



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**Estudo das características espectroscópicas da tetracarboxi-
porfirina e seu grau de interação com bicamada lipídica**

Jéssica Gonçalves Braga

Uberlândia-MG

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**Estudo das características espectroscópicas da tetracarboxi-
porfirina e sua capacidade de interagir com membrana
mimética**

Jéssica Gonçalves Braga

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Química,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de bacharel em
química pela Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientação: Profa. Dra. Tayana Mazin
Tsubone

Uberlândia

2022

Estudo das características espectroscópicas da tetracarboxi-porfirina e seu grau de interação com bicamada lipídica

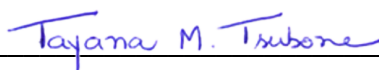
Jessica Gonçalves Braga

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de bacharel em química pela Universidade Federal de Uberlândia.

Orientação: Profa. Dra. Tayana Mazin Tsubone

Uberlândia -MG, 10 de Agosto de 2022

Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Tayana Mazin Tsubone

Prof^a. Dr^a. Sidnei Gonçalves da Silva

Prof^a. Dr^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a mim mesma por sempre acreditar, e independente de qualquer desafio nunca desistir. Em segundo lugar sou grata à minha família por dar credibilidade aos meus sonhos e apostarem em mim! Em terceiro lugar, tenho gratidão a Deus, pois a minha fé me ajudou a chegar até aqui! Em quarto lugar, gratifico a professora orientadora Dra. Tayana Mazin Tsubone por me oportunizar com a Iniciação Científica, e sempre ter paciência e persistir por mim até aqui e juntamente a ela agradeço a FAPEMIG Projeto Universal APQ-00704-21 pelo apoio financeiro à pesquisa, e ao CNPq pela bolsa PIBIC com vigência de 01/08/2020 à 31/07/2021". Por último e não menos importante, aprecio a ajuda e apoio de colegas da faculdade, tais como, a Patrícia que me ajudou muito na IC, além de outros colegas e também os professores que ajudaram na graduação compartilhando conhecimento. De modo geral, gratidão à tudo e todos que de alguma forma me ajudaram na transformação de quem sou hoje.

Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada por ser uma alternativa no tratamento de câncer e doenças crônicas as quais utilizam tratamentos convencionais, como a quimioterapia e radioterapia, por exemplo. A TFD atua a partir de um fotossensibilizador (FS) que após ser aplicado ao paciente reage somente onde for incidida luz no comprimento de onda adequado afetando um menor número de células saudáveis. FSs possuem diferentes características físico-químicas e são moléculas capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio (EROs) como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras formas radicalares. Compostos porfirínicos têm sido extensamente utilizados em TFD como fotossensibilizadores (FSs) por apresentarem características favoráveis para este tipo de tratamento. Sabe-se que além das propriedades fotoquímicas, a fotoatividade destes compostos depende da sua capacidade de se incorporar em células através das membranas. Dessa forma, pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas dos FS podem alterar os sítios de interação modificando sua ligação em membranas e eficiência em causar morte celular. Nesse projeto estudou-se as propriedades espectroscópicas de da porfirina Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP), tais como a caracterização espectroscópica do FS em diferentes solventes, onde a TCPP apresentou solubilidade em metanol e etanol. Além disso, determinou-se o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da porfirina TCPP. Também realizou-se o estudo de agregação da porfirina em misturas homogêneas água e metanol e estimou-se que a “*Porcentagem Agregacional Crítica – PAC*” ocorre em cerca de 55% água. Avaliou-se a interação da porfirina com membrana mimética, correlacionando suas características moleculares com a eficiência em causar danos em membrana. Ademais, foi verificado o dano em membrana *via* carboxifluoresceína, cujo qual, a TCPP apresentou valores negativos de porcentagem. Realizou-se o experimento para avaliar se TCPP é estável ou se degrada frente à exposição da luz, e não foi observada uma diminuição significativa da absorbância em função do tempo de irradiação, indicando que este composto é foto-estável nas condições experimentais analisadas.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica (TFD), Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP), absorbância, membrana mimética.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) has been studied as an alternative in the treatment of cancer and chronic diseases that use conventional treatments, such as therapy and radiotherapy, for example. PDT works from a photosensitizer (FS) that, after being applied to the patient, reacts only where the light is incident at an adjustable wavelength, applying a smaller number of special cells. FSs have different physicochemical characteristics and are molecules capable of interacting with light in order to generate highly reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ($^1O_2$) and other radical forms. Porphyrin compounds have been extensively used in PDT as photosensitizers (FSs) because they have favorable characteristics for this type of treatment. It is known that in addition to the photochemical properties, the photoactivity of these compounds depends on their ability to be incorporated into cells through membranes. Thus, small differences in the physicochemical properties of FS can change the sites of interaction, modifying their binding in membranes and efficiency in causing cell death. In this project, the spectroscopic properties of Tetra-(4-carboxy)phenyl porphyrin (TCPP) were studied, such as the spectroscopic characterization of FS in different solvents, where TCPP showed solubility in methanol and ethanol. Furthermore, the molar absorptivity coefficient (ϵ) of TCPP porphyrin was determined. The study of porphyrin aggregation in homogeneous mixtures of water and methanol was also carried out and it was estimated that the "Critical Aggregation Percentage - PAC" occurs in about 55% water. The interaction of porphyrin with membrane mimetic was evaluated, correlating its molecular characteristics with the efficiency in causing membrane damage. In addition, membrane damage was verified via carboxyfluorescein, in which TCPP presented negative percentage values. The experiment was carried out to assess whether TCPP is stable or degrades when exposed to light, and no significant decrease in absorbance was observed as a function of irradiation time, indicating that this compound is photostable under the analyzed experimental conditions.

Keywords: Photodynamic Therapy (PDT), Tetra-(4-carboxy)phenyl porphyrin (TCPP), absorbance, membrane mimetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos processos envolvidos nas reações de fotossensibilização. Fonte: (Savira & Suharsono, 2013).	14
Figura 2. Representação dos diferentes comprimentos de onda. Fonte: (K. T. De Oliveira et al., 2015).	14
Figura 3. Digrama de Jablonski, representação esquemática do processo de absorção até a transferência de energia e a transferência de elétrons. Fonte: (Silva, 2007).	15
Figura 4. Reações e alvos do oxigênio singlete. Fonte: Adaptado (Ronsein et al., 2006).	16
Figura 5. Estrutura geral de uma porfirina. Fonte: (K. T. De Oliveira et al., 2015).	17
Figura 6. Estrutura da porfirina Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP). Fonte: (Clarke et al., 2002).	18
Figura 7. Representa um sistema mimético da membrana, ou seja, a estrutura de um lipossoma, onde: A) representa Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa e na bicamada lipídica; e (B) Corte transversal de lipossoma unilamelar. Fonte: (Chorilli et al., 2004).	19
Figura 8. Representa a estrutura de uma membrana biológica e seus componentes. Fonte: https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-membrana-plasmatica.htm	19
Figura 9. Representação esquemática dos vários tipos de lipossoma, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição. Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela). Fonte: (N C Santos & Castanho, 2002).	20
Figura 10. Espectro de emissão da luz do LED verde sobreposto ao espectro de absorção da TCPP. Fonte: própria autora.	26
Figura 11. Espectro de absorção eletrônica da TCPP nos solventes (metanol, etanol, clorofórmio e DMF) de diferente polaridade. Fonte: própria autora.	28
Figura 12. (A) Espectros de absorção eletrônica da TCPP em etanol em diferentes concentrações. (B) Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração de TCPP, no comprimento de onda máximo da banda Soret (416 nm). Fonte da própria autora.	30

Figura 13. Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração de TCPP, nos comprimentos de onda máximo das bandas Q (512, 548, 587 e 644 nm). Fonte da própria autora.	31
Figura 14. Espectros de absorção da TCPP em diferentes águas/solvente. Fonte: própria autora.	33
Figura 15. Variação do máximo de absorção variando a % água/solvente orgânica para TCPP em dois comprimentos de onda ($\lambda = 416$ e 435 nm). Fonte: própria autora.	33
Figura 16. Espectros de absorbâncias da TCPP no sobrenadante e na fração lipídica ressuspendida. O experimento foi realizado em triplicata. Fonte: própria autora.	35
Figura 17. Espectros de emissão da CF nas amostras sob presença de TCPP e luz em determinados intervalos de tempo. Fonte: própria autora.	36
Figura 18. Variação da intensidade de emissão da CF em função do tempo (minutos) de exposição de lipossomos da TCPP ($15 \mu\text{M}$) em tampão Tris (pH 8,1) na ausência (escuro) ou presença (irradiado) de luz (verde $\lambda_{\text{máx}} = 522\text{nm}$). Fonte: própria autora. ...	37
Figura 19. Porcentagem de dano em membrana em função do tempo (minutos) de exposição de lipossomos aos FSs ($15 \mu\text{M}$) em tampão Tris (pH 8,1) na ausência (escuro) ou presença (irradiado) de luz (verde $\lambda_{\text{máx}} = 522\text{nm}$). Fonte: própria autora. .	38
Figura 20. (A) Espectros de absorção da porfirina TCPP ($35 \mu\text{M}$) da absorbância nos diversos intervalos de tempo de irradiação monitorada. (B) gráfico da absorbância em $\lambda_{\text{máx}}=416\text{nm}$ em função do tempo (minutos). Fonte de irradiação: LED Verde $\lambda_{\text{máx}}=522\text{nm}$, potência $2,26\text{mW}$ posicionado à $0,1\text{cm}$ de distância da amostra. Fonte própria autora.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos volumes de cada solvente adicionado na solução total.....	23
Tabela 2. Valores dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) nos máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) da TCPP em etanol. Fonte: própria autora.	31
Tabela 3. Valores de porcentagem de ligação dos FSs em lipossomos de lecitina de soja. Fonte: própria autora.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(v/v)	Volume/volume
b	Caminho ótico da cubeta (1,0 cm)
c	Concentração do composto.
C _f	Concentração final
CF	Carboxifluoresceína
C _i	Concentração inicial
DMF	N,N-dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
I _{final}	Intensidade após determinado tempo de irradiação em minutos
I _{inicial}	Intensidade de emissão inicial da carboxifluoresceína (CF)
I _t	Intensidade após a adição de 10% (v/v) Triton X-100
LUV	Vesículas unilamelares grandes
Máx	Máximo
MLV	Vesículas multilamelares
Nm	Manômetro
P	Porcentagem
PAC	Porcentagem Agregacional Crítica
r	Permissividade relativa
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
TCP	Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina
TFD	Terapia Fotodinâmica
Tris	Hidroximetilaminometano
V _f	Volume final.
V _i	Volume inicial
ε	Absortividade molar/ constante dielétrica

Sumário

Resumo.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. Introdução.....	13
1.1. Fotossensibilizadores (FSs).....	15
1.2. Porfirina Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP).....	16
1.3. Membranas biológicas.....	18
1.4. Importância da interação fotossensibilizador e membrana.....	20
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. Metodologia.....	22
3.1. Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes.....	22
3.2. Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ).....	22
3.3. Estudo de agregação dos FSs em misturas homogêneas água/etanol.....	23
3.4. Ligação dos FS em vesículas de lipossomos (Lecitina de Soja).....	24
3.5. Avaliação do dano em membrana <i>via</i> carboxifluoresceína.....	25
3.6. Estudo da fotoestabilidade ou fotodegradação dos compostos em metanol <i>via</i> UV-vis.....	26
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1. Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes.....	28
4.2. Determinação do coeficiente de absortividade molar de cada FS.....	29
4.3. Estudo de agregação da TCPP em misturas homogêneas água/etanol.....	32
4.4. Ligação do FS em vesículas de lipossomos (Lecitina de Soja).....	34
4.5. Avaliação do dano em membrana <i>via</i> carboxifluoresceína (CF).....	35
4.6. Estudo da fotoestabilidade ou fotodegradação os compostos em metanol <i>via</i> UV-vis.....	38
5. Conclusão.....	40
6. Referências bibliográficas.....	41

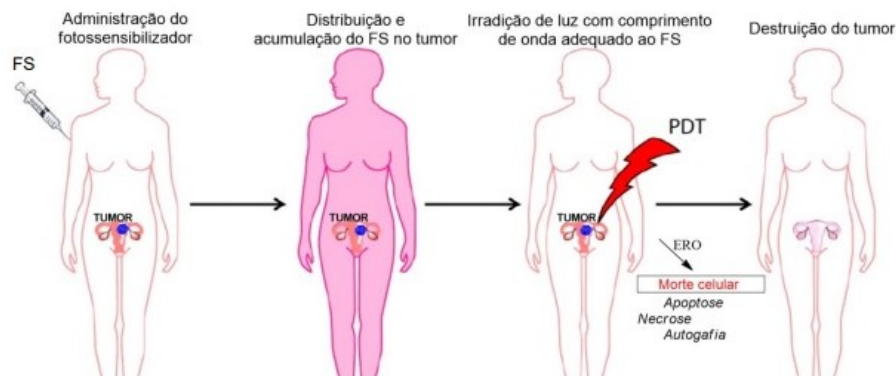
1. Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada por ser uma alternativa no tratamento de câncer e doenças crônicas em que usam a quimioterapia e radioterapia, por exemplo. Diferente dos tratamentos citados, a TFD atua a partir de um fotossensibilizador (FS) que após ser aplicado ao paciente este é sensível a luz, tendo em mente isso, imagina-se que o fármaco vai estar espalhado dentro do corpo, mas só onde tiver luz apropriada incidida ocorrerá reações de fotossensibilização, ou seja, visa por matar o menor número de células saudáveis (MEDICATIONS, 2002). As principais aplicações da TFD são no tratamento de câncer, da miopia patológica, da artrite reumatoide, de micoses e infecções bacterianas. Alguns países como Estados Unidos, França, Holanda, Canadá, e Japão já utilizam essa nova técnica, e a maioria dos seus tratamentos estão voltados as regiões do pulmão, e do esôfago (PERUSSI, 2007).

Sobre as vantagens da TFD vale citar que ela não tem restrição em relação ao aplicações no tecido tumoral, pois o organismo não deixa de produzir sua auto resistência apesar do uso dos medicamentos. Além disso, promove a destruição seletiva do tecido, e por isso causa menores efeitos colaterais. Porém entre os desafios/desvantagens é importante saber que até que o fármaco seja eliminado é necessário se isolar da luz tanto da artificial quanto do natural. Além disso, pode causar edema e algumas vezes obstrução das vias respiratórias causada pelo tumor necrótico, e consequentemente, necessidade de remoção do tecido necrosado, dentro de, no máximo, dois dias após o tratamento (MEDICATIONS, 2002).

De modo resumido, a partir de um corpo que apresenta tecido tumoral é possível aplicar o fotossensibilizador (fármaco sensível a fótons de luz) e ao incidir na região de interesse as células tumorais desse são eliminadas. O esquema a seguir mostra as etapas do procedimento (Figura 1).

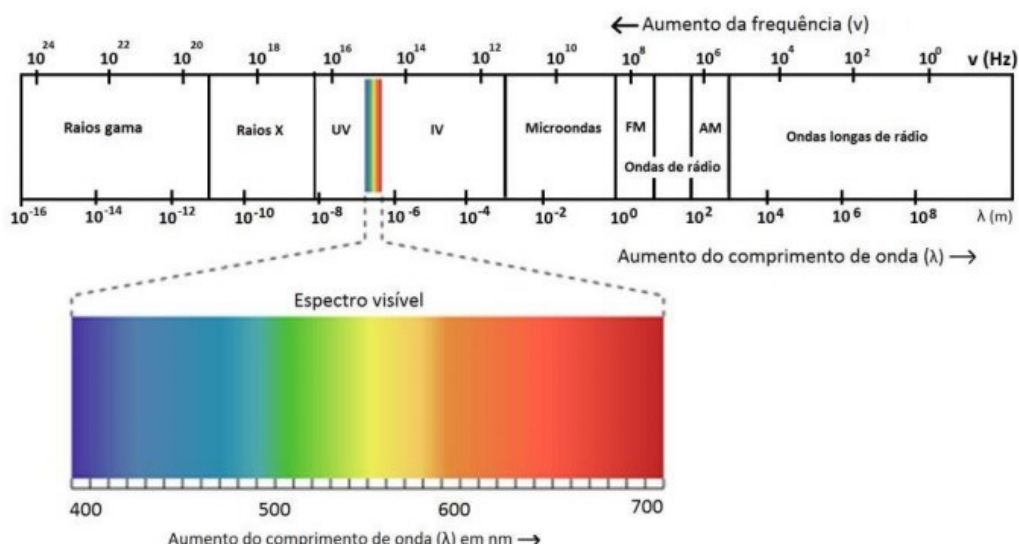
Figura 1. Representação dos processos envolvidos nas reações de fotossensibilização.



Fonte: (SAVIRA & SUHARSONO, 2013).

Sobre a luz é válido saber que ela interage com determinadas matérias, podendo ser chamada de onda eletromagnética. Além disso, é importante entender que dentro de um campo elétrico e/ou magnético existem vibrações e oscilações das ondas, e cada comprimento de onda alcança uma determinada região de interesse (OLIVEIRA, 2015). Abaixo é possível observar os comprimentos e o espectro visível através da (Figura 2).

Figura 2. Representação do espectro eletromagnético dos diferentes comprimentos de onda, onde a luz visível se encontra no intervalo de 400-700nm.

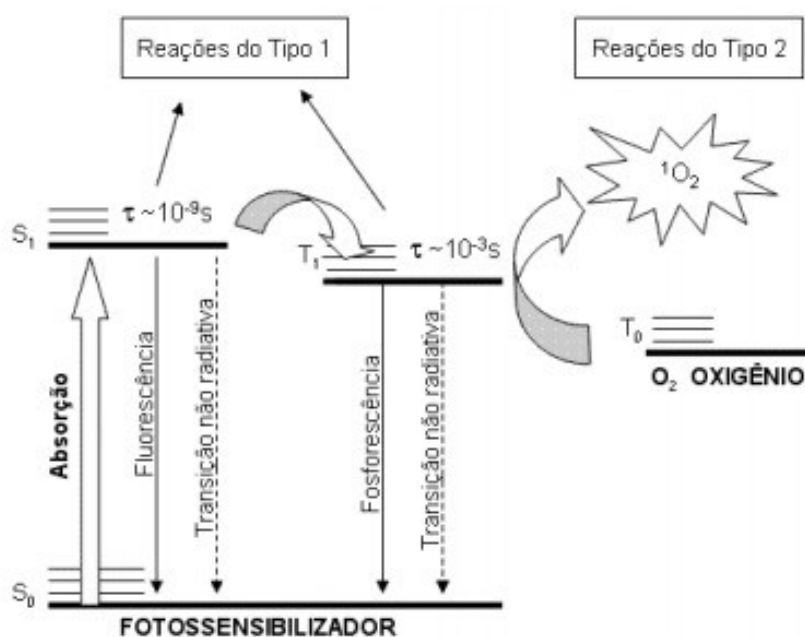


Fonte: (OLIVEIRA, 2015).

1.1. Fotossensibilizadores (FSs)

Fotossensibilizadores são moléculas capazes de reagir com a luz, e quando é exposto à radiação com comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada, permitindo que ocorra transferências de elétrons e/ou transferência de energia, cuja qual etapa permite a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o ânion radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que são extremamente reativos e citotóxicos (Soukos et al., 1998). O Diagrama de Jablonski mostra os processos envolvidos nas reações de fotossensibilização, em que inicialmente o FS ao receber luz absorve energia. Em seguida, acontece a emissão de luz via fluorescência e/ou conversão intersistema do FS no estado excitado singlete formando FS no estado excitado tripleto. Também pode ocorrer a fosforescência que é a emissão de luz a partir do estado excitado do FS no estado tripleto. Finalmente o estado excitado tripleto do FS induz a geração de espécies reativas de oxigênio por dois mecanismos: (i) transferência de energia, ou (ii) transferência de elétrons (SILVA, 2007). O Diagrama de Jablonski está representado a seguir pela Figura 3.

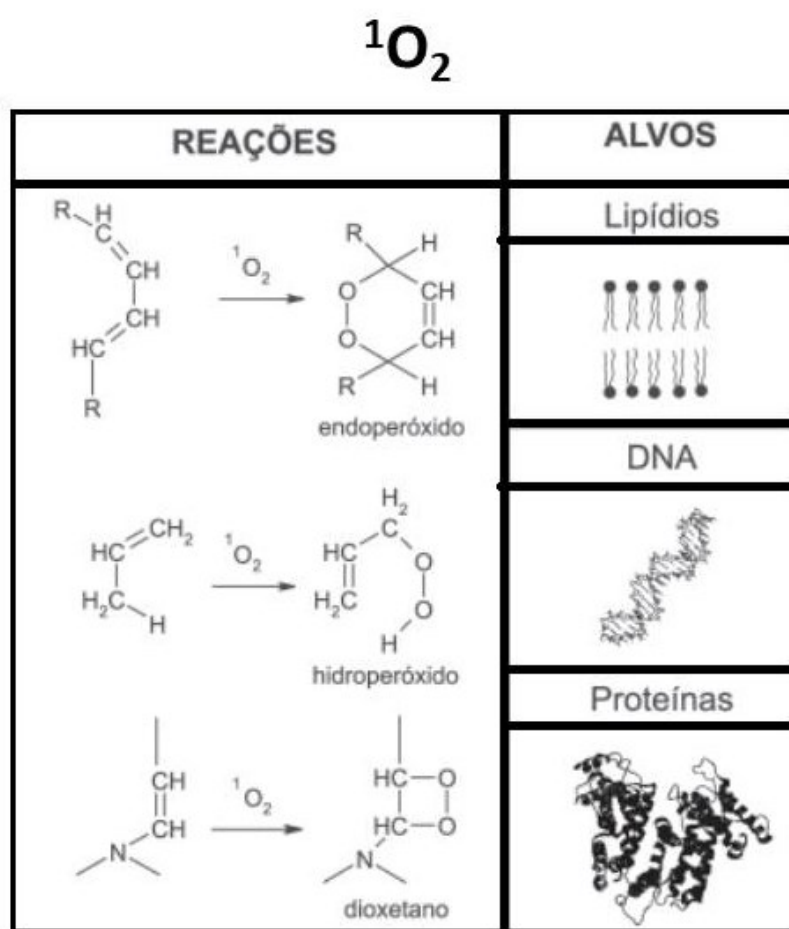
Figura 3. Diagrama de Jablonski, representação esquemática do processo de absorção até a transferência de energia e a transferência de elétrons.



Fonte: (SILVA, 2007).

Um fotossensibilizador adequado deve possuir no seu estado excitado um tempo de vida de longa duração, podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio (JORI, 2006). Espécies reativas como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pode reagir com os aminoácidos, as bases nitrogenadas (RNA e DNA), os lipídios de cadeia insaturada (ex: colesterol) já que esses são moléculas ricas em elétrons (RONSEIN, 2006). O esquema dessa afirmativa está representado na Figura 4.

Figura 4. Reações e alvos do oxigênio singlete.



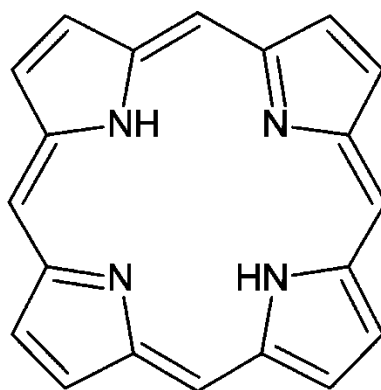
Fonte: Adaptado (RONSEIN, 2006).

1.2. Porfirina Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP)

As porfirinas são uma classe de moléculas orgânicas que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico que se liga a quatro átomos de azoto presentes no centro. Além disso é válido dizer que sua estrutura é formada por heterociclos aromáticos integrado por pontes meso-metínicas. Ademais possuem

características cromóforas devido as ligações duplas alternadas presentes na sua estrutura. Outro ponto importante a ser citada é o comprimento de onda, cujo qual, cada porfirina apresenta um maior pico em determinado ponto, podendo ser chamado de bandas, e pode-se afirmar que geralmente a banda de maior pico, ou seja, maior intensidade (Banda Soret) acontece próximo ao comprimento de onda em torno de 400nm, enquanto que bandas com picos mais baixos, ou seja, intensidades menores (bandas Q) ocorrem entre os comprimentos de onda de 500 a 650nm (OLIVEIRA, 2015). A Figura 5 ilustra uma estrutura do macrociclo comum entre as porfirinas.

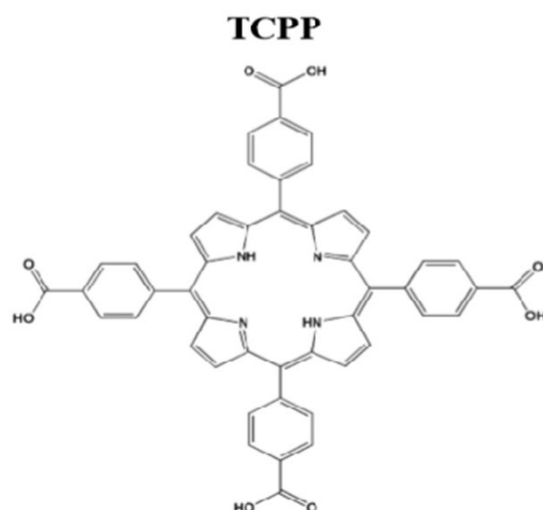
Figura 5. Estrutura geral de uma porfirina.



Fonte: (OLIVEIRA, 2015)

A porfirina utilizada nesse trabalho é a Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina que de forma abreviada é conhecido por (TCPP). A Figura 6 a seguir representa a estrutura dessa porfirina:

Figura 6. Estrutura da porfirina Tetra-(4-carboxi)fenil porfirina (TCPP).



Fonte: (CLARKE, 2002).

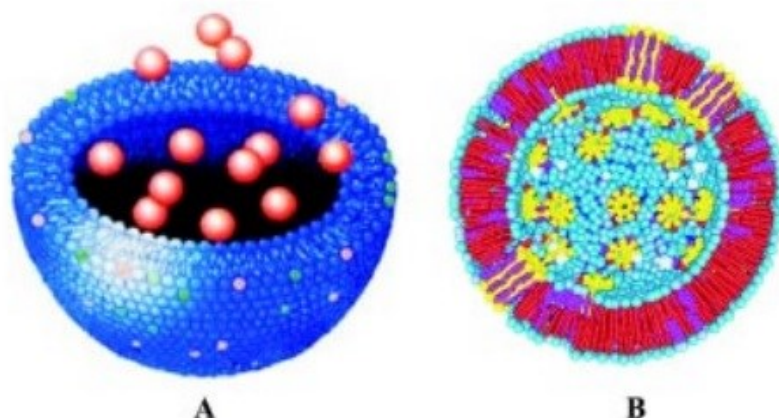
A partir dessa figura é válido notar a presença de ligações conjugadas que dão características cromóforas a essa molécula. Vale salientar que apesar do macrociclo pirrólico da porfirina possuir caráter hidrofóbico, TCPP possui 4 grupos de ácidos carboxílicos que quando em meio básico encontram-se desprotonados, proporcionando certo caráter hidrofílico à molécula. Por isso, em pH acima de 7 esse FS começa a apresentar características hidrossolúvel (que pode ser dissolvido em água) devido a desprotonação do ácido carboxílico (CLARKE, 2002).

1.3. Membranas biológicas

Algumas moléculas são ricas em elétrons e interagem bem com oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), como por exemplo, os lipídios insaturados, os aminoácidos, as bases nitrogenadas (RNA e DNA), e o colesterol. Tendo em mente esses exemplos, é possível imaginar o lipossoma, que é formado por uma bicamada lipídica, pode ser oxidado durante a fotossensibilização.

O lipídio utilizado neste trabalho é a lecitina de soja, e é a partir dessa que se produz os lipossomas, que são pequenas vesículas formada por pelo menos uma bicamada concêntrica de fosfolipídio que se organiza espontaneamente em meio aquoso (RIBAS, 1997). A Figura 7 é capaz de ilustrar essa afirmativa:

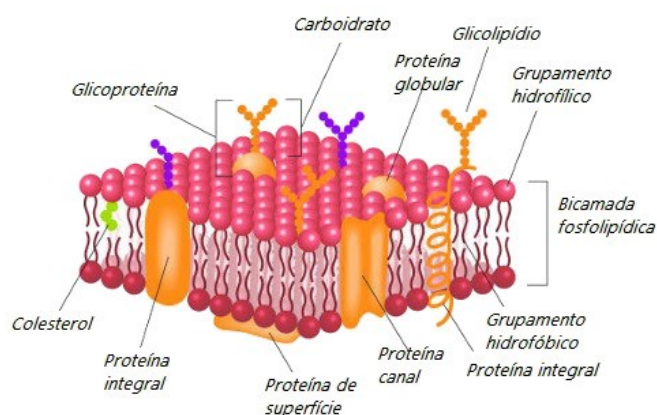
Figura 7. Representação de um sistema mimético da membrana, ou seja, a estrutura de um lipossoma, onde: A) representa Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa e na bicamada lipídica; e (B) Corte transversal de lipossoma unilamelar.



Fonte: (CHORILLI, 2004).

Sendo assim, é possível correlacionar efeitos nos lipossomos com a membrana biológica, a principal diferença entre o lipossomo e a membrana plasmática é a a membrana possui constituintes, entre eles estão as proteínas, carboidratos e os colesterolis. Representado pela Figura 8.

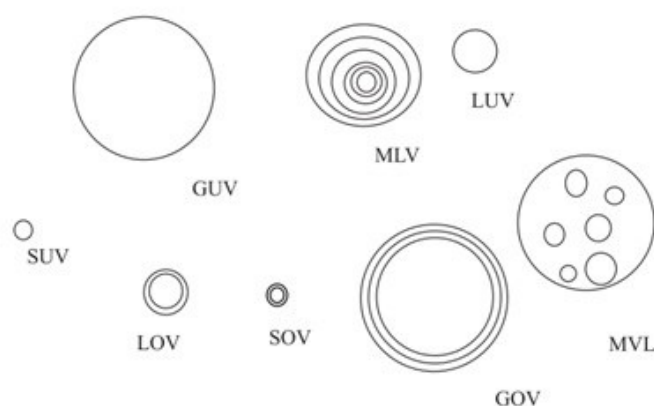
Figura 8. Representa a estrutura de uma membrana biológica e seus componentes.



Fonte: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-e-membrana-plasmatica.htm>.

Sobre o lipossomo, vale citar suas classificações, entre elas as vesículas multilamelares (MLV) que possuem bicamadas fosfolipídicas concêntricas intercaladas por compartimentos aquosos (400 a 3500 nm). Além das vesículas unilamelares grandes (LUV) formadas por apenas uma bicamada com grande cavidade aquosa (200 a 1000 nm). Também tem as vesículas unilamelares pequenas (SUV) que são apenas uma bicamada fosfolipídica e um pequeno compartimento aquoso (20 a 50 nm). Outras são as vesículas oligolamelares pequenas (SOV), as vesículas oligolamelares grandes (LOV), e as vesículas oligolamelares gigantes (GOV) (CASTANHO, 2002). Essa classificação está representada a seguir pela Figura 9.

Figura 9. Representação esquemática dos vários tipos de lipossoma, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição. Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela).



Fonte: (CASTANHO, 2002).

1.4. Importância da interação fotossensibilizador e membrana

Atualmente, o estudo da associação de moléculas de atividade farmacológica com membranas tem encontrado sua principal aplicação no planejamento racional de medicamentos. A importância de estudar as propriedades interfaciais entre FS-membrana, deve-se ao fato de que a interação inicial dos fármacos com as células ocorre devido a sua capacidade de se incorporar e permear membranas, bem como, na sua habilidade em produzir espécies citotóxicas nas proximidades do microambiente em que se pretende causar danos (TSUBONE, 2019).

A interação e localização de FSs em membranas biológicas, e consequentemente a ação fotossensibilizadora, são extremamente dependentes de suas estruturas moleculares (VILSINSKI, 2015). A hidrofobicidade, a simetria de distribuições de porções polares e hidrofóbica e os substituintes em torno do macrociclo cromofórico são propriedades estruturais de grande importância (ENGELMANN, 2007).

Sabendo-se que a interação/localização do FS em membranas e células são importantes para o dano fotoinduzido, um estudo sistemático da relação estrutura-atividade pode ajudar a melhorar o processo terapêutico. Os sistemas biomiméticos têm sido extensivamente utilizados para estudar a influência da membrana em reações químicas e bioquímicas e em processos fotoinduzidos. Estes sistemas são ferramentas adequadas para investigar as possíveis alterações de equilíbrio e propriedades dinâmicas de superfície de maneira controlada (TSUBONE, 2019).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar as características espectroscópicas da TCPP e avaliar sua capacidade de interagir com membranas com o intuito de possibilitar o planejamento racional de novos fármacos foto-ativos mais eficazes.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar as propriedades espectroscópicas da porfirina em solventes de diferente polaridade;
- Determinar os coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos compostos em solvente orgânico;
- Estudar as propriedades espectroscópicas do FS auto-agregados em misturas homogêneas água/etanol;
- Estimar o grau de interação FS-membrana;
- Avaliar o dano em membranas induzido pela foto-oxidação.
- Avaliar a fotoestabilidade da TCPP em função do tempo de irradiação.

3. Metodologia

3.1. Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes

A partir de todas as vidrarias já inicialmente limpas usou-se a micropipeta e adicionou-se 2mL de metanol em um frasco. Com auxílio de uma espátula inseriu-se uma pequena quantidade TCPP no frasco e agitou a solução até a completa dissolução.

Com a solução já preparada foi possível avaliar o espectro da absorção do FS, utilizando o espectrômetro UV-VIS *Ocean Optics*. Para isso, primeiramente lavou-se a cubeta de quartzo com o solvente utilizado, o metanol, e em seguida, colocou-se metanol na cubeta para fazer a leitura do branco. Depois disso, realizou-se a medida de absorbância no intervalo de 300-800 nm da solução citadas acima.

Repetiu-se o mesmo completamente, substituindo o metanol por diferentes solventes, que foram eles, o etanol, o DMF e o clorofórmio. Depois de realizar todas as medidas de absorbância, foi possível salvá-las, e a partir do programa *Origin* plotou-se os gráficos que indicaram a característica espectroscópica da TCPP em diferentes solventes.

3.2. Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ)

É importante calcular o (ϵ) para descobrir a concentração da solução, para isso inicialmente pesou-se 1,04 mg da porfirina TCPP e conhecendo a sua massa molecular calculou-se o número de mols e posteriormente a sua concentração em 25 mL de etanol, a partir da equação (1) e (2):

$$C = \frac{n}{V} \quad (1) \quad \text{e} \quad n = \frac{m}{MM} \quad (2)$$

Onde C é a concentração do composto, n é o número de mols, V é o volume da solução, m é a massa pesada e MM corresponde a massa molar da molécula.

Sabendo-se a concentração da solução estoque, realizou-se várias diluições de modo a preparar soluções de FS com concentrações conhecidas, por meio da equação (3):

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad (3)$$

Onde C_i é a concentração inicial, V_i é o volume inicial, C_f é a concentração final e o V_f é o volume final.

Em seguida, foram registrados os espectros de absorção eletrônica no intervalo de 300-800nm do composto estudado em diferentes concentrações, permitindo a construção de curvas de concentração do FS *versus* absorvibilidade, no comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada banda, e determinado os valores de coeficiente de absorvibilidade molar (ϵ) através da Lei de Lambert-Beer, equação (4):

$$Abs = \epsilon . b . c \quad (4)$$

Onde *Abs* é o valor de absorbância, ϵ a absorvibilidade molar do composto no comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), *b* o caminho ótico da cubeta (1,0 cm) e *c* a concentração do composto.

3.3. Estudo de agregação dos FSs em misturas homogêneas água/etanol

A partir de uma solução estoque de TCPP em etanol já preparada anteriormente com concentração conhecida, inseriu-se 200µL dessa solução na cubeta, e em seguida adicionou-se 1800µL de metanol a cubeta, pois é o solvente utilizada na TCPP com valor de coeficiente de absorvibilidade molar (ϵ) conhecido e realizado experimentalmente. Com tudo isso pronto mediu-se a absorvibilidade molar. As medidas variando-se a porcentagem água/solvente foram realizadas no espectrômetro UV-VIS *Ocean Optics* e para isso iniciou-se com 100% do solvente e calculou-se a quantidade de solvente puro, a quantidade de solvente com a porfirina e a quantidade de água a ser utilizada em cada aferição. A Tabela 1, a seguir mostra os volumes utilizados segundo os cálculos:

Tabela 1. Valores dos volumes de cada solvente adicionado na solução total.

Amostra	Volume FS em etanol (µL)	Volume etanol puro (µL)	Volume água destilada (µL)	Volume total (µL)
1	70	1930	0	2000
2	70	1730	200	2000
3	70	1530	400	2000
4	70	1330	600	2000
5	70	1130	800	2000
6	70	930	1000	2000
7	70	730	1200	2000

8	70	530	1400	2000
9	70	330	1600	2000
10	70	130	1800	2000
11	70	0	1930	2000

Em resumo, as porcentagens do volume de água em etanol foram: 0 a 100%. Importante mencionar que a concentração do FS 2×10^{-6} mol/L foi mantida fixa em todas as % H₂O/etanol, para garantir uma análise correta das mudanças espectrais decorrentes de formação de espécies auto-agregadas e identificar uma região na qual o processo de auto-agregação se inicia.

3.4. Ligação dos FS em vesículas de lipossomos (Lecitina de Soja)

Medidas diretas de partição FS-membrana foram realizadas nos experimentos de ligação dos FSs em suspensões de vesículas lipídicas (ENGELMANN, 2007). Para isso, foram dissolvidos 30mg de lecitina de soja em clorofórmio, que foi evaporado em fluxo de argônio formando um filme na parede do tubo de ensaio. Foram adicionados 2 mL da solução tampão Tris 5 mM (pH 7,4) e o sistema foi agitado vigorosamente utilizando um agitador e/ou ultrassom até que todo filme se desgrudasse do vidro. A suspensão de lipossomos foi centrifugada por 10 minutos a 13500 rpm e o sobrenadante contendo vesículas menores foi descartado. O precipitado foi ressuspense em 1,0 mL da solução tampão. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes para garantir somente vesículas multilamelares (MLVs) em suspensão.

Preparou-se a solução da TCPP em tampão Tris 5mM (pH 7,4) de modo que a concentração final dos mesmos fosse 5 μ M. As soluções de FS em Tris (pH 7,4) foram incubadas com as suspensões de lipossomos (MLVs), previamente preparadas, por 60 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13500 rpm, no qual as vesículas decantaram juntamente com os FS que foram incorporados. O sobrenadante e o precipitado foram separados, o precipitado foi ressuspendido no mesmo volume de tampão. Para garantir a ausência de agregados na solução, adicionou-se mais 1mL de 1% (v/v) Triton X-100 na solução precipitada e na solução do sobrenadante. Por fim, realizou-se as medidas do espectro de absorção do precipitado e do sobrenadante no espectrômetro UV-VIS *Ocean Optics*.

A partir dos espectros obtidos, foi possível calcular a porcentagem (P) de ligação dos FSs em lipossomos de lecitina de soja, pela seguinte equação (5):

$$P = 100\% \frac{ABSp}{ABSs + ABSp} \quad (5)$$

Onde P é a porcentagem de ligação dos FSs em lipossomos, $ABSp$ e $ABSs$ são valores de absorbâncias obtidas no comprimento de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) para o precipitado e para o sobrenadante, respectivamente.

3.5. Avaliação do dano em membrana *via* carboxifluoresceína

Para avaliar o dano que os FSs podem causar nos lipossomos sob irradiação, utilizou-se um método que consiste em encapsular uma sonda fluorescente (no caso, carboxifluoresceína) no lipossomo, de tal forma que à medida que a bicamada lipídica é danificada, observa-se um aumento da intensidade de fluorescência da sonda autosuprimida dentro das vesículas, quando as mesmas são liberadas para o exterior da vesícula (BACELLAR, 2014). Para isso, dissolveu-se 30mg de lecitina de soja em clorofórmio e retirou-se o solvente sob fluxo de argônio até que houvesse a formação de um filme. Este filme foi hidratado com 1 mL da solução da sonda fluorescente (50mM carboxifluoresceína em 10mM tampão Tris pH 8,1) para se obter a suspensão de vesículas de lipossomos contendo carboxifluoresceína (CF) dentro e fora da vesícula. Tais lipossomos foram injetados em uma coluna cromatográfica de Sephadex G-50, a fim de separar as moléculas de CF que não foram encapsuladas (que ficaram fora das vesículas) dos lipossomos contendo CF dentro da vesícula. Nesta cromatografia de exclusão do tamanho, as moléculas/estruturas maiores tendem a migrar mais rapidamente que as menores, pois elas não conseguem penetrar no interior dos poros da resina, sendo assim eluem diretamente pela coluna. A fração contendo os lipossomos com a sonda fluorescente no compartimento interno foi identificada visualmente e recolhida em um eppendorf. Importante salientar que a fase móvel da coluna foi 10 mM tampão Tris (pH 8,1) contendo 300 mM NaCl. Essa quantidade de sal (NaCl) é necessária para que a força iônica e osmolaridade dentro e fora das vesículas sejam idênticas. Isto é, 50mM carboxifluoresceína em tampão Tris 10 mM (pH 8,1) no compartimento interno da vesícula, e uma solução de 300 mM cloreto de sódio em

tampão Tris 10mM (pH 8,1) no compartimento externo dos lipossomos (BACELLAR, 2014).

Coletado as amostras de lipossomos contendo CF apenas dentro das vesículas, as mesmas foram diluídas em tampão Tris e incubadas com FS (15 µM) de interesse. Nessa etapa usou-se uma placa no qual metade foi coberta com alumínio para ocorrer isolamento da luz, aplicou-se a mesma solução na parte coberta e na parte aberta da placa. Em seguida submeteu-se a placa a irradiação de luz verde (Figura 10) em determinados intervalos de tempo, e na última medida aplicou-se 10% da solução de Triton X-100, e mediu-se a emissão de fluorescência.

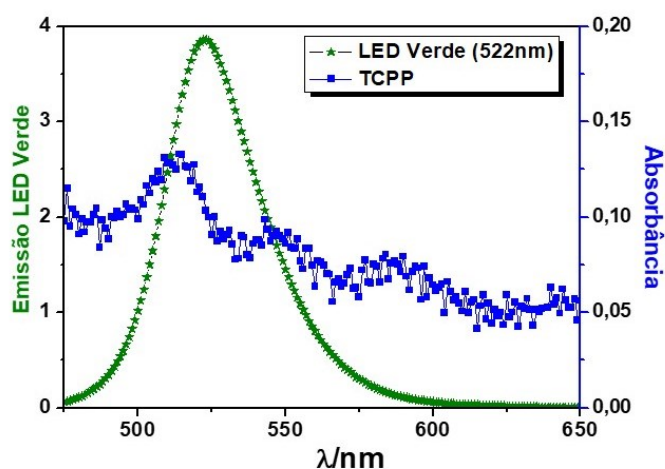


Figura 10. Espectro de emissão da luz do LED verde sobreposto ao espectro de absorção da TCPP. Fonte: própria autora.

Para o cálculo da porcentagem do dano em lipossomos causado pela foto-oxidação utilizar a equação (6):

$$P = 100\% \frac{I_{final} - I_{inicial}}{I_t - I_{inicial}} \quad (6)$$

Onde P é a porcentagem do dano na membrana, $I_{inicial}$ é a intensidade de emissão inicial da carboxifluoresceína (CF), I_t é a intensidade após a adição de 10% (v/v) Triton X-100 e I_{final} é a intensidade após determinado tempo de irradiação em minutos.

3.6. Estudo da fotoestabilidade ou fotodegradação dos compostos em metanol *via* UV-vis

A porfirina TCPP foi irradiada de 5 em 5 minutos num intervalo de 0 a 150 minutos com led verde com comprimento de onda de 522 nm (Figura 10). Preparou-se

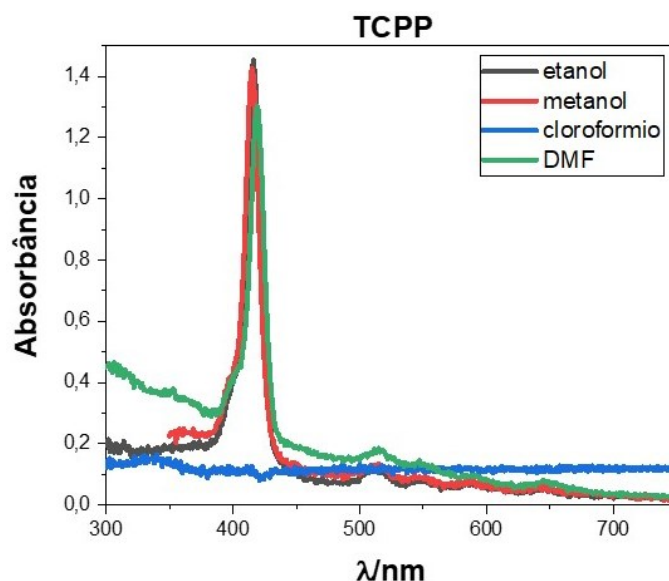
uma solução contendo metanol e FS, mantendo em agitação constante, e durante o intervalo de irradiação foi medido o espectro de absorção a cada 5 minutos (CORREA, 2006).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização espectroscópica dos FSs em diferentes solventes

Inicialmente investigou-se os possíveis solventes nos quais os FSs poderiam ser dissolvidos para a sua caracterização espectroscópica. Os solventes utilizados foram clorofórmio, DMF, etanol e metanol e possuem de diferentes graus de polaridade. Geralmente, a constante dielétrica do solvente fornece uma medida aproximada da polaridade de um solvente. Solventes com uma constante dielétrica (ϵ) inferior a 15 são geralmente considerados não polares (MARTINS, 2013), que é o caso do clorofórmio ($\epsilon = 4,81$) utilizado neste estudo. Os outros solventes utilizados neste estudo (DMF, etanol e metanol) são classificados como solventes polares, sendo o DMF um solvente polar aprótico e o etanol e metanol são solventes polar próticos (Figura 11).

Figura 11. Espectro de absorção eletrônica da TCPP nos solventes (metanol, etanol, clorofórmio e DMF) de diferente polaridade.



Fonte: própria autora.

Inicialmente é válido analisar as propriedades de cada solvente que foi utilizado. De modo geral, solventes próticos são aqueles que apresentam ligações de hidrogênio (existem exceções). Ao contrário disso os solventes apróticos não atuam como doadores de hidrogênio, e são subdivididos em aprótico dipolar que apresentam alta permissividade relativa ($\epsilon_r > 15$) e altos momentos de dipolo ($\mu > 8,3 \times 10^{-30} \text{ C.m} = 2,5 \text{ D}$), onde C.m representa a unidade coulomb-metro, e D a unidade Debye ($D = 3,33 \times 10^{-30}$) o aprótico

apolar que possui baixa permissividade relativa ($\epsilon_r < 15$), e baixo momento de dipolo ($\mu < 8.3 \times 10^{-30} \text{ C.m} = 2.5 \text{ D}$) (REICHARDT, 2003).

Dessa forma, o metanol e o etanol possuem características de solventes polares próticos, enquanto que o (DMF) atua como um polar aprótico. Já o clorofórmio apresenta propriedades físico-químicas distintas do DMF e álcoois, pois possui características apolares. O parágrafo a seguir apresenta os valores de permissividade em ordem indo de solventes apolares até o mais polar.

Na Figura 11, observa-se que os solventes mais adequados para dissolver TCPP são etanol e metanol, pois os respectivos espectros apresentaram bandas características do composto na forma monomérica (TSUBONE, 2014), apresentando as bandas bem definidas e características de porfirinas: Soret (B) e 4 bandas Q (QIV, QIII, QII, QI), respectivamente em 416, 512, 548, 587 e 644 nm. O espectro de absorvância da TCPP em DMF, também apresentou bandas características de porfirinas (Soret e 4 bandas Q), entretanto com um aumento da linha base, o que sugere presença de formas agregadas da porfirina. O espectro da TCPP em clorofórmio mostra que a molécula é praticamente insolúvel em neste solvente, apresentando-se precipitada visualmente.

4.2. Determinação do coeficiente de absortividade molar de cada FS

O coeficiente de absortividade molar (ϵ) é caracterizado pela capacidade que um mol de determinada substância consegue absorver luz em determinado comprimento de onda (λ). É uma propriedade intrínseca de cada FS que pode ser obtido através de seu espectro de absorção, sendo estimado por dois parâmetros: a posição de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e o coeficiente de absortividade molar (ϵ), calculado em geral, nos $\lambda_{\text{máx}}$. Sendo assim, a relação entre ϵ , a concentração da amostra (c) e o caminho ótico (l) do meio de absorção caracteriza-se pela lei de Lambert-Beer (LIMA, 2013). Portanto, o coeficiente de absorção molar (ϵ) da TCPP em etanol pode ser estimado através da lei de Lambert-Beer para os comprimentos de onda da banda Soret (416 nm) e bandas Q (512, 548, 587 e 644 nm), através do gráfico de absorvância *versus* concentração do composto, obtidos através da diluição de uma solução estoque inicial. Abaixo estão apresentados os espectros de absorção eletrônica da TCPP em etanol em diferentes concentrações (Figura 12A) e a sua curva de regressão linear (Figura 12B).

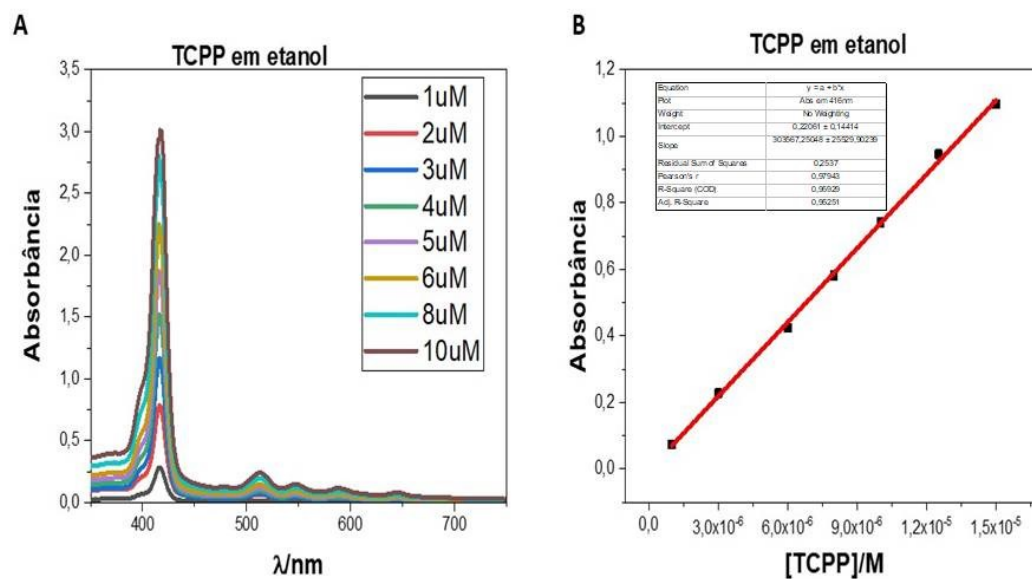
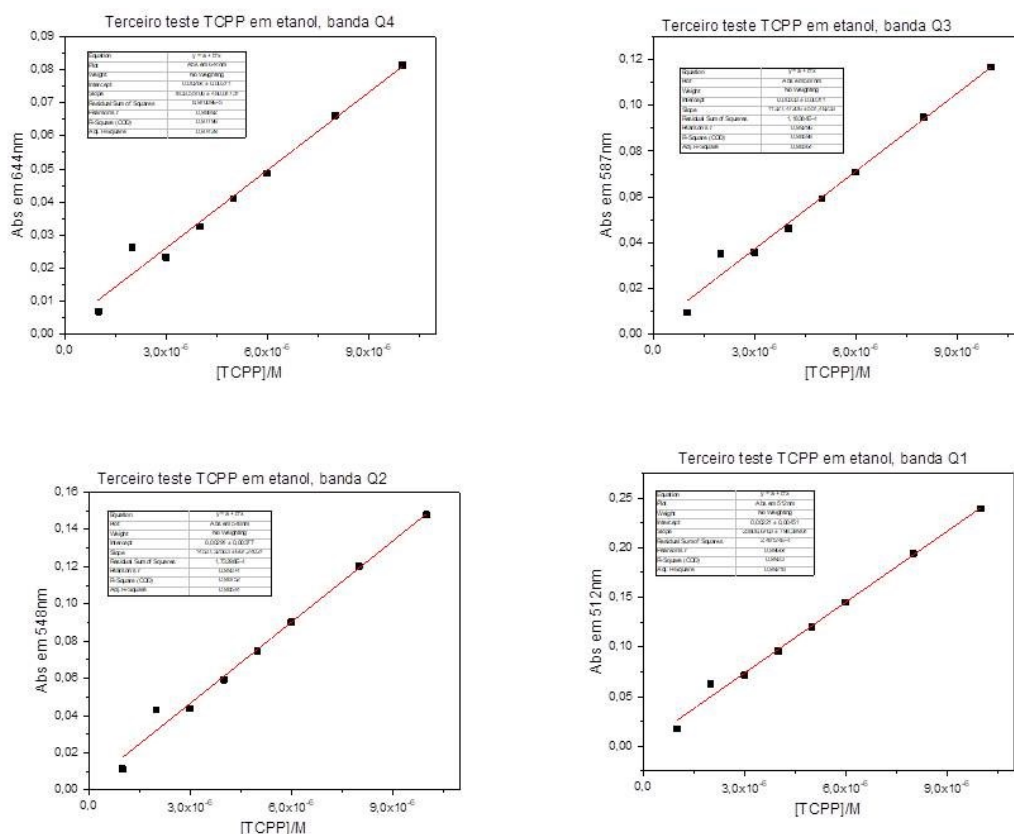


Figura 12. (A) Espectros de absorção eletrônica da TCPP em etanol em diferentes concentrações. (B) Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração de TCPP, no comprimento de onda máximo da banda Soret (416 nm). Fonte da própria autora.

Em seguida também foram plotados gráficos em outros comprimentos de onda máximo, referente às 4 bandas Q (QIV, QIII, QII, QI). Os gráficos descritos estão representados na Figura 13 a seguir:

Figura 13. Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração de TCPP, nos comprimentos de onda máximo das bandas Q (512, 548, 587 e 644 nm).



Fonte da própria autora.

As curvas de regressão linear (Figura 3) apresentaram um coeficiente de regressão linear ($r^2 \approx 0,99$) que atesta a ótima correlação dos pontos experimentais com a curva calculada. A linearidade das retas sugere que nestas condições experimentais, não se observa a agregação da TCPP, ou seja, encontra-se em estado monomérico, quando uma única molécula está solvatada no solvente.

Em seguida montou-se uma tabela com os valores do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e seus respectivos comprimentos de onda em que as absorbâncias foram máximas, representados pela (Tabela 2) a seguir.

Tabela 2. Valores dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) nos máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) da TCPP em etanol. Fonte: própria autora.

Composto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($10^3 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
TCPP	416	304
	512	24
	548	14

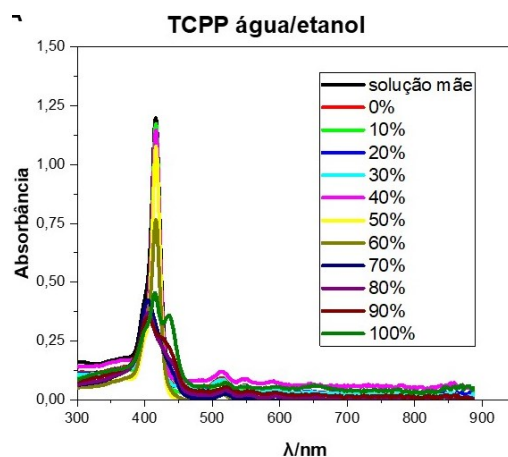
587	11
644	78

O valor do coeficiente de absorvidade molar conhecido na literatura com o solvente metanol é $\epsilon = 4.8 \times 10^5$ L/mol.cm para o comprimento de onda em 416nm, em meio neutro (CLARKE, 2002). E como o resultado obtido pelo gráfico diz que o valor do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da TCPP em etanol foi de $3,04 \times 10^5$ L/mol.cm quer dizer que o resultado obtido é relativamente próximo ao da literatura (BRAGA, 2014). E considerando que quanto maior o coeficiente de absorvidade molar melhor é a interação do FS com o solvente, quer dizer que a interação entre a porfírina TCPP e o solvente etanol nesse ensaio foi relativamente significativa.

4.3. Estudo de agregação da TCPP em misturas homogêneas água/etanol

Nesta etapa do projeto, buscou-se obter informações sobre as propriedades espectroscópicas dos auto-agregados e em que condições físico-químicas eles se manifestam. É conhecido que o efeito de auto-agregação influencia nas propriedades espectroscópicas de porfirinas, bem como na sua eficiência fotodinâmica. Por isso, o efeito de água e sobre o processo de auto-agregação da TCPP foi estudada a princípio utilizando o etanol, de modo que as misturas entre água e etanol foram preparadas em termos de proporção volume/volume (v/v) variando de 0 a 100%, para concentração fixa de FS. A Figura 14 apresenta os espectros de absorção em diferentes proporções água/solvente (v/v) para TCPP.

Figura 14. Espectros de absorção da TCPP em diferentes proporções de águas/solvente.

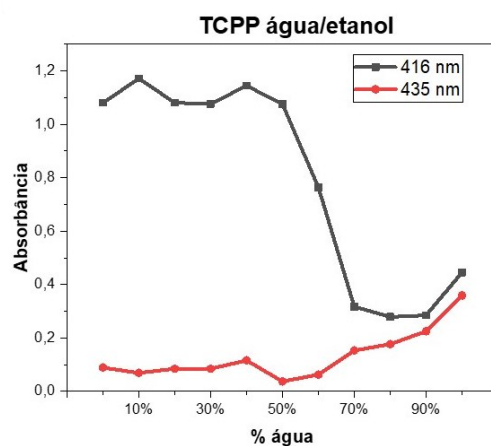


Fonte: própria autora.

A partir do gráfico da Figura 14 referente a TCPP, observa-se que a adição de água induz o decréscimo de banda Soret com deslocamento batocrômico que é característico de um processo de auto-agregação da molécula nesse sistema.

De maneira a visualizar melhor estes resultados, na Figura 15 é apresentado o gráfico da variação do máximo de absorção em dois comprimentos de onda ($\lambda = 416$ e 435 nm) para a TCPP.

Figura 15. Variação do máximo de absorção variando a % água/solvente orgânica para TCPP em dois comprimentos de onda ($\lambda = 416$ e 435 nm).



Fonte: própria autora.

Nota-se que a partir de 50% de água o espectro de TCPP começa a apresentar drásticas alterações, caracterizadas principalmente pelo desaparecimento da banda Soret (416nm) e a formação de uma banda em 435nm. Dessa forma, podemos estimar que em

55% é a região onde se inicia o processo de auto-agregação, denominada “Porcentagem pré-agregacional crítica – PAC” da TCPP (TSUBONE, 2014).

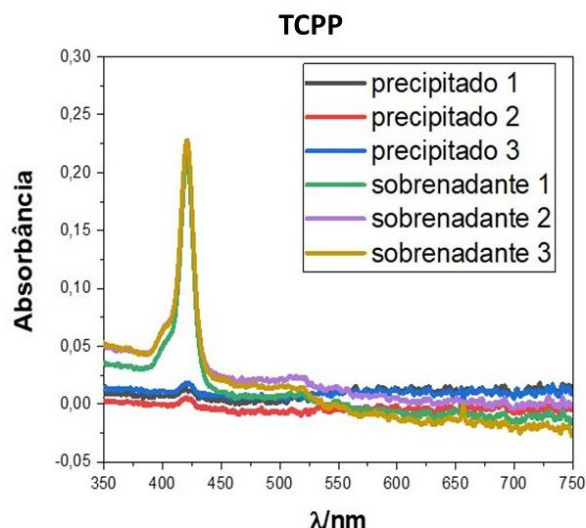
4.4. Ligação do FS em vesículas de lipossomos (Lecitina de Soja)

Depois de conhecer as características espectrais e fotofísicas dos compostos, o foco do trabalho foi direcionado para o estudo da interação dos FSs em membranas mimetizadas por lipossomos. O coeficiente de partição é um bom parâmetro para prever a tendência de um composto interagir com as membranas biológicas das células. Essa medida informa sobre distribuição dos FSs em um sistema de fase lipofílica/hidrofílica, e indica sua capacidade de penetrar sistemas biológicos heterogêneo (ENGELMANN, 2007).

A partição em biomembranas é particularmente relevante porque muitas moléculas têm funções alvo diretamente nas membranas biológicas. Além disso, a partição sempre coexiste com a ligação à membrana receptores e transportadores. O sistema bifásico octanol/água foi tradicionalmente usado para avaliar coeficientes de partição, que posteriormente foram então extrapolados para sistemas de biomembrana/fase aquosa (SANTOS, 2003). Por isso, o grau de interação entre FS e membranas foi estimado utilizando bicamadas de fosfolípidios sintéticas (lipossomos).

No experimento, foram preparados lipossomos de lecitina de soja e os mesmos incubados com FS por 1 hora. Em seguida houve a separação do precipitado e do sobrenadante, no qual os espectros de absorbância dos FSs no sobrenadante e na fração lipídica ressuspendida com tampão Tris foram registrados (Figura 16).

Figura 16. Espectros de absorbâncias da TCPP no sobrenadante e na fração lipídica ressuspendida. O experimento foi realizado em triplicata.



Fonte: própria autora.

A partir dos dados obtidos e apresentados na Figura 16 foi possível calcular o valor de porcentagem de ligação do FS em membrana (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de porcentagem de ligação dos FSs em lipossomos de lecitina de soja. Fonte: própria autora.

FS	% de ligação em membrana
TCPP	5,13 ± 0,03

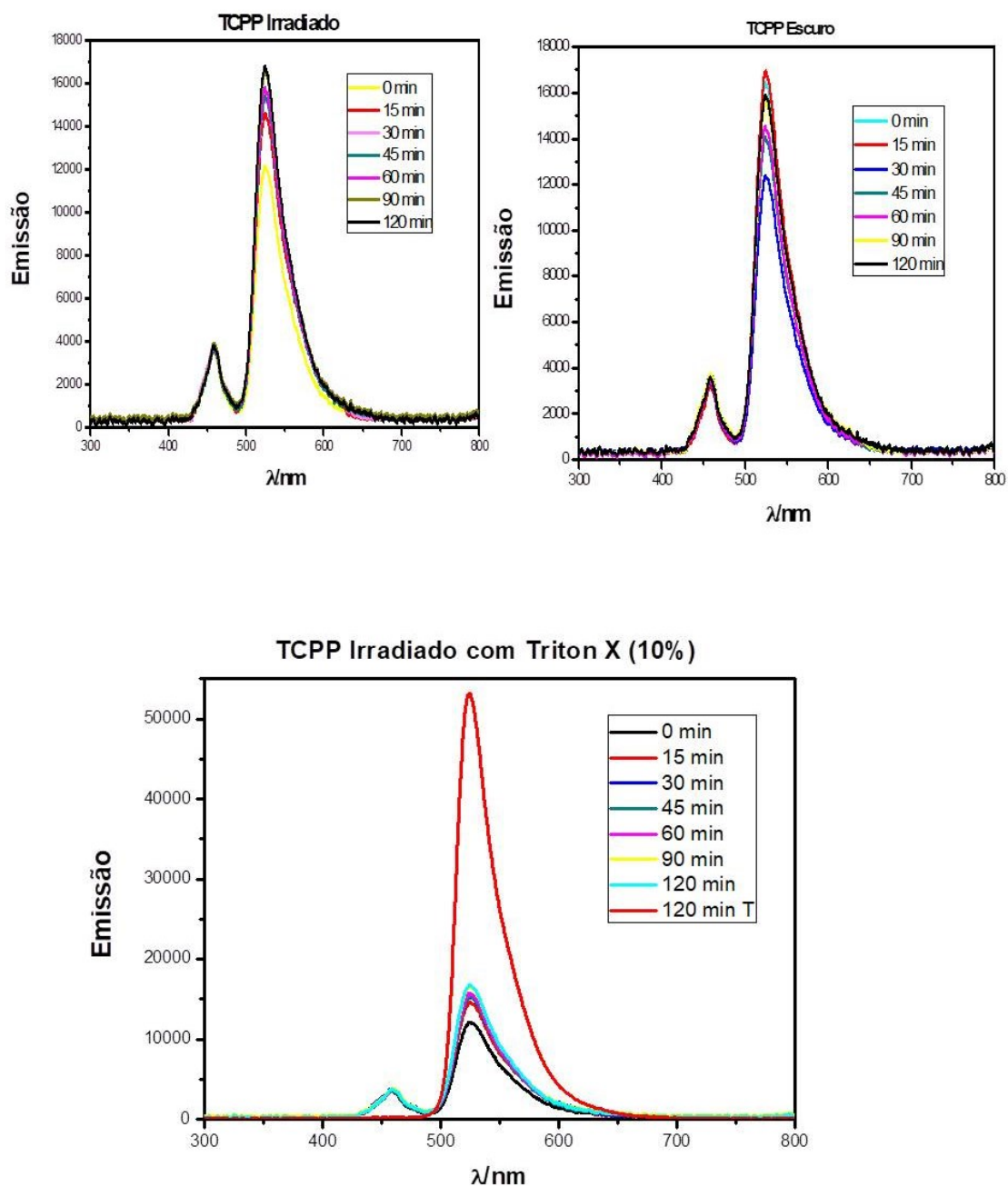
Os dados obtidos mostram para a porfirina TCPP, os quatro 4 ácidos carboxílicos em pH neutro conferem certa hidrofiliabilidade à molécula de porfirina, dificultando a interação desta com membranas.

4.5. Avaliação do dano em membrana *via* carboxifluoresceína (CF)

Para avaliar a cinética do FS em causar um dano oxidativo nos lipossomos sob irradiação, utilizou-se um método que consiste em encapsular carboxifluoresceína (sonda fluorescente) no lipossomo. O método é baseado na CF auto-suprimida no compartimento interno da vesícula. Após a lesão, a CF vaza para o compartimento externo da vesícula, aumentando a intensidade de emissão de fluorescência que é monitorada em função do tempo de irradiação. Sendo assim, monitorou-se a

fluorescência da CF em função do tempo de irradiação ou de interação lipossomo-FS (no escuro) – Figura 17.

Figura 17. Espectros de emissão da CF nas amostras sob presença de TCPP em luz e no escuro em determinados intervalos de tempo.

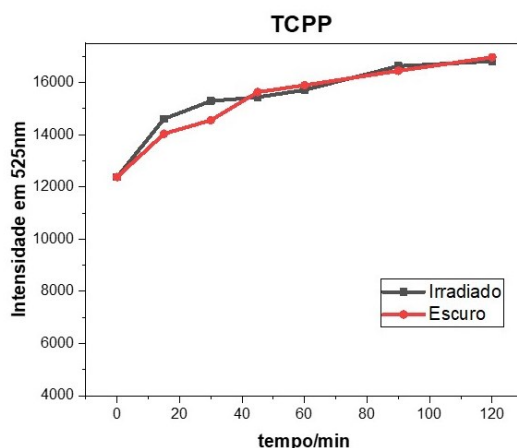


Fonte: própria autora.

A partir dos gráficos da Figura 17 foi possível plotar gráficos em que o comprimento de onda apresentou intensidade de emissão máxima *versus* o tempo de

irradiação. As linhas bases são referentes as amostras em escuro e a outra irradiada apresentados na Figura 18.

Figura 18. Variação da intensidade de emissão da CF em função do tempo (minutos) de exposição de lipossomos da TCPP (15 μM) em tampão Tris (pH 8,1) na ausência (escuro) ou presença (irradiado) de luz (verde $\lambda_{\text{máx}} = 522\text{nm}$).

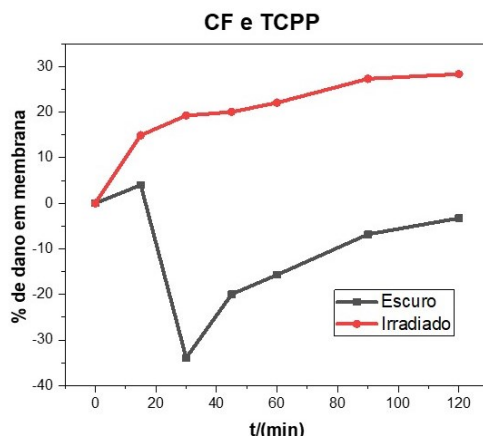


Fonte: própria autora.

Com os dados representados pelos gráficos é possível notar que intensidade de luz emitida pela CF está semelhante para as amostras irradiadas e para as amostras em escuro. Isso pode ter ocorrido devido à baixa concentração do FS, pequena interação FS-membrana ($\approx 5\%$) e baixa potência da fonte de Luz utilizada durante a irradiação.

A partir dos dados desse gráfico Figura 18 foi possível realizar o cálculo da porcentagem de dano em membrana (Equação 6) e plotar um gráfico de porcentagem de dano em membrana e função do tempo de irradiação separados em amostras irradiadas e amostras em escuros (Figura 19).

Figura 19. Porcentagem de dano em membrana em função do tempo (minutos) de exposição de lipossomos aos FSs (15 μM) em tampão Tris (pH 8,1) na ausência (escuro) ou presença (irradiado) de luz (verde $\lambda_{\text{máx}} = 522\text{nm}$).



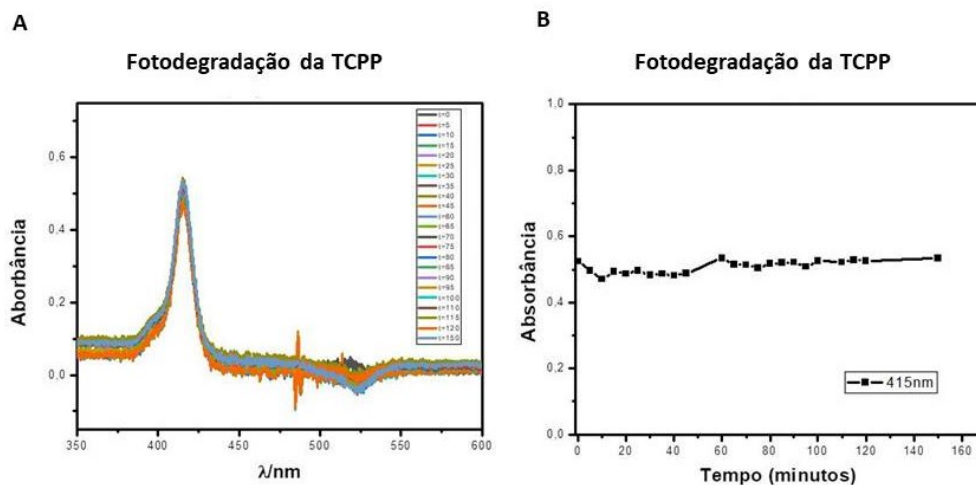
Fonte: própria autora.

Analisando os gráficos a porfirina TCPP apresentou valores negativos de porcentagem o que não existe e pode ser devido algum erro experimental. Logo algumas condições experimentais desse ensaio devem ser ajustadas repetir o experimento e analisar se as amostras irradiadas realmente sofrem maior dano em membrana em relação as amostras em escuro.

4.6. Estudo da fotoestabilidade ou fotodegradação os compostos em metanol *via* UV-vis

Avaliou-se se o FS é estável ou instável frente á luz, monitorando o espectro de absorção em função do tempo de irradiação da TCPP com LED verde, apresentado na Figura 20. A partir dos espectros de absorbância obtidos, foi possível plotar um gráfico da absorbância versus o comprimento de onda, e outro da absorbância no comprimento de onda máximo $\lambda=416\text{nm}$, ou seja, a banda Soret *versus* o tempo em minutos para verificar se houve fotodegradação (Figura 20).

Figura 20. (A) Espectros de absorção da porfirina TCPP ($35\mu\text{M}$) da absorbância nos diversos intervalos de tempo de irradiação monitorada. (B) gráfico da absorbância em $\lambda_{\text{máx}}=416\text{nm}$ em função do tempo (minutos). Fonte de irradiação: LED Verde $\lambda_{\text{máx}}=522\text{nm}$, potência $2,26\text{mW}$ posicionado à $0,1\text{cm}$ de distância da amostra.



Fonte própria autora.

Conforme apresentado na Figura 20, foi possível observar que a irradiação constante com Led verde ($522\text{nm} \pm 10\text{nm}$) não causou a diminuição na banda Soret $\lambda=416\text{nm}$, e nas bandas Q. Isso mostra que sob essas condições (potência 2,26mW posicionado à 0,1cm de distância da amostra) e tempo de irradiação monitorados, a TCP é estável frente à luz.

5. Conclusão

Neste trabalho, foi possível realizar a caracterização espectroscópica dos FSs em solventes com diferentes polaridades, o estudo de auto-agregação dos FSs em diferentes porcentagens de água, o grau de interação FS-membrana, e sua capacidade de causar danos foto-oxidativos em lipossomos.

Primeiramente, observou-se que a solubilidade dos FSs é dependente da polaridade do solvente, de tal forma que o aumento da polaridade do solvente aumenta a solubilidade dos FSs. Além disso, a molécula TCPP apresenta-se no estado monomérico em solução etanólica, e por isso foi o solvente utilizado para a realização do estudo água/etanol. Apesar de TCPP ser solúvel em solventes polares, observou-se espectros de absorção característicos de agregados quando em solução aquosa. A partir dos estudos de auto-agregação da TCPP em misturas água/etanol, estimou-se que a “*Porcentagem Agregacional Crítica – PAC*” em cerca de 55% água.

Depois de conhecer as características espectrais e fotofísicas dos compostos, avaliou-se a interação do FS com membranas, utilizando bicamadas de fosfolipídios sintéticas (lipossomos). Os dados indicaram que a TCPP possui fraca interação com a membrana. Além disso, experimento para avaliar a cinética de dano oxidativo em membranas mostrou que a TCPP apresentou valores negativos de porcentagem, resultado que pode refletir a baixa interação desta molécula com bicamada lipídica. Entretanto, melhores condições experimentais precisam ser readaptadas para melhor avaliação. Por fim, notou-se que TCPP é uma molécula foto-estável sob as condições de tempo e irradiação utilizadas neste trabalho.

6. Referências bibliográficas

- Araki, K., & Toma, H. E. (2002). Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. *Química Nova*, 25(6a), 962–975.
<https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000600014>
- Bacellar, I. O. L., Pavani, C., Sales, E. M., Itri, R., Wainwright, M., & Baptista, M. S. (2014). Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, 90(4), 801–813.
<https://doi.org/10.1111/php.12264>
- Braga, G., Aparicio, J. L., Vilsinski, B. H., Tessaro, A. L., Gerola, A. P., Hioka, N., & Caetano, W. (2014). Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (tmpp): Estudos espectroscópicos e análises multivariadas. *Química Nova*, 37(4), 648–652. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140105>
- Chorilli, M., Leonardi, G. R., Oliveira, a G., & Scarpa, M. V. (2004). Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*, 16(7–8), 75–79.
- Clarke, S. E., Wamser, C. C., & Bell, H. E. (2002). Aqueous complexation equilibria of meso-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin with viologens: Evidence for 1:1 and 1:2 complexes and induced porphyrin dimerization. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(13), 3235–3242. <https://doi.org/10.1021/jp0133485>
- De Oliveira, K. T., De Souza, J. M., Da Silva Gobo, N. R., De Assis, F. F., & Brocksom, T. J. (2015). Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. *Revista Virtual de Química*, 7(1), 310–335. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150016>
- de Oliveira, L. P., Carneiro, Z. A., Ribeiro, C. M., Lima, M. F., Paixão, D. A., Pivatto, M., de Souza, M. V. N., Teixeira, L. R., Lopes, C. D., de Albuquerque, S., Pavan, F. R., & Guerra, W. (2018a). Three new platinum complexes containing fluoroquinolones and DMSO: Cytotoxicity and evaluation against drug-resistant tuberculosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183(March), 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.010>
- de Oliveira, L. P., Carneiro, Z. A., Ribeiro, C. M., Lima, M. F., Paixão, D. A., Pivatto, M., de Souza, M. V. N., Teixeira, L. R., Lopes, C. D., de Albuquerque, S., Pavan, F. R., & Guerra, W. (2018b). Three new platinum complexes containing fluoroquinolones and DMSO: Cytotoxicity and evaluation against drug-resistant tuberculosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183(January), 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.010>

- Engelmann, Fabio M., Mayer, I., Gabrielli, D. S., Toma, H. E., Kowaltowski, A. J., Araki, K., & Baptista, M. S. (2007). Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9075-0>
- Engelmann, Fábio M., Rocha, S. V. O., Toma, H. E., Araki, K., & Baptista, M. S. (2007). Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1–2), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.008>
- Fontes, A. P. S., Almeida, M. V. de, Faria, B. de A., & César, E. T. (2010). Síntese e caracterização de complexos de platina(IV) com derivados N-benzilados da 1,3-propanodiamina. *Química Nova*, 33(6), 1259–1262. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000600007>
- Giansante, S., Baptista, M. S., Rossoni, R. D., Uchoa, J. C. J. A. F., José, S., Paulo, S., & José, S. (2014). *Derivados porfirínicos ativos em terapia fotodinâmica*. October.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., & Roncucci, G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 468–481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>
- Martins, C. R., Lopes, W. A., & De Andrade, J. B. (2013). Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, 36(8), 1248–1255. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000800026>
- Medications, N. F. (2002).) 5 . *Posteriormente, o medica- mento Levulan*. 25(5), 801–807.
- Perussi, J. R. (2007). Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, 30(4), 988–994. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>
- Reichardt, D. C. (2003). *Solventes*.
- Ribas, A. M. (1997). Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. *Universidade Estadual de Campinas*.
- Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Bechara, E., Di Mascio, P., & Martinez, G. R. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: Mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3), 563–568. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300027>
- Santos, N C, & Castanho, M. A. R. B. (2002). Liposomes: Has the magic bullet hit the target? *Química Nova*, 25(6B), 1181–1185.

- isi:000180127000018%5Cnd:%5C1Refman12%5CPDF%5CRef_ID-2813.pdf%5CnJCR:
http://links.isiglobalnet2.com/gateway/Gateway.cgi?GWVersion=2&SrcAuth=JCR&SrcApp=PRODUCT_NAME&SrcURL=http%3A//wos.isiglobalnet2.com/CIW.cgi&SrcImageURL=http://isilinks.com:9000/Links/i
- Santos, Nuno C., Prieto, M., & Castanho, M. A. R. B. (2003). Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1612(2), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00112-3)
- Savira, F., & Suharsono, Y. (2013). 済無No Title No Title. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 01(01), 1689–1699.
- Silva, R. C. Da. (2007). *Avaliação Da Eficiência Fotodinâmica De Fotossensibilizadores Com Aplicação Em Terapia Fotodinâmica*. 90.
- Soukos, N. S., Ximenez-Fyvie, L. A., Hamblin, M. R., Socransky, S. S., & Hasan, T. (1998). Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2595–2601. <https://doi.org/10.1128/aac.42.10.2595>
- Spencer Lima, L. (2013). Lei de Lambert–Beer. *Revista de Ciência Elementar*, 1(1), 1–2. <https://doi.org/10.24927/rce2013.047>
- Tsubone, Tayana M., Braga, G., Vilsinski, B. H., Gerola, A. P., Hioka, N., Tessaro, A. L., & Caetano, W. (2014). Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(5), 890–897. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140058>.
- Tsubone, Tayana Mazin, Baptista, M. S., & Itri, R. (2019). Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. *Biophysical Chemistry*, 254(August), 106263. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106263>.
- Vilsinski, B. H., Gerola, A. P., Enumo, J. A., Campanholi, K. D. S. S., Pereira, P. C. D. S., Braga, G., Hioka, N., Kimura, E., Tessaro, A. L., & Caetano, W. (2015). Formulation of aluminum chloride phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 block copolymer micelles: Photophysical properties and photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 91(3), 518–525. <https://doi.org/10.1111/php.12421>.
- Bacellar, I. O. L., Pavani, C., Sales, E. M., Itri, R., Wainwright, M., & Baptista, M. S. (2014). Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, 90(4), 801–813. <https://doi.org/10.1111/php.12264>

- Chorilli, M., Leonardi, G. R., Oliveira, a G., & Scarpa, M. V. (2004). Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*, 16(7–8), 75–79.
- Clarke, S. E., Wamser, C. C., & Bell, H. E. (2002). Aqueous complexation equilibria of meso-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin with viologens: Evidence for 1:1 and 1:2 complexes and induced porphyrin dimerization. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(13), 3235–3242. <https://doi.org/10.1021/jp0133485>
- CORREA, J. C. (2006). *Fotodegradação do photoditazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser*. 114.
- De Oliveira, K. T., De Souza, J. M., Da Silva Gobo, N. R., De Assis, F. F., & Brocksom, T. J. (2015). Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. *Revista Virtual de Química*, 7(1), 310–335. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150016>
- de Oliveira, L. P., Carneiro, Z. A., Ribeiro, C. M., Lima, M. F., Paixão, D. A., Pivatto, M., de Souza, M. V. N., Teixeira, L. R., Lopes, C. D., de Albuquerque, S., Pavan, F. R., & Guerra, W. (2018). Three new platinum complexes containing fluoroquinolones and DMSO: Cytotoxicity and evaluation against drug-resistant tuberculosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183(March), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.010>
- Fontes, A. P. S., Almeida, M. V. de, Faria, B. de A., & César, E. T. (2010). Síntese e caracterização de complexos de platina(IV) com derivados N-benzilados da 1,3-propanodiamina. *Química Nova*, 33(6), 1259–1262. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000600007>
- Ribas, A. M. (1997). Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. *Universidade Estadual de Campinas*.
- Savira, F., & Suharsono, Y. (2013). 済無No Title No Title. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 01(01), 1689–1699.
- Srikanth, C. K., & Jeevanandam, P. (2012). Deposition of ZnO nanoparticles on calcite and studies on their optical properties and photocatalytic activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12(4), 3135–3141. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.5838>
- Tasso, T. T., Tsubone, T. M., Baptista, M. S., Mattiazzi, L. M., Acunha, T. V., & Iglesias, B. A. (2017). Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Transactions*, 46(33), 11037–11045. <https://doi.org/10.1039/c7dt01205e>