e C2 como pode ser observado na figura 10. Tais resultados evidenciaram como modificações estruturais influenciam na eficiência fotodinâmica.

Seguindo para o início da investigação quanto ao caráter dessas espécies químicas, observou-se valores de LogP de $-1,4 \pm 0,3$ e $-0,7 \pm 0,4$ para o AM e C2 respectivamente, sugerindo caráter hidrofílico para ambos, entretanto com uma moderada lipofilicidade para o derivado C2, resultados coerentes para essa molécula, observando um padrão nos demais ensaios que analisaram a lipofilicidade com valores de 68% comparado ao AM ($\approx 57\%$) no ensaio de interação com lipossomas, além disso apresentou aproximadamente 41% de incorporação celular, logo uma maior lipofilicidade favorece uma melhor interação com lipídios.

A interação com a proteínas mostrou que o houve uma escala crescente entre os FS, sendo ela $AM > C2 > C1$, o que denota uma maior eficiência em promover modificações fotoquímicas na vizinhança dos resíduos de Trp da BSA para o AM. Ademais, pelo espectro controle feito contendo somente a BSA pôde se comprovar que a foto-oxidação observada na figura 14A, B e C, realmente foram dos compostos analisados. Não obstante, o ensaio quanto a interação e ligação com a proteína mostrou resultados da constante de ligação para ambos os compostos se encontram em valores compatíveis de faixa para uma ligação moderada (10^3 – 10^5 M⁻¹) com proporção de ligação 1:1. Resultados esses, corroboram com a perspectiva a qual mudanças na estrutura favorecem a associação com domínios proteicos da BSA, uma vez que o C2 apresentou maior constante de ligação de maior ordem comparado às demais moléculas.

Seguindo para o último ensaio, a sua viabilidade celular apresentou resultados de IC_{50} de 8,1 μM para o AM e 7,7 μM para o C2, valores próximos para o C2 em comparação ao AM, em contra partida ao C1 apresentou valores maiores que 10 μM .

Por fim, a investigação contribuiu de forma clara para a avaliação de um dos componentes da TDF, os FS, a qual reside no potencial fotodinâmico de tais moléculas e na sua interação com biomoléculas. Os resultados se mantiveram coerentes quanto ao caráter molecular, já sendo predito pelas estruturas moleculares dos compostos, indicando que pequenas modificações estruturais feitas no C2, geraram impactos significativos na interação com lipídeos e proteínas, mantendo a fototoxicidade próxima com o do AM, fotosensibilizador já aplicado comercialmente.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Lung Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/what-is.html>>. Acesso em: 1 mar. 2026.

BACELLAR, Isabel O. L. *et al.* Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 4, p. 801–813, 1 jul. 2014a.

BACELLAR, Isabel O. L. *et al.* 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.

BACELLAR, Isabel O. L.; BAPTISTA, Mauricio S. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. **ACS Omega**, v. 4, n. 26, p. 21636–21646, 24 dez. 2019.

BEN-DROR, Shimshon *et al.* On the Correlation Between Hydrophobicity, Liposome Binding and Cellular Uptake of Porphyrin Sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 3, p. 695–701, 1 maio 2006a.

BENOV, Ludmil. Photodynamic therapy: current status and future directions. **Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre**, v. 24 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 14–28, 23 abr. 2015.

BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993.

BERTUCCI, Carlo; DOMENICI, Enrico. Reversible and Covalent Binding of Drugs to Human Serum Albumin: Methodological Approaches and Physiological Relevance. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1463–1482, 2002.

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.

CAI, Yeyu *et al.* Phototherapy in cancer treatment: strategies and challenges. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2025 10:1, v. 10, n. 1, p. 115–, 2 abr. 2025.

CORREIA, José H. *et al.* Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics** 2021, Vol. 13, v. 13, n. 9, 24 ago. 2021.

CROUS, Anine; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 932098, 30 ago. 2022

DE LAVOR, Tayná Saraiva *et al.* The impact of biomolecule interactions on the cytotoxic effects of rhenium(I) tricarbonyl complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 257, p. 112600, 1 ago. 2024.

DE MELO GOMES, Laura Calazans *et al.* Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 22, n. 6, p. 1341–1356, 1 jun. 2023.

DIAZ-JIMÉNEZ, J. P. *et al.* Efficacy and safety of photodynamic therapy versus Nd-YAG laser resection in NSCLC with airway obstruction. **The European respiratory journal**, v. 14, n. 4, p. 800–805, 1999.

EZZEDDINE, Rima *et al.* Effect of Molecular Characteristics on Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Phototoxicity of Zn(II) N-Alkylpyridylporphyrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36579–36588, 20 dez. 2013.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Alonzo *et al.* Recent Advances in the Medicinal Chemistry of Phenothiazines, New Anticancer and Antiprotozoal Agents. **Current medicinal chemistry**, v. 28, n. 38, p. 7910–7936, 6 abr. 2021.

IŞIK, Mehtap *et al.* Octanol–water partition coefficient measurements for the SAMPL6 blind prediction challenge. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 34, n. 4, p. 405–420, 1 abr. 2020.

KAZUTAKA HIRAKAWA^{1, 2,*} and Shiori Inoue². Analysis of protein damage based on the fluorometry of tryptophan residue. **Current Topics in Analytical Chemistry**, v. 9, p. 57–61, 2012.

KHAN, Idrees *et al.* **Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. Water (Switzerland)**MDPI, , 1 jan. 2022.

KIMURA, Masakazu *et al.* Photodynamic Therapy (PDT) with Chemotherapy for Advanced Lung Cancer with Airway Stenosis. **International Journal of Molecular Sciences** 2015, Vol. 16, Pages 25466-25475, v. 16, n. 10, p. 25466–25475, 22 out. 2015.

KLOSOWSKI, Eduardo Makiyama *et al.* The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 153, p. 34–53, 1 jun. 2020a. .

LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, p. 1–954, 2006.

LAVOR, Tayná Saraiva de; [HTTP://LATTES.CNPQ.BR/0857468824439138](http://LATTES.CNPQ.BR/0857468824439138). Influência da interação de complexos tricarbonilrênio(II) com biomoléculas nos efeitos citotóxicos em células tumorais. 30 jan. 2023.

LAZNIEWSKA, Joanna *et al.* Spectroscopic and Molecular Docking Study of the Interaction between Neutral Re(II) Tetrazolate Complexes and Bovine Serum Albumin. **Chemistry - A European Journal**, v. 27, n. 44, p. 11406–11417, 5 ago. 2021.

LI, Li *et al.* Interaction and oxidative damage of DVDMS to BSA: a study on the mechanism of photodynamic therapy-induced cell death. **Scientific Reports** 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 43324–, 2 mar. 2017.

LIM, Eun Jin *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, n. 2, p. 856–862, 1 ago. 2013.

LUIZ, Washington *et al.* Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. 2019.

MAGALHAES DOS SANTOS, ALINE. ATIVIDADE FOTODINÂMICA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CLORINA E6 E AZUL DE METILENO ASSOCIADOS A NANOPARTÍCULAS DE OURO SINTETIZADAS POR ABLAÇÃO A LASER. **PUC RIO**, 3 maio 2018.

MAYO CLINIC. **Câncer de pulmão - Diagnóstico e tratamento - Clínica Mayo**. Disponível em: <https://www-mayoclinic-org.translate.goog/diseases-conditions/lung-cancer/diagnosis-treatment/drc-20374627?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc>. Acesso em: 1 mar. 2026.

MILUTINOVIĆ, Milan M. *et al.* New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 169, p. 1–12, 1 abr. 2017.

MOGHISSI, Keyvan *et al.* The place of bronchoscopic photodynamic therapy in advanced unresectable lung cancer: experience of 100 cases. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 1999.

MOREIRA, Leonardo M. *et al.* Phenotiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms. **Advanced Aspects of Spectroscopy**, 29 ago. 2012.

MOREIRA, Mariete B. *et al.* Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 1 fev. 2015.

MYRZAKHMETOV, Bauyrzhan *et al.* Lipophilicity prediction of three photosensitizers by liquid–liquid extraction, HPLC, and DFT methods. **Luminescence**, v. 37, n. 9, p. 1597–1608, 1 set. 2022.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Phenothiazine** | C₁₂H₉NS | CID 7108 - PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenothiazine>>. Acesso em: 1 mar. 2026.

NETO, Guilherme Luiz B. *et al.* 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.

OKUNAKA, Tetsuya *et al.* Correlation between photodynamic efficacy of differing porphyrins and membrane partitioning behavior. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 98–103, 1 jan. 1992.

OVERCHUK, Marta *et al.* Photodynamic therapy simultaneously induces ferroptosis- and apoptosis-like lipid signatures in ovarian cancer cells. **Cell Death & Disease** **2025 16:1**, v. 16, n. 1, p. 899-, 10 dez. 2025.

PAUL, Bijan Kumar; GUCHHAIT, Nikhil. Differential interactions of a biological photosensitizer with liposome membranes having varying surface charges. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 661–673, 2012.

PEREIRA, Luiz Miguel *et al.* The potential of phenothiazinium dyes as cytotoxicity markers in cisplatin-treated cells. **Scientific Reports** **2023 13:1**, v. 13, n. 1, p. 10203-, 23 jun. 2023a.

PUCELIK, Barbara *et al.* Enhanced Cellular Uptake and Photodynamic Effect with Amphiphilic Fluorinated Porphyrins: The Role of Sulfoester Groups and the Nature of Reactive Oxygen Species. **International Journal of Molecular Sciences** **2020, Vol. 21**, v. 21, n. 8, 15 abr. 2020a.

REID, Lara O. *et al.* Photooxidation of Tryptophan and Tyrosine Residues in Human Serum Albumin Sensitized by Pterin: A Model for Globular Protein Photodamage in Skin. **Biochemistry**, v. 55, n. 34, p. 4777–4786, 30 ago. 2016.

REZENDE, Laura G. *et al.* Assessing Photosensitized Membrane Damage: Available Tools and Comprehensive Mechanisms†. **Photochemistry and Photobiology**, v. 98, n. 3, p. 572–590, 1 maio 2022.

SAENZ, Courtney *et al.* Charged groups on pyropheophorbide-based photosensitizers dictate uptake by tumor cells and photodynamic therapy efficacy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 227, 1 fev. 2022.

SANTOS, Ancély Ferreira dos. Estudo das vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica em células de tumores mamários humanos. 1 jul. 2016.

SILVESTER, Julie A.; TIMMINS, Graham S.; DAVIES, Michael J. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: Evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 5, p. 754–766, 15 mar. 1998a.

TALDAEV, Amir *et al.* Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1264961, 28 set. 2023.

TOREZAN, Luís *et al.* **Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações * Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use** EDUCAÇÃO MÉDICA CONTINUADA *An Bras Dermatol.* n. 84 p. 445 a 459, 2009.

TSUBONE, Tayana Mazin *et al.* Contrasting roles of oxidized lipids in modulating membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1861, n. 3, p. 660–669, 1 mar. 2019.

TSUBONE, Tayana Mazin *et al.* Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 697, p. 108665, 15 jan. 2021a.

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

USUDA, J. *et al.* Photodynamic therapy using Laserphyrin for centrally located early stage lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18_suppl, p. 7229–7229, 20 jun. 2006.

VIOLA, Giampietro; DALL'ACQUA, Francesco. **Photosensitization of Biomolecules by Phenothiazine Derivatives** *Current Drug Targets*. [S.l.: S.n.].

WAINWRIGHT, Mark. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 263–272, 1 dez. 2005.

WAINWRIGHT, Mark *et al.* Phenothiazinium photosensitisers, Part VI: Photobactericidal asymmetric derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 82, n. 3, p. 387–391, set. 2009.

WALKER, Ian *et al.* A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. **Photochemical & Photobiological Sciences** **2004 3:7**, v. 3, n. 7, p. 653–659, 29 abr. 2004a.

ZHOU, Jialin *et al.* Global burden of lung cancer in 2022 and projections to 2050: Incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. **Cancer Epidemiology**, v. 93, 1 dez. 2024.

ZOU, Xuewei; XIE, Bai. Therapeutic Mechanisms of Phenothiazine Drugs: A Mini-Review of Advances in Cancer Treatment and Antibiotic Resistance. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 24, n. 1, 31 dez. 2025.