

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

IEDA VIEIRA DA CUNHA

Fotossensibilizadores de protoporfirina IX funcionalizados com inibidores de bomba de efluxo derivados de capsaicina para potencializar a terapia fotodinâmica contra as bactérias resistentes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Uberlândia-MG

2025

IEDA VIEIRA DA CUNHA

Fotossensibilizadores de protoporfirina IX funcionalizados com inibidores de bomba de efluxo derivados de capsaicina para potencializar a terapia fotodinâmica contra as bactérias resistentes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

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

Área de concentração: Química

Orientador: Profa. Dra. Tayana Mazin Tsubone

Coorientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Uberlândia-MG

2025

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

C972
2025

Cunha, Ieda Vieira da, 1995-
Fotossensibilizadores de protoporfirina IX
funcionalizados com inibidores de bomba de efluxo
derivados de capsaicina para potencializar a terapia
fotodinâmica contra as bactérias resistentes
Staphylococcus aureus e Escherichia coli [recurso
eletrônico] / Ieda Vieira da Cunha. - 2025.

Orientadora: Tayana Mazin Tsubone.

Coorientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.111>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 404, PPGQUI				
Data:	Dezenove de fevereiro de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	12312QMI003				
Nome do Discente:	Ieda Vieira da Cunha				
Título do Trabalho:	“Fotossensibilizadores de protoporfirina IX funcionalizados com inibidores de bomba de efluxo derivados de capsaicina para potencializar a terapia fotodinâmica contra as bactérias resistentes Staphylococcus aureus e Escherichia coli”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Compostos fotoativos no combate a microrganismos resistentes via Terapia Fotodinâmica”				
<u>ODS</u>	“ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bemestar para todos, em todas as idades.”				

Reuniu-se, por webconferência, pelo *link*: <https://meet.google.com/dbe-seky-ukw>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: **Raquel Maria Ferreira de Sousa**, da Universidade Federal de Uberlândia - UFU/IQUFU; **Thiago Teixeira Tasso**, da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; e **Tayana Mazin Tsubone**, orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovada.

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/02/2025, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayana Mazin Tsubone, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/02/2025, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Teixeira Tasso, Usuário Externo**, em 19/02/2025, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6011018** e o código CRC **E636EAEB**.

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Stela Maris e Aluísio, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e pelo cuidado ao longo dos anos. Ao meu bichinho de estimação, Mel, por trazer tanta alegria à minha vida.

Sou imensamente grata aos meus orientadores Prof^a Tayana e Prof. Celso, e ao Prof. Carlos Henrique, pela oportunidade e por toda a assistência prestada durante meu período de Mestrado. Aos colegas do LiFeBIO, Maynne e Patrícia; do LaSFar, Danilo, Thibault e Douglas; e do LEA, Nagela, Gabriel e Julia, que foram essenciais para o desenvolvimento da minha pesquisa. Também agradeço aos colegas Marcos, Isabela, Déborah, Caio, Diogo e Augusto, sempre dispostos a ajudar.

Às minhas amigas Laura Felício, Jéssica, Laura Jagger, Marina e Nathalia, agradeço pelos momentos compartilhados.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Em particular, à CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo: 88887.820992/2023-00); ao CNPq (Universal 407282/2023-8) e à FAPEMIG (Universal APQ-00704-21 e Universal APQ02393-24), pela verba destinada à aquisição de materiais de consumo e permanentes, fundamentais para a realização da pesquisa. Gostaria de ressaltar, ainda, o apoio financeiro recebido por meio do Prêmio "Para Mulheres na Ciência" 2023, concedido pela L'Oréal-Brasil, UNESCO e Academia Brasileira de Ciências, o qual possibilitou melhores condições financeiras para o desenvolvimento do projeto. Por fim, agradeço ao Instituto de Química e Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) pelo espaço concedido.

RESUMO

A resistência antimicrobiana é listada entre as 10 maiores ameaças à saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2023. Infecções bacterianas estão se tornando cada vez mais resistentes aos tratamentos convencionais, com estimativa de 10 milhões de mortes por ano até 2050. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) é uma abordagem promissora para enfrentar o aumento da resistência bacteriana. Por isso, neste trabalho propôs-se a síntese e avaliação biológica de dois derivados da Protoporfirina IX (PpIX) modificados estruturalmente com um ou dois fragmentos de capsaicina, um inibidor conhecido de bombas de efluxo NorA. Investigou-se as propriedades físico-químicas, fotofísicas e a fotoinativação destes novos compostos em bactérias sensíveis e resistentes, incluindo Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Os derivados foram obtidos com rendimentos de 17% para o derivado PpIX-capsaicina 1 (um fragmento de capsaicina) e 40% para o PpIX-capsaicina 2 (dois fragmentos de capsaicina), com o objetivo de aumentar a fotoinativação bacteriana por meio de um efeito sinérgico associado à maior incorporação celular. Os estudos fotofísicos e fotoquímicos incluíram a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência e oxigênio singlete, além da avaliação da fotodegradação dos compostos sob diferentes dispositivos de LEDs. As modificações estruturais resultaram em pequenas variações nas propriedades fotoquímicas em relação à PpIX, com destaque para a menor fotoestabilidade associada à maior produção de oxigênio singlete. Estudos de autoagregação em misturas de água/DMSO indicaram menor tendência de agregação para o derivado PpIX-capsaicina 1, enquanto o derivado PpIX-capsaicina 2 apresentou perfil com formação de diferentes tipos de agregados (tipo H e tipo J) em meio majoritariamente aquoso, semelhante à precursora PpIX. Em relação à lipofilicidade, um aumento significativo foi observado apenas no derivado com dois fragmentos de capsaicina. Por fim, os ensaios de fotoinativação mostraram maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, especialmente em *S. aureus* sensível, onde a redução de 2,9 logs foi obtida a partir do derivado 1, enquanto a PpIX resultou em uma inibição de 1,7 logs, com 1,2 μM a 30 J/cm². Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, apresentaram menor suscetibilidade, com uma redução de apenas 1,2 logs. Os resultados evidenciam o potencial dos derivados PpIX-capsaicina, em particular o PpIX-capsaicina 1, como candidatos promissores para a TFDA.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica antimicrobiana; resistência antibiótica, bombas de efluxo.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is listed among the top 10 global health threats by the World Health Organization (WHO) in 2023. Bacterial infections are becoming increasingly resistant to conventional treatments, with an estimated 10 million deaths per year projected by 2050. In this context, Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) emerges as a promising approach to combat the rise of bacterial resistance. Therefore, this study aimed to synthesize and evaluate the biological activity of two derivatives of Protoporphyrin IX (PpIX) structurally modified with one or two capsaicin fragments, a well-known inhibitor of the NorA efflux pump. The physicochemical, photophysical properties, and photoinactivation potential of these new compounds were investigated in both susceptible and resistant bacteria, including Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) strains. The derivatives were obtained with yields of 17% for PpIX-capsaicin 1 (one capsaicin fragment) and 40% for PpIX-capsaicin 2 (two capsaicin fragments), aiming to enhance bacterial photoinactivation through a synergistic effect associated with increased cellular uptake. Photophysical and photochemical studies included fluorescence and singlet oxygen quantum yield determinations, as well as the assessment of photodegradation under different LED devices. Structural modifications resulted in minor variations in photochemical properties compared to PpIX, with lower photostability linked to higher singlet oxygen production. Self-aggregation studies in water/DMSO mixtures indicated a lower tendency to aggregate for PpIX-capsaicin 1, whereas PpIX-capsaicin 2 exhibited the formation of different types of aggregates (H- and J-type) in predominantly aqueous media, similar to the precursor PpIX. Regarding lipophilicity, a significant increase was observed only in the derivative with two capsaicin fragments. Finally, photoinactivation assays showed greater efficacy against Gram-positive bacteria, particularly in susceptible *S. aureus*, where a 2.9-log reduction was obtained with derivative 1, while PpIX resulted in a 1.7-log reduction at 1.2 μM and 30 J/cm². Conversely, Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, showed lower susceptibility, with only a 1.2-log reduction. These findings highlight the potential of PpIX-capsaicin derivatives, particularly PpIX-capsaicin 1, as promising candidates for aPDT applications.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy; antibiotic resistance; efflux pumps.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação visual dos mecanismos de resistência bacterianos a nível celular..	18
Figura 2 - Esquema das reações tipo I e tipo II presentes na TFD.	20
Figura 3 - Alguns inibidores de bombas de efluxo de origem de Produtos Naturais.	23
Figura 4 - Estruturas básicas dos FSs das classes das fenotiazinas, porfirinas e curcumina..	23
Figura 5 - Estrutura do anel macrociclo básico de porfirinas.	25
Figura 6 - Estado triplete ($^3\text{O}_2$) e singlete ($^1\text{O}_2$) do oxigênio.	28
Figura 7 - Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol.	29
Figura 8 - Estrutura dos FS planejados: (A) PpIX, (B) derivado monoesterificado com um fragmento de capsaicina (PpIX-capsaicina 1) e (C) derivado diesterificado com dois fragmentos de capsaicina (PpIX-capsaicina 2).	31
Figura 9 - Planejamento das modificações no precursor PpIX a partir da esterificação com (1) um fragmento de capsaicina e (2) com dois fragmentos de capsaicina.	32
Figura 10 – (A) CCD feita durante a síntese (após 72h) das PpIX-capsaicina 1 e 2 . Mp : PpIX; M : misto da reação e material de partida (PpIX) e P : produto de reação (sem uso de revelador). (B) CCD feita após recuperação do sólido por meio de filtração, onde P : PpIX; M : misto de PpIX e sólido; S : sólido recuperado e C : capsaicina. Ambas feitas com diclorometano/metanol 95:5 (Revelado no UV).	33
Figura 11 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PpIX-capsaicina 2	34
Figura 12 - Ambientes químicos de cada hidrogênio do cromóforo PpIX atribuído aos deslocamentos vistos no RMN ^1H	35
Figura 13 - Ambientes químicos de cada hidrogênio da capsaicina e dihidrocapsaicina atribuídos aos deslocamentos vistos no RMN ^1H	35
Figura 14 - Espectros de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) da mistura de híbridos PpIX-capsaicina 2	37
Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de PpIX-capsaicina 1	38
Figura 16 - Espectro de massas do produto PpIX-capsaicina 2 acidificada com 1% de ácido fórmico e injetadas no espectrômetro de massas.	39
Figura 17 - Capsaicinóides majoritários em produtos de origem natural.	40
Figura 18 - Proposta de algumas estruturas presentes na mistura, a partir das moléculas protonadas do espectro de massas da Figura 15.	41
Figura 19 - Espectro de massas do produto PpIX-capsaicina 1 ressuspendido em 500 μL de metanol e injetado no espectrômetro de Massas.	43

Figura 20 - Proposta de algumas estruturas presentes na mistura, a partir das moléculas protonadas do espectro de massas da Figura 18.	44
Figura 21 - (A) CCD feita após 24h da síntese da porfirina PpIX-capsaicina 1 . D : PpIX-capsaicina 2 ; M : misto da reação e padrão de PpIX-capsaicina 2 ; R : produto de reação. (B) CCD após 72h de reação, onde P : PpIX-capsaicina 2 ; M : misto da reação e padrão de PpIX-capsaicina 2 ; R : produto de reação. Ambas feitas com diclorometano/metanol 95:5 (sem uso de revelador).	45
Figura 22 - Espectros de emissão do precursor PpIX e os derivados sintetizados PpIX-capsaicina 1 e 2 . ($\lambda_{exc} = 402$ nm, fenda 1 - 5 nm).	46
Figura 23 - Decaimento de fosforescência de $^1O_2$ em etanol. ($\lambda_{exc} = 400$ nm, Absorbância em 400 nm = 0,3).	48
Figura 24 - Espectro de absorção no visível dos derivados PpIX-capsaicina (A) 1 e (B) 2 em solventes de diferentes polaridades.	50
Figura 25 - Espectro de absorção no visível da PpIX-capsaicina 2 solubilizados em clorofórmio (linha preta) e DMSO (linha vermelha).	51
Figura 26 – Aumento da banda em 668 nm em função do tempo (0-15 min) vista para a PpIX-capsaicina 1 em clorofórmio.	51
Figura 27 - Espectros de absorção no visível da (A) PpIX-capsaicina 1 e (B) PpIX-capsaicina 2 em DMSO feitos num intervalo de 6 dias, à temperatura ambiente.	52
Figura 28 - Avaliação da estabilidade da PpIX-capsaicina 2 em clorofórmio armazenada em um (A) frasco transparente (B) e um frasco âmbar.	53
Figura 29 - Avaliação da estabilidade da PpIX-capsaicina 1 em clorofórmio armazenada em um (A) frasco transparente (B) e um frasco âmbar, com alterações visíveis em função do tempo e exposição à luz.	53
Figura 30 - Equilíbrio entre os ésteres da PpIX neutra e protonada.	54
Figura 31 - Espectros de absorbância UV-Vis da PpIX-capsaicina 1 antes e depois da adição de trietilamina em solução de coloração previamente alterada para verde.	54
Figura 32 - Absorção das bandas Q da PpIX antes e após a irradiação (A) na presença de ar (B) e da amostra desoxigenada.	55
Figura 33 - Espectros de absorbância no UV-Vis da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina 1 em função do aumento da concentração de HCl em metanol.	56
Figura 34 - Espectros de absorbância no UV-Vis da PpIX-capsaicina 1 a cada adição de HCl em metanol, onde (A) o monocation (pH = 4,69 – 3,77) e (B) dication (pH = 3,38 – 0,57) são formados.	57

Figura 35 - Espectros de absorbância no UV-Vis da PpIX-capsaicina 1 após a adição de HCl (linha preta) e após o experimento de estabilidade em clorofórmio (linha vermelha).	57
Figura 36 - Titulação espectrofotométrica da PpIX-capsaicina 1 em (A) e (C) pH = 4,69 – 3,77, referente ao equilíbrio da monoproteção ($\lambda_{\text{espécie neutra}} = 503 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{espécie monoproteonada}} = 573 \text{ nm}$), (B) e (D) pH = 2,22 – 0,57, referente ao equilíbrio de diproteção ($\lambda_{\text{espécie monoproteonada}} = 534 \text{ nm}$).	58
Figura 37 - Espectros de absorbância no UV-Vis da PpIX a cada adição de HCl em metanol, onde (A) pH = 4,69 – 4,15, (B) pH = 4,04 – 2,07 e (C) pH = 2,07 – 0,57, ocorre a diproteção.	59
Figura 38 - Titulação espectrofotométrica da PpIX-capsaicina 1 em (A) e (B) pH = 2,07 – 0,57, referente ao equilíbrio de diproteção ($\lambda_{\text{espécie monoproteonada}} = 534 \text{ nm}$).	60
Figura 39 - Espectros de absorção no UV-Vis da (A) PpIX (B) PpIX-capsaicina 1 e (C) PpIX-capsaicina 2 solubilizadas em água e DMSO em uma proporção de 1 a 100% (v/v).	61
Figura 40 - Sobreposição de emissão dos LEDs (A) Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$ à 10 cm de distância da amostra) e (B) Verde ($463,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$ à 15 cm de distância da amostra) utilizados com os espectros de absorção no UV-Vis de cada porfirina.	63
Figura 41 - Espectros obtidos a partir da fotodegradação a partir do LED Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$ à 10 cm de distância da amostra), registrados ao longo de 90 min da (A e D) PpIX, (B e E) PpIX-capsaicina 1 e (C e F) PpIX-capsaicina 2 em DMSO.	64
Figura 42 - Representação gráfica do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret em função do tempo de irradiação com LED Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$, 10 cm de distância) em DMSO.	65
Figura 43 - Espectros obtidos a partir da fotodegradação a partir do LED Verde ($463,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$, 15 cm de distância), registrados ao longo de 90 min da (A e D) PpIX, (B e E) PpIX-capsaicina 1 e (C e F) PpIX-capsaicina 2 em DMSO.	66
Figura 44 - Representação gráfica do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret em função do tempo de irradiação com LED Verde ($463,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$, 15 cm de distância) em DMSO.	67
Figura 45 - Gráficos do progresso de fotodegradação de cada FS, realizado em fontes de luz diferentes: (A) LED Branco ($0-70 \text{ J/cm}^2$) e (B) LED Verde ($0-5 \text{ J/cm}^2$).	67
Figura 46 - Representação visual dos valores de LogP calculados e dispostos na Tabela 4. O experimento foi realizado em triplicata ($n = 3$), e por isso as barras de erro representam desvio padrão. *** $p < 0,0001$ são diferenças estatisticamente significativas pelo teste ANOVA.	69
Figura 47 - Redução da população microbiana da <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX, (B) PpIX-capsaicina 1 e (C) PpIX-capsaicina 2 . Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média de dois experimentos ($n = 2$).	71

Figura 48 - Redução da população microbiana da <i>S. aureus</i> (ATCC BAA 44) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina 1 . Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média da duplicata ($n = 2$).	71
Figura 49 - Redução da população microbiana da <i>E. coli</i> (ATCC 25922), por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina 1 e (C) PpIX-capsaicina 2 . Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média de dois experimentos ($n = 2$).	72
Figura 50 - Redução da população microbiana da <i>E. coli</i> (ATCC BAA 198) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina 1 . Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média da duplicata ($n = 2$).	72
Figura 51 - Gráfico comparativo em barras da <i>S. aureus</i> sensível, <i>S. aureus</i> multirresistente (MDR), <i>E. coli</i> e <i>E. coli</i> multirresistente (MDR), tratadas na ausência de porfirina (CT) e na presença de PpIX e PpIX-capsaicina 1 na menor concentração (1,2 μ M), irradiada irradiadas com LED branco a 30 J/cm ² . As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n = 2$).	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese dos híbridos 1 e 2	33
Esquema 2 - Síntese do derivado 1	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) da capsaicina pureza 60% reportados na literatura (Oliveira Júnior, 2019) e analisados na PpIX-capsaicina 2 (400 MHz, CDCl_3) (Expansões – Figura 11), nos quais os sinais destacados em negrito são os deslocamentos específicos de cada capsaicinóide.....	35
Tabela 2 - Valores de rendimento quântico de emissão (Φ_{f}) das porfirinas em etanol ($\lambda_{\text{exc}} = 402$ nm, fenda 1 - 5 nm, Absorbância em 402 nm = 0,1).....	47
Tabela 3 - Valores de rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) e tempo de vida (τ_{Δ}) do $^1\text{O}_2$ gerado pelas porfirinas solubilizadas em etanol ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm, absorbância = 0,3).....	49
Tabela 4 - Valores de pKa da PpIX e PpIX-capsaicina 1 obtidos por titulação espectrofotométrica com HCl-metanol.....	60
Tabela 5 - Valores de LogP das porfirinas PpIX e derivados 1 e 2 obtidos pelo método " <i>shake-flask</i> ".....	69
Tabela 6 – Espectros de absorção no UV-Vis registrados durante a titulação para a protonação da PpIX-capsaicina 1 , $c = 16 \times 10^{-6}$ M.....	79
Tabela 7 - Espectros de absorção no UV-Vis registrados durante a titulação para a protonação da PpIX, $c = 10 \times 10^{-6}$ M.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1FS	Fotossensibilizador no estado fundamental
$^1\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado excitado
$^1\text{FS}_2^*$	Fotossensibilizador no segundo estado excitado
$^3\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado excitado triplete
ABC	do inglês <i><u>A</u>TP-<u>B</u>inding <u>C</u>assette</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHCl_3	Clorofórmio
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i><u>d</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtBr	Brometo de etídio
FS	Fotossensibilizador
HRMS	Espectrometria de Massas de alta resolução
LEDs	Diodos emissores de luz
MATE	do inglês <i><u>M</u>ultidrug <u>a</u>nd <u>t</u>oxic compound <u>e</u>xtrusion</i>
MFS	do inglês <i><u>M</u>ajor <u>F</u>acilitator <u>S</u>uperfamily</i>
PpIX	Protoporfirina IX
PpIX-capsaicina 1	Mistura de híbridos monoesterificados de Protoporfirina IX com capsaicinóides
PpIX-capsaicina 2	Mistura diesterificada de Protoporfirina IX com capsaicinóides
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RND	do inglês <i><u>R</u>esistance-<u>N</u>odulation-cell-<u>D</u>ivision</i>
SMR	do inglês <i><u>S</u>mall <u>M</u>ultidrug <u>R</u>esistance</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
UV-Vis	UV-Visível

τ_{Δ}	Tempo de meia-vida de $^1\text{O}_2$
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlete
Φ_f	Rendimento quântico de fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Resistência antimicrobiana e seus mecanismos	16
1.2	Terapia Fotodinâmica como nova perspectiva à resistência antimicrobiana	19
1.3	Resistência mediada por bombas de efluxo.....	21
1.4	Inibidores de bombas de efluxo combinados com FSs aplicados à TFDA	22
1.5	FSs da classe das porfirinas aplicados à TFDA	24
1.6	Propriedades fotofísicas de FSs porfirínicos e o impacto na fotoinativação microbiana.....	26
1.6.1	<i>Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de Oxigênio singlete (Φ_Δ)</i>	26
1.6.2	<i>Autoagregação e propriedades espectroscópicas.....</i>	28
1.6.3	<i>Fotodegradação de FSs</i>	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral.....	31
2.2	Objetivos Específicos	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1	Síntese dos híbridos de PpIX com capsaicina (1 e 2).....	32
3.2	Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ_Δ).....	45
3.3	Espectroscopia de absorção no UV-Visível dos derivados de PpIX-capsaicina....	49
3.4	Análise de estabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2 em diferentes solventes	52
3.5	Comportamento da PpIX-capsaicina 1 na presença de HCl e pKa	55
3.6	Autoagregação dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2 em meio aquoso	61
3.7	Fotoestabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2	63
3.8	Determinação do coeficiente de partição (LogP)	68
3.9	Inativação fotodinâmica das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>.....	69
4	CONCLUSÃO	74
5	METODOLOGIA.....	76
5.1	Informações Gerais.....	76
5.2	Síntese dos híbridos de Protoporfirina IX (PpIX) com capsaicina	76
5.3	Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ_Δ).....	77
5.4	Espectroscopia de absorção no UV-Visível dos híbridos de PpIX-capsaicina 1 e 2	

5.5	Análise de estabilidade química em diferentes solventes para os derivados 1 e 2	78
5.6	Comportamento da PpIX-capsaicina 1 na presença de HCl e pKa	79
5.7	Autoagregação dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2 em meio aquoso	81
5.8	Fotoestabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2	81
5.9	Determinação do coeficiente de partição (LogP)	82
5.10	Inativação fotodinâmica das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	82
6	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é um dos maiores desafios globais de saúde (WHO, 2021). O aumento de bactérias multirresistentes tem reduzido significativamente a eficácia dos tratamentos convencionais, destacando a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) é uma estratégia promissora no combate a patógenos resistentes (Liu, 2015).

A TFDA baseia-se na interação entre uma molécula fotossensibilizadora, luz e oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem a destruição de microrganismos de forma direcionada (Correia *et al.*, 2021). Uma de suas principais vantagens é a baixa propensão ao desenvolvimento de resistência, uma vez que os mecanismos de ação envolvem múltiplos alvos celulares (Liu, 2015). Além disso, a terapia pode ser aplicada de forma localizada, minimizando danos aos tecidos saudáveis e reduzindo os efeitos colaterais (Correia *et al.*, 2021).

Essa abordagem oferece um potencial para superar as limitações dos tratamentos antimicrobianos tradicionais, posicionando-se como uma possível ferramenta no enfrentamento à resistência antimicrobiana.

1.1 Resistência antimicrobiana e seus mecanismos

A resistência antimicrobiana ocorre quando microrganismos: bactérias, fungos, parasitas e vírus, evoluem a ponto de se tornarem resistentes aos medicamentos antimicrobianos, como antibióticos, usados para tratar essas infecções (WHO, 2021). A Resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações globais no século XXI, devido ao aumento das taxas de infecções resistentes e à falta de novos medicamentos antimicrobianos sendo desenvolvidos para combatê-las (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015).

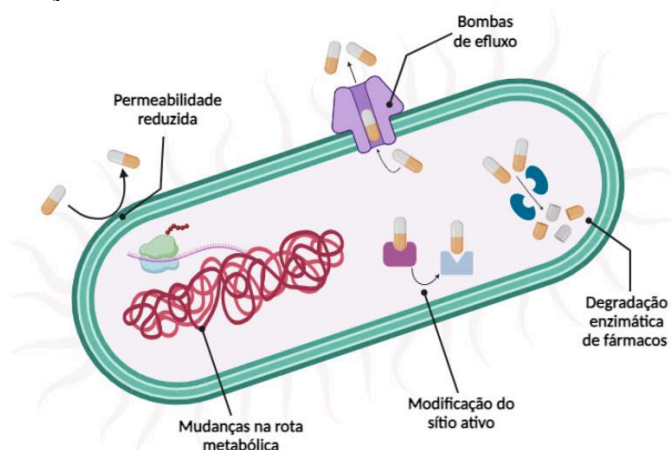
O relatório de 2022 do Sistema Global de Vigilância da Resistência e do Uso de Antimicrobianos (GLASS) destaca taxas alarmantes de resistência entre patógenos bacterianos prevalentes. As taxas reportadas em 76 países foram de 42% para *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração e 35% para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (WHO, 2022). Para infecções do trato urinário causadas por *E. coli*, 1 em cada 5 casos apresentou redução na suscetibilidade a antibióticos padrão, como ampicilina, co-trimoxazol e fluoroquinolonas, em 2020 (WHO, 2022). Isso tem dificultado o tratamento eficaz de infecções comuns.

Klebsiella pneumoniae, uma bactéria intestinal comum, também apresentou níveis elevados de resistência a antibióticos essenciais (WHO, 2022). O aumento da resistência pode levar a um maior uso de medicamentos de última linha, como os carbapenêmicos, para os quais a resistência tem sido observada em diversas regiões (WHO, 2022). Com a eficácia desses antibióticos de última linha comprometida, cresce o risco de infecções intratáveis. Projeções da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) indicam uma duplicação esperada da resistência a antibióticos de última linha até 2035, em comparação com os níveis de 2005, destacando a necessidade urgente de práticas robustas de gestão antimicrobiana e de uma ampliação da vigilância global (WHO, 2022).

Um dos principais fatores que contribuem para o problema atual consiste no uso excessivo ou inadequado de antibióticos em diversas situações, principalmente no tratamento clínico, assim como na agricultura, cuidados veterinários e na cadeia de produção de alimentos (Llor; Bjerrum, 2014). Sem medidas preventivas adequadas, estima-se que até 2050 a resistência antimicrobiana possa se tornar a principal causa de morte no mundo (Dadgostar, 2019; Morrison; Zembower, 2020). De acordo com estimativas, o número de mortes diretamente atribuídas à resistência antimicrobiana aumentou para cerca de mais de 1,2 milhão em 2019 e prevê-se que esse número chegue a aproximadamente 10 milhões de mortes por ano até 2050, caso não seja controlada (Dadgostar, 2019).

Nas células bacterianas, quatro mecanismos diferentes podem resultar em resistência aos fármacos, como retratado na Figura 1: (1) diminuição da absorção ou acúmulo de fármacos devido à menor permeabilidade da membrana ou maior expressão de bombas de efluxo; (2) inativação ou modificação dos fármacos por enzimas que destroem ou alteram medicamentos; (3) alteração do alvo ou sítio ativo que se liga ao fármaco; (4) mudança nas rotas metabólicas, que pode ser exemplificado pela habilidade de *Enterococcus* de obter ácido fólico por meio de rotas alternativas a fim de contornar os efeitos das sulfonamidas (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020; Morrison; Zembower, 2020; Nainu *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação visual dos mecanismos de resistência bacterianos a nível celular.



Fonte: Adaptado de (Da Cunha *et al.*, 2025).

Considerando os dois mecanismos que se situam nas membranas das bactérias, a permeabilidade limitada e superexpressão de bombas de efluxo, sabe-se que bactérias Gram-negativas possuem permeabilidade limitada devido à presença de uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos. A permeabilidade dessa membrana é mediada por proteínas especiais chamadas porinas, que formam canais específicos para a passagem de antibióticos hidrofílicos para o interior da célula. Esta barreira seletiva é responsável pela resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas a antibióticos como penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

As bombas de efluxo, que são canais de transporte ativo nas membranas, desempenham um papel crucial na resistência antimicrobiana. Elas expulsam moléculas tóxicas para fora da célula, contribuindo para a resistência a diversos antibióticos. A resistência às tetraciclinas em *Escherichia coli*, por exemplo, resulta da atividade dessas bombas de efluxo. Como a maioria dos sistemas de efluxo têm vários substratos, eles podem levar à multirresistência. Essas bombas são codificadas cromossomicamente, o que pode explicar a resistência intrínseca de alguns microrganismos a determinados fármacos (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020).

A rápida reprodução bacteriana leva a mudanças evolutivas em curtos períodos. Desse modo, a exposição e o uso inadequado de antibióticos geram uma pressão seletiva, o que favorece a sobrevivência de bactérias resistentes (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020; Morrison; Zembower, 2020). Microrganismos multirresistentes resultam de múltiplos mecanismos de resistência, dificultando ainda mais o tratamento, o que torna necessária a existência de tratamentos alternativos capazes de contornar tais problemas.

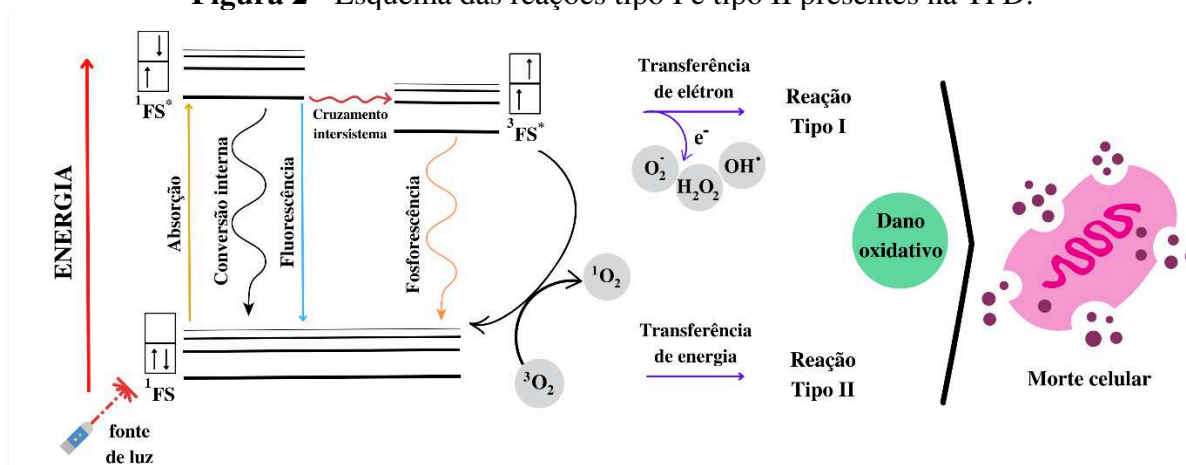
1.2 Terapia Fotodinâmica como nova perspectiva à resistência antimicrobiana

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento que envolve a interação entre um fotossensibilizador (FS), luz em um comprimento de onda específico e oxigênio molecular para destruir tecidos alvo. O FS, por si só, não reage com biomoléculas, mas ao ser iluminado transfere energia ao oxigênio molecular (O_2), gerando EROs como oxigênio singlete ($^1O_2$) radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs provocam reações fotoquímicas que induzem a morte celular (Correia *et al.*, 2021).

O mecanismo das reações fotodinâmicas (Figura 2) inicia-se com a absorção de luz pelo fotossensibilizador (FS), promovendo sua excitação do estado fundamental ^1FS para um estado singlete excitado $^1FS^*$. Esse estado é instável e tem uma duração de apenas alguns nanossegundos, retornando ao estado fundamental por meio da emissão de fluorescência ou dissipação de energia na forma de calor. Entretanto, uma fração das moléculas excitadas pode sofrer conversão intersistemas, originando um estado triplete excitado de menor energia $^3FS^*$, que apresenta um tempo de vida mais longo (na escala de microssegundos) devido à necessidade de inversão de spin durante o decaimento (Correia *et al.*, 2021).

Esse estado triplete pode interagir com moléculas de oxigênio molecular $^3O_2$, transferindo energia e gerando oxigênio singlete $^1O_2$, caracterizando a reação do tipo II. O oxigênio singlete é altamente reativo e promove danos oxidativos às biomoléculas, resultando na morte celular. Já na reação do tipo I, o FS excitado reage diretamente com substratos biológicos, gerando radicais livres que, ao interagirem com o oxigênio molecular, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo para o estresse oxidativo e a morte celular (Correia *et al.*, 2021).

Figura 2 - Esquema das reações tipo I e tipo II presentes na TFD.



Fonte: Adaptado de (Da Cunha *et al.*, 2025).

Os produtos formados nas reações tipo I e II são responsáveis pelo efeito da TFD e podem ocorrer simultaneamente nas células, onde, geralmente, a reação tipo II predomina, com o ¹O₂ sendo o principal agente citotóxico. Nas células, a TFD causa destruição celular por apoptose e necrose, além de estimular uma resposta inflamatória, ativando o sistema imunológico e a produção de anticorpos (Correia *et al.*, 2021).

A TFD tem se destacado como uma abordagem eficaz contra infecções bacterianas, principalmente devido à ausência de surgimento de mecanismos de resistência adquirida após o tratamento. Diferentemente dos antibióticos convencionais, que geralmente têm alvos moleculares únicos e bem definidos, a TFDA promove a geração de EROs que danificam múltiplas estruturas celulares e vias metabólicas nas bactérias (Liu, 2015). Essa ampla ação dificulta o desenvolvimento de mecanismos adaptativos eficazes pelos microrganismos.

Além disso, o curto intervalo entre a administração do FS e a irradiação com luz reduz a oportunidade para a evolução de resistência (Schastak *et al.*, 2010). A natureza não tóxica dos FSs na ausência de luz também minimiza a pressão seletiva, enquanto o dano generalizado causado pela TFDA muitas vezes impede que adaptações sejam transmitidas para futuras gerações (Schastak *et al.*, 2010). No entanto, entre os poucos mecanismos que podem interferir na eficácia da TFDA, as bombas de efluxo se destacam. Esses sistemas transportadores são capazes de reduzir o acúmulo intracelular de FSs, comprometendo a atuação das EROs e, consequentemente, o sucesso do tratamento (Liu, 2015; Tegos; Hamblin, 2006).

1.3 Resistência mediada por bombas de efluxo

As bombas de efluxo são canais de transporte presentes na membrana celular, e atuam expelindo uma ampla gama de compostos prejudiciais, incluindo antibióticos, detergentes, corantes e toxinas (Marquez, 2005; Webber; Piddock, 2003). Esses sistemas estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da resistência antimicrobiana, representando um desafio significativo para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. O primeiro relato documentado de resistência mediada por bombas de efluxo ocorreu na década de 1970, envolvendo resistência à tetraciclina em *Escherichia coli* (Ball; Chopra; Eccles, 1977; Ball; Shales; Chopra, 1980; Levy; Mcmurry, 1978). Desde então, diversos sistemas de efluxo associados à resistência a antibióticos foram identificados tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Essas bombas podem ser específicas para um único tipo de molécula ou apresentar um espectro amplo, expulsando compostos estruturalmente diversos (Cox; Wright, 2013). Muitas delas estão associadas à resistência a múltiplos fármacos, uma vez que transportam substâncias não relacionadas, incluindo toxinas produzidas pelo hospedeiro (Christaki; Marcou; Tofarides, 2020; Piddock, 2006). A resistência a múltiplos fármacos está associada a cinco classes principais de bombas de efluxo: três dependem de gradientes de prótons: as superfamílias RND (do inglês *Resistance-Nodulation-cell-Division*), MFS (do inglês *Major Facilitator Superfamily*) e SMR (do inglês *Small Multidrug Resistance*), enquanto a quarta classe inclui os transportadores MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), que utilizam gradientes de íons Na⁺. A quinta classe é composta pelas bombas da família ABC (*ATP-Binding Cassette*), que empregam a hidrólise de ATP como fonte de energia para transporte ativo (AlMatar *et al.*, 2021; Nainu *et al.*, 2021).

Esses sistemas são especialmente problemáticos em bactérias Gram-negativas, onde as bombas de efluxo, como AcrAB-TolC em *E. coli* e MexAB-OprM em *Pseudomonas aeruginosa*, contribuem para a resistência a antibióticos como fluoroquinolonas, β -lactâmicos e tetraciclina (AlMatar *et al.*, 2021; Cernicchi; Felicetti; Sabatini, 2021; Li; Plésiat; Nikaido, 2015; Seukep *et al.*, 2022; Sharma; Gupta; Pathania, 2019). Em Gram-positivas, as bombas NorA, PmrA e EmeA são exemplos de sistemas que dificultam o tratamento com compostos como fluoroquinolonas e compostos de amônio quaternário (Poole, 2005; Schindler; Kaatz, 2016). No contexto da TFDA, essas bombas limitam a eficácia do tratamento ao reduzir o acúmulo intracelular de FSs e, conseqüentemente, o desbalanço redox intracelular almejado a partir das EROs (Tegos; Hamblin, 2006).

1.4 Inibidores de bombas de efluxo combinados com FSs aplicados à TFDA

Inibidores de bombas de efluxo são compostos capazes de inibir o efluxo ativo de substâncias. Quando combinados com antibióticos ou FSs, oferecem uma estratégia eficaz no combate às infecções bacterianas. Esses inibidores podem restaurar a sensibilidade aos antibióticos, prolongar sua eficácia, aumentar sua potência, ampliar o espectro de ação e reduzir o desenvolvimento de resistência. Para serem considerados candidatos ideais, os inibidores de bombas de efluxo devem atender a três critérios principais: (a) apresentar um perfil de toxicidade seguro, (b) demonstrar seletividade para alvos específicos das bombas de efluxo e (c) ser compatíveis com a via de administração proposta (Connell *et al.*, 2003; Dancer; Shears; Platt, 1997).

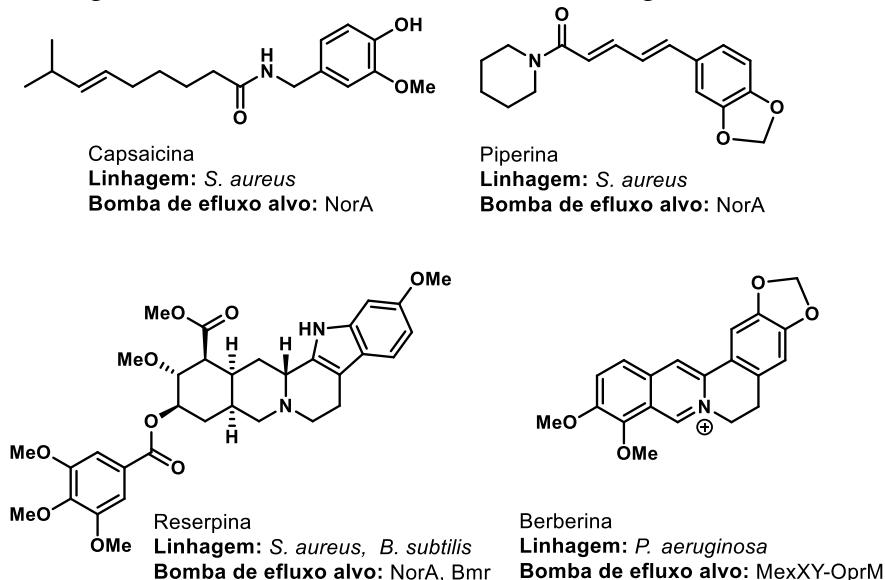
As plantas medicinais apresentam um potencial como fonte de inibidores naturais de bombas de efluxo, devido à ampla variedade de metabólitos secundários quimicamente e estruturalmente diversos com propriedades farmacológicas distintas. Diversos estudos têm demonstrado que extratos vegetais contêm compostos capazes de inibir bombas de efluxo tanto em bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (Seukep *et al.*, 2020). Essa inibição contribui para restaurar a eficácia dos antibióticos, garantindo que alcancem concentrações bactericidas no interior das células bacterianas.

Entre os compostos derivados de plantas, os alcaloides destacam-se como uma classe significativa de inibidores de bombas de efluxo, com exemplos notáveis como capsaicina, piperina, reserpina e berberina (Figura 3) (Kalia *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2006; Sangwan *et al.*, 2008). Desses produtos naturais, todos, exceto a berberina, atuam como inibidores da bomba de efluxo NorA em *S. aureus*. A capsaicina e a piperina demonstraram aumentar significativamente a eficácia da ciprofloxacina de forma sinérgica, reduzindo a dosagem necessária do antibiótico para alcançar o efeito antibacteriano desejado. Essa interação sinérgica foi confirmada pelo aumento na acumulação intracelular de brometo de etídio (EtBr), indicando que esses compostos inibem efetivamente as bombas de efluxo, aumentando a retenção da ciprofloxacina no interior das células bacterianas (Kalia *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2006; Sangwan *et al.*, 2008).

O EtBr é uma molécula que atravessa passivamente a membrana celular e se acumula no interior da célula bacteriana, onde se intercala ao DNA e emite fluorescência quando excitado por luz ultravioleta. No entanto, muitas bactérias possuem bombas de efluxo que removem ativamente o EtBr, reduzindo sua fluorescência intracelular. Dessa forma, a inibição

dessas bombas por compostos como a capsaicina e a piperina pode ser monitorada pelo aumento da fluorescência intracelular do EtBr, validando seu papel como moduladores da resistência bacteriana (Kalia *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2006; Sangwan *et al.*, 2008).

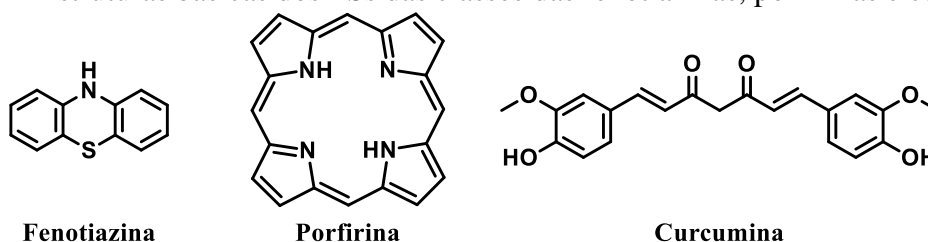
Figura 3 - Alguns inibidores de bombas de efluxo de origem de Produtos Naturais.



Fonte: Autora (2024).

Na TFDA, a combinação de inibidores de bombas de efluxo com FSs tem sido uma estratégia empregada para superar essas barreiras da resistência intrínseca a algumas classes desses compostos (Rineh *et al.*, 2017; Tegos *et al.*, 2008). FSs da classe das fenotiazinas (Figura 4), por exemplo, atuam como substratos das bombas NorA na Gram-positiva *S. aureus* e têm sua eficácia aumentada na fotoinativação bacteriana quando combinados com inibidores conhecidos (Rineh *et al.*, 2017; Tegos *et al.*, 2008; Tegos; Hamblin, 2006). Em bactérias Gram-negativas, particularmente em *P. aeruginosa*, o mesmo padrão foi observado (Tegos *et al.*, 2008). Apesar disso, a combinação de FSs com inibidores de bombas em Gram-negativas ainda é uma área pouco explorada, com a maioria dos estudos focados nos mecanismos de resistência intrínseca da bomba NorA em Gram-positivas.

Figura 4 - Estruturas básicas dos FSs das classes das fenotiazinas, porfirinas e curcumina.



Fonte: Autora (2024).

Porfirinas (Figura 4) também são possíveis substratos de bombas de efluxo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sulek *et al.*, 2020). Na *E. coli*, a captação e o efluxo de porfirinas parecem ser regulados pelo sistema TolC (Tatsumi; Wachi, 2008). Estudos, como o de Sulek *et al.*, avaliaram o efeito de combinar porfirinas com Verapamil, um bloqueador de canais de íons de cálcio e magnésio. A combinação demonstrou efeitos bactericidas melhorados contra *S. aureus* e *E. coli*, embora o mecanismo exato e a bomba inibida permaneçam pouco explorados (Sulek *et al.*, 2020).

Outro FS aplicado na TFDA é a curcumina (Figura 4), que também é conhecido como substrato da bomba NorA em *S. aureus* (Joshi *et al.*, 2014). Apesar de seu potencial como agente fotossensibilizador e inibidor de bombas, seu papel na melhoria da eficácia da TFDA ainda é pouco explorado.

Essas descobertas destacam a necessidade de ampliar os estudos sobre o papel das bombas de efluxo na resistência a FSs. Estratégias que combinem inibidores de bombas de efluxo com compostos como fenotiazinas, porfirinas e curcumina, entre outros FSs não explorados, representam caminhos para otimizar a TFD e para oferecer alternativas frente a resistência bacteriana, especialmente em linhagens Gram-negativas, que são um dos maiores desafios no combate às infecções resistentes.

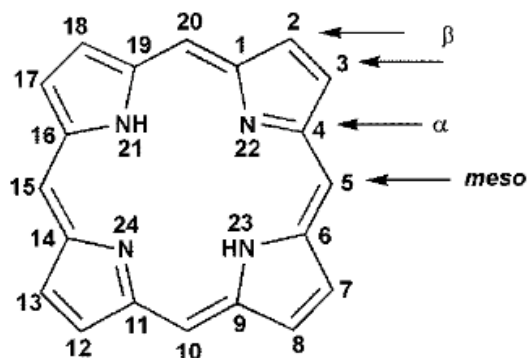
1.5 FSs da classe das porfirinas aplicados à TFDA

As porfirinas são uma classe de pigmentos fluorescentes e cristalinos, de origem natural ou sintética, conhecidas por suas cores vibrantes. Estruturalmente, possuem um anel macrocíclico aromático formado por quatro unidades do tipo pirrólico, conectadas por quatro grupos metino (indicado pelos números 5, 10, 15, 20) nas posições α (indicadas pelos números 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19), indicado na Figura 5 (Amos-Tautua; Songca; Oluwafemi, 2019).

Esses compostos são amplamente utilizados na TFD devido à sua alta absortividade molar, proporcionada pela extensa deslocalização eletrônica em sua estrutura macrocíclica, e ao seu rendimento quântico relativamente alto do estado excitado tripleto (Weijer *et al.*, 2015). Além disso, a estrutura das porfirinas é altamente modificável, permitindo alterações nos grupos laterais ou a introdução de metais no macrociclo (Amos-Tautua; Songca; Oluwafemi, 2019). A porfirina pode sofrer diversos tipos de reações (substituição eletrofílica, substituição nucleofílica, adição radicalar ou nucleofílica), nos quais os carbonos meso-(5,10,15,20) e beta-pirrólicos (2,3,7,8, 12,13,17,18) participam das reações (Iglesias, 2012). Sua ação fotodinâmica

segue, geralmente, o mecanismo tipo II, resultando na geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Tavares *et al.*, 2011).

Figura 5 - Estrutura do anel macrociclo básico de porfirinas.



Fonte: Adaptado de (Iglesias, 2012).

Na TFDA, as porfirinas têm sido amplamente aplicadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando significativa inibição do crescimento bacteriano em concentrações baixas. (Amos-Tautua; Songca; Oluwafemi, 2019). A eficácia das porfirinas em bactérias está intimamente relacionada à quantidade de cargas positivas, que facilita sua incorporação nas células bacterianas e interação com alvos intracelulares, como proteínas, que podem sofrer danos enzimáticos, ou DNA, o que leva a lesões genéticas (Alves *et al.*, 2014; Hanakova *et al.*, 2014; Lambrechts *et al.*, 2007). Entre as porfirinas catiônicas, os derivados tetracatiônicos têm se mostrado especialmente eficazes, enquanto as formas di- e monocatiônicas são geralmente menos potentes (Alves *et al.*, 2014). Por outro lado, porfirinas neutras ou aniônicas apresentam eficácia limitada contra bactérias Gram-negativas devido à fraca interação com a membrana externa bacteriana, constituída por lipopolissacarídeos (Orenstein *et al.*, 1997; Sulek *et al.*, 2020).

Estudos com porfirinas catiônicas em modelos de membranas Gram-negativas revelaram que porfirinas com três ou quatro cargas positivas permanecem quase planas em relação à bicamada fosfolipídica. Em contrapartida, porfirinas com duas cargas positivas adjacentes exibem uma imersão mais profunda na membrana, devido à penetração dos grupos fenólicos ligados ao anel porfirínico, enquanto os grupos piridínio carregados positivamente permanecem próximos à região polar dos fosfolipídios (Cordeiro; Miotto; Baptista, 2012). Assim, fatores como o número de cargas, grau de hidrofobicidade e arranjo espacial dos substituintes influenciam significativamente a ligação e a internalização do fotossensibilizador nas células bacterianas (Alves *et al.*, 2014).

A eficácia da TFDA baseada em porfirinas neutras é diretamente influenciada pela membrana externa. Estudos com hematoporfirina demonstraram que concentrações de 0,1–1 mg/L inativam quase 99,9% das bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium acnes* e *E. hirae*, em até 10 minutos de exposição à luz branca (Bertoloni *et al.*, 1984; Venezio *et al.*, 1985). Em contrapartida, bactérias Gram-negativas mostraram maior resistência a esses tratamentos (Nitzan; Ladan; Malik, 1987; Venezio *et al.*, 1985).

Desta forma, as porfirinas representam uma classe promissora de compostos fotossensibilizadores na TFDA, graças à sua estrutura altamente adaptável, propriedades fotofísicas favoráveis e eficácia contra uma ampla gama de microrganismos. A capacidade de modificar grupos funcionais e introduzir cargas positivas em sua estrutura permite otimizar sua interação com membranas bacterianas, ampliando sua ação, especialmente contra bactérias Gram-negativas, que apresentam maior resistência devido à presença de uma membrana externa.

1.6 Propriedades fotofísicas de FSs porfirínicos e o impacto na fotoinativação microbiana

A TFDA é uma abordagem promissora no combate a infecções microbianas, especialmente em um cenário de crescente resistência aos antibióticos. Para maximizar sua eficácia, é essencial compreender as propriedades fotofísicas dos FSs, que desempenham um papel central na geração de EROs (Sulek *et al.*, 2020). Parâmetros como rendimento quântico (Φ_f), rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ), comportamento das bandas espectrais no UV-Visível (UV-Vis) em soluções aquosas e estabilidade à fotodegradação são fundamentais para avaliar e otimizar o desempenho dos FS (Myrzakhmetov *et al.*, 2021; Sulek *et al.*, 2020). Essas características não apenas influenciam a eficiência na produção de EROs, mas também ajuda a prever o comportamento do FS em ambiente fisiológico. Assim, o estudo detalhado dessas propriedades é indispensável para o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais eficazes e seguros, capazes de atender às exigências da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

1.6.1 Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de Oxigênio singlete (Φ_Δ)

Avaliar propriedades fotofísicas de FSs é fundamental para otimizar sua aplicação na TFD. O rendimento quântico é a razão entre o número de eventos (exemplo: fluorescência, estado excitado triplete, oxigênio singlete) e o número total de fótons absorvidos por um FS. Ele quantifica a eficiência de um processo fotoquímico ou fotofísico, como a emissão de

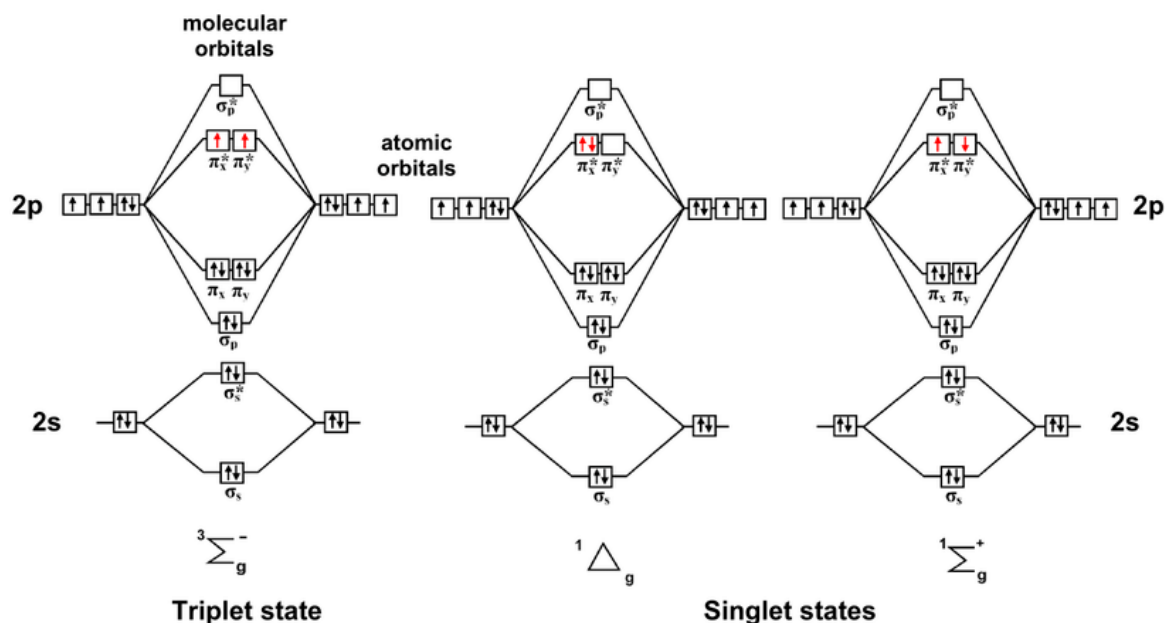
fluorescência, a conversão para o estado tripleto ou a geração de oxigênio singleto (Myrzakhmetov *et al.*, 2021; Sulek *et al.*, 2020). Um FS com alto rendimento quântico do estado excitado tripleto é mais eficaz na geração de EROs (Sulek *et al.*, 2020). Portanto, avaliar essas propriedades permite selecionar compostos mais eficientes e direcionar modificações estruturais que maximizem sua capacidade de fotoinativação.

A fluorescência é um processo de transição radiativa em que uma molécula no estado excitado retorna ao estado fundamental emitindo um fóton. Essa transição, que ocorre entre estados de mesma multiplicidade de spin (permitida por spin), acontece em escalas de tempo que variam de 10^{-10} a 10^{-7} segundos. Geralmente, a fluorescência é emitida do primeiro estado excitado ($^1\text{FS}^*$) para o estado fundamental (^1FS), mesmo quando a molécula inicialmente absorve radiação e alcança o segundo estado excitado ($^1\text{FS}_2^*$). Isso ocorre devido ao processo de conversão interna ($^1\text{FS}_2^* \rightarrow ^1\text{FS}^*$), que precede a emissão de fluorescência. A energia emitida no processo $^1\text{FS}^* \rightarrow ^1\text{FS}$ é menor que a energia absorvida no processo $^1\text{FS} \rightarrow ^1\text{FS}^*$, uma vez que parte da energia é dissipada através de relaxação vibracional no estado excitado. Essa diferença, dependente do meio em que a molécula está inserida, é avaliada pelo deslocamento de Stokes, definido pela diferença entre os máximos de absorção ($^1\text{FS} \rightarrow ^1\text{FS}^*$) e emissão de fluorescência ($^1\text{FS}^* \rightarrow ^1\text{FS}$), medidos em números de onda (Gerola, 2013).

O rendimento quântico de oxigênio singleto também é essencial, pois determina a proporção de EROs gerada pelo FS que é convertida especificamente em oxigênio singleto, espécie produzida a partir de reações de tipo II (Correia *et al.*, 2021). A alta eficiência na produção desse agente oxidante está diretamente relacionada ao sucesso da TFD, pois ele promove danos irreversíveis a biomoléculas essenciais, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos das células microbianas (Myrzakhmetov *et al.*, 2021; Sulek *et al.*, 2020).

Com base no diagrama de orbitais moleculares, representado na Figura 6, o oxigênio no estado fundamental apresenta configuração tripleto ($^3\text{O}_2$), em que dois elétrons com spins paralelos ($+\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$) ocupam orbitais π^* degenerados, conferindo ao oxigênio propriedades paramagnéticas e estabilidade. Por outro lado, o oxigênio singleto apresenta duas formas eletrônicas: $^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$. A primeira é energeticamente mais elevada e menos estável, enquanto a segunda possui maior estabilidade devido ao menor nível energético. Os níveis de energia dessas formas são 37,5 kcal/mol e 22 kcal/mol acima do estado fundamental, respectivamente.

Figura 6 - Estado triplete ($^3\text{O}_2$) e singlete ($^1\text{O}_2$) do oxigênio.



Fonte: Adaptado de (Scholz, 2011).

Em condições experimentais, a forma $^1\Sigma_g^+$ decai rapidamente para $^1\Delta_g$, que possui um tempo de vida mais longo (2–4 μs em H_2O) e maior interesse biológico, sendo frequentemente referida como $^1\text{O}_2$ (Rocha, 2018). Essa forma de oxigênio singlete é altamente eletrofílica, interagindo eficientemente com substratos nucleofílicos, oxidando biomoléculas e comprometendo suas funções biológicas (Rocha, 2018; Sulek *et al.*, 2020).

Desta forma, a avaliação dessas propriedades fotofísicas é essencial para a TFD, permitindo identificar compostos mais eficientes e otimizar sua eficácia na geração de EROs, especialmente o $^1\text{O}_2$. Parâmetros como o de rendimento quântico de fluorescência fornecem informações críticas sobre a eficiência da absorção de luz e os mecanismos de dissipação de energia, enquanto a análise do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ destaca a capacidade do FS em produzir agentes oxidantes altamente reativos.

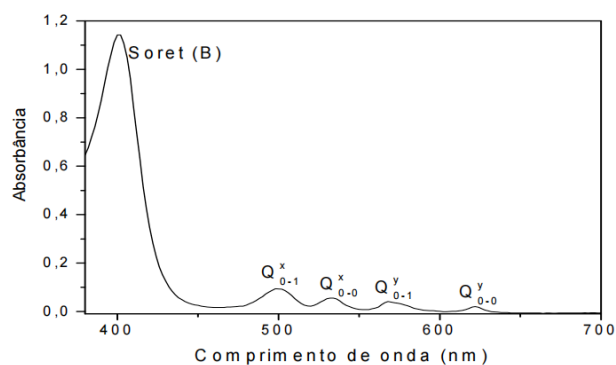
1.6.2 Autoagregação e propriedades espectroscópicas

Porfirinas são frequentemente estudadas a partir da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis, devido à capacidade desses compostos de absorverem luz nessa faixa de comprimento de onda. As bandas detectadas correspondem às transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis pirrólicos, envolvendo dois orbitais HOMO e dois orbitais LUMO (Acunha, 2017; Gouterman, 1961). A banda Soret, localizada na faixa de absorção no azul, é atribuída à transição eletrônica $^1\text{FS} \rightarrow ^1\text{FS}_2^*$, enquanto a banda Q, na faixa de absorção no vermelho,

corresponde à transição $^1\text{FS} \rightarrow ^1\text{FS}^*$ (Gerola, 2013; Weiss, 1978). A excitação eletrônica desses compostos geralmente ocorre por meio da banda Q (Simplicio; Maionchi, 2002).

A banda Soret, situada a 400 nm (Figura 7), apresenta uma absortividade molar elevada, da ordem de $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, enquanto as bandas Q, situadas entre 500 e 700 nm, exibem uma absortividade molar menor, em torno de $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Gerola, 2013; Myrzakhmetov *et al.*, 2021).

Figura 7 - Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol.



Fonte: Adaptado de (Gerola, 2013).

Esse perfil de espectro de absorção pode sofrer alterações em função de condições experimentais, como a concentração, o tipo de solvente em que é solubilizado e o pH do meio. Esses fatores podem acarretar processos de autoagregação, que ocorre a partir da associação ou aglomeração de moléculas em solução. A agregação reduz de forma significativa a eficiência fotodinâmica de um FS, limitando sua capacidade de absorver luz e comprometendo a produção de EROs (Gerola, 2013).

A auto-organização ou agregação de FSs em meios aquosos pode ocorrer por diversas razões e é favorecida em FS anfifílicos, resultando em uma atividade reduzida na TFD devido à diminuição da capacidade de se formar estados excitados na forma agregada (Bonneau; Vever-Bizet, 2008; Mojzisoava; Bonneau; Brault, 2007). As propriedades físico-químicas dos agregados diferem das dos monômeros. Para porfirinas, agregados apresentam uma banda de Soret alargada e bandas Q deslocadas para o vermelho nos espectros de absorção UV-visível, baixa intensidade e tempo de vida de fluorescência (Eichwurz, 2000; Kelbauskas; Dietel, 2002; Margalit; Cohen, 1983; Margalit; Rotenberg, 1984; Roeder; Wabnitz, 1987; Shiah *et al.*, 1998), além de baixa produção de $^1\text{O}_2$ (Myrzakhmetov *et al.*, 2021).

1.6.3 Fotodegradação de FSs

A fotodegradação de FSs é um processo no qual a exposição à luz leva à degradação química da molécula, resultando na perda de sua estrutura eletrônica conjugada (Ericson *et al.*, 2003; Gerola, 2013). Esse fenômeno ocorre devido à absorção de fótons, que promove a molécula a estados excitados, facilitando reações que rompem ligações ou alteram a estrutura do sistema conjugado. A perda de conjugação afeta diretamente as propriedades ópticas do FS, o que resulta na diminuição de absorção na região do visível (Ericson *et al.*, 2003; Gerola, 2013).

A fotodegradação é um aspecto fundamental a ser considerado na aplicação de FSs, pois está diretamente associada à estabilidade do composto durante a irradiação. FSs que se degradam rapidamente sob iluminação podem ter sua eficácia terapêutica reduzida antes de alcançar o efeito desejado (Ericson *et al.*, 2003; Gerola, 2013; Sulek *et al.*, 2020). No entanto, em certos casos, uma fotodegradação controlada pode ser vantajosa, permitindo a eliminação do FS após o tratamento e minimizando potenciais efeitos adversos no organismo.

Esse fenômeno, frequentemente decorrente da autogeração de EROs sob irradiação, representa um desafio para a estabilidade de compostos fotossensibilizadores (Costa *et al.*, 2012). A partir da reação Estudos mostram que FSs com menor energia no orbital molecular mais alto ocupado (HOMO) apresentam maior fotoestabilidade (Arnaut, 2011), o que os torna menos suscetíveis a processos de foto-oxidação e foto-transformação. Essa característica permite o uso de doses de luz mais elevadas e tempos de irradiação prolongados, otimizando a eficácia terapêutica.

Estudos acerca dos mecanismos de fotodegradação destacam a complexidade do processo. Inhoffen *et al.* descreveram um mecanismo para a reação da PpIX-dimetiléster com O₂ durante a irradiação em diclorometano, envolvendo uma adição 1,4 de O₂ ao anel pirrólico substituído por vinila da molécula (Inhoffen; Brockmann; Bliesener, 1969). Cox e colaboradores descreveram o processo de fotodegradação, ou fotobranqueamento, como um fenômeno foto-oxidativo, no qual diferentes rendimentos de fotoprodutos são obtidos dependendo da solução utilizada (Cox; Whitten, 1982). Em todos os casos, a oxidação do PpIX é central nos mecanismos propostos.

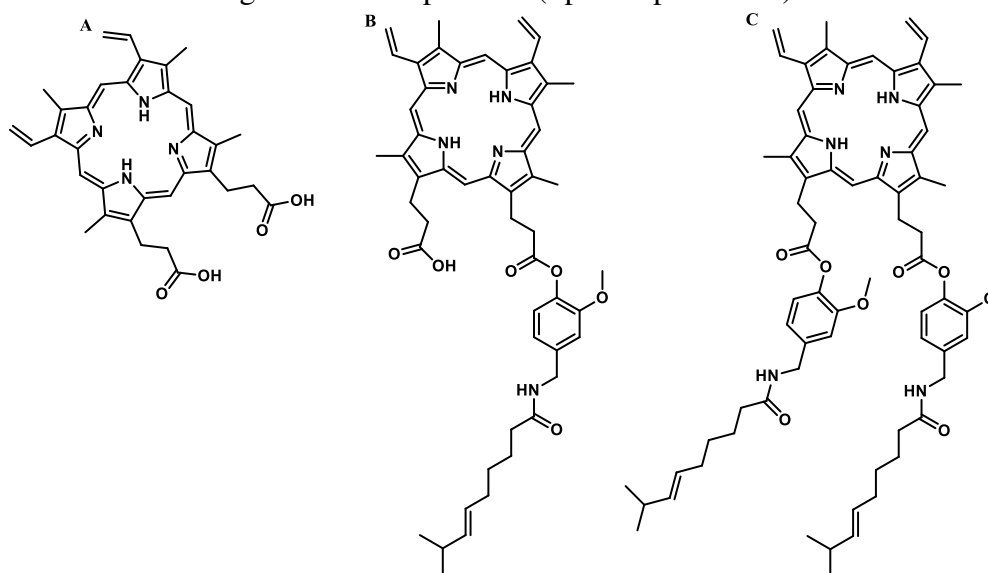
Portanto, a fotodegradação é um fenômeno multifacetado que pode limitar a estabilidade e a eficácia dos FSs durante o tratamento. Contudo, FSs com maior fotoestabilidade oferecem vantagens importantes, permitindo tratamentos mais eficazes e controlados, ao mesmo tempo que minimizam a formação de produtos oxidados indesejados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar novos FSs híbridos de derivados de PpIX modificados com fragmentos de capsaicina (Figura 8), um inibidor conhecido de bombas de efluxo NorA da bactéria *S. aureus*, para aplicação à TFDA em bactérias *S. aureus* e *E. coli* sensíveis e multirresistentes. Considerando a relevância dos mecanismos de resistência bacteriana, torna-se essencial ampliar os estudos com porfirinas para avaliar a eficiência da TFDA associada à inibição de bombas de efluxo, o que pode contribuir para otimizar a ação antimicrobiana e superar limitações a partir da resistência intrínseca a FSs.

Figura 8 - Estrutura dos FS planejados: (A) PpIX, (B) derivado monoesterificado com um fragmento de capsaicina (PpIX-capsaicina **1**) e (C) derivado diesterificado com dois fragmentos de capsaicina (PpIX-capsaicina **2**).



Fonte: Autora (2024).

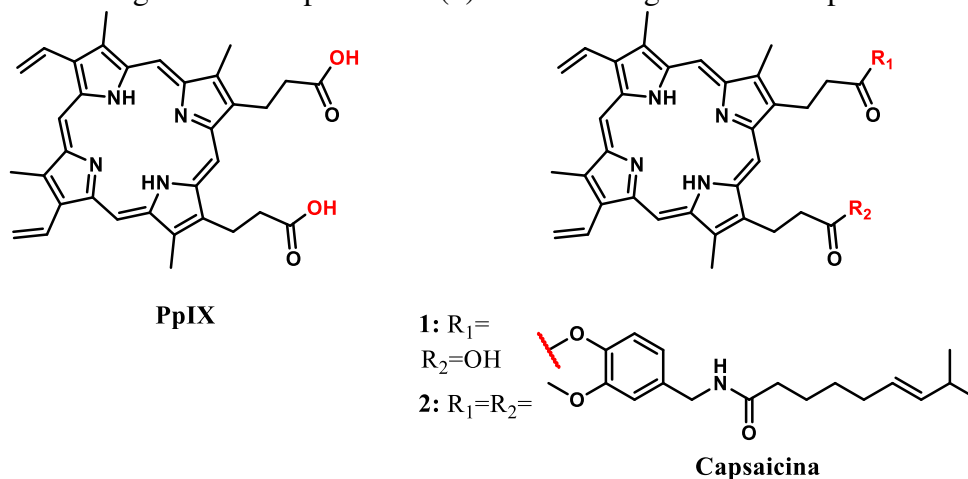
2.2 Objetivos Específicos

- Funcionalizar PpIX com fragmentos de capsaicina;
- Avaliar propriedades fotofísicas das moléculas (Φ_f), (Φ_A);
- Avaliar fotoestabilidade dos FS;
- Investigar efeitos de autoagregação em meio majoritariamente aquoso;
- Avaliar a fotoinativação de bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*) sensíveis e multirresistentes a partir dos novos derivados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PpIX (Figura 9), da classe das porfirinas, foi selecionada como FS para modificação com fragmentos inibidores de bombas de efluxo. Foram feitas modificações em um dos ácidos carboxílicos, para o produto monoesterificado (PpIX-capsaicina **1**), e nas duas porções ácidas, para o produto diesterificado (PpIX-capsaicina **2**). A esterificação foi feita com o fragmento fenólico da Capsaicina, molécula inibidora da bomba de efluxo NorA da bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Kalia *et al.*, 2012).

Figura 9 - Planejamento das modificações no precursor PpIX a partir da esterificação com (**1**) um fragmento de capsaicina e (**2**) com dois fragmentos de capsaicina.



Fonte: Autora (2024).

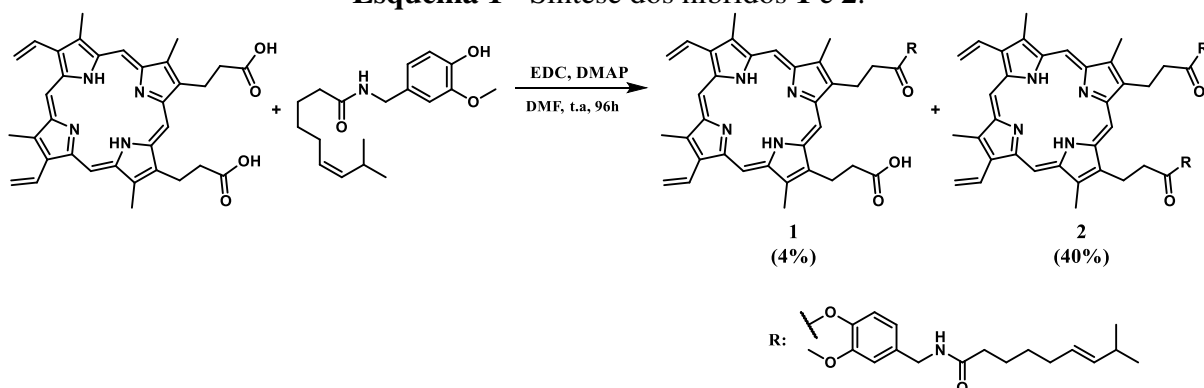
3.1 Síntese dos híbridos de PpIX com capsaicina (**1** e **2**)

Os derivados de PpIX-capsaicina **1** e **2** (Esquema 1) foram planejados para atuarem na TFDA através de um possível efeito sinérgico envolvendo FS e inibição de bomba de efluxo, com base em estudos que mostraram a atividade inibitória da capsaicina em bombas de efluxo de bactérias Gram-positivas, em especial a bomba NorA da *S. aureus* sensível e multirresistente (Kalia *et al.*, 2012; Prasch *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). A atividade inibitória da capsaicina isolada de produtos naturais é mais expressiva para bactérias multirresistentes, uma vez que existe uma superexpressão das bombas de efluxo para essas linhagens (AlMatar *et al.*, 2021; Hamblin, 2020; Rineh *et al.*, 2017).

Os híbridos **1** e **2** foram sintetizados, onde o rendimento da reação foi de 4% e 40%, respectivamente, a partir da esterificação de Steglich entre a PpIX e a capsaicina na presença de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Esquema 1). Todas as sínteses e purificações foram feitas no Laboratório de Síntese

de Candidatos a Fármacos (LaSFar), sob coorientação do Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Esquema 1 - Síntese dos híbridos 1 e 2.

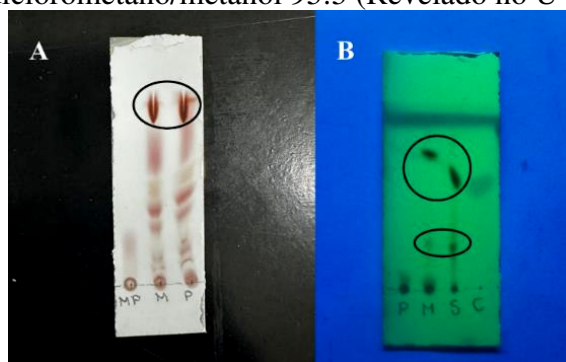


Fonte: Autora (2024).

Inicialmente, as proporções estequiométricas, tempo de reação e concentração do meio reacional foram controlados com a expectativa de obter a **1** e **2** em uma única reação, que foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*).

Os produtos **1** e **2** foram isolados após 96h de reação, mesmo que o material de partida não fosse completamente consumido. Foi possível notar, a partir de CCD (Cromatografia em cada delgada), a formação de dois produtos com Rfs distintos (circulado na Figura 10B), posteriormente identificados a partir de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 11, 13 e 14) e espectrometria de massas com ionização por eletrospray (Figuras 15 e 18).

Figura 10 – (A) CCD feita durante a síntese (após 72h) das PpIX-capsaicina **1** e **2**. **Mp**: PpIX; **M**: misto da reação e material de partida (PpIX) e **P**: produto de reação (sem uso de revelador). (B) CCD feita após recuperação do sólido por meio de filtração, onde **P**: PpIX; **M**: misto de PpIX e sólido; **S**: sólido recuperado e **C**: capsaicina. Ambas feitas com diclorometano/metanol 95:5 (Revelado no UV).

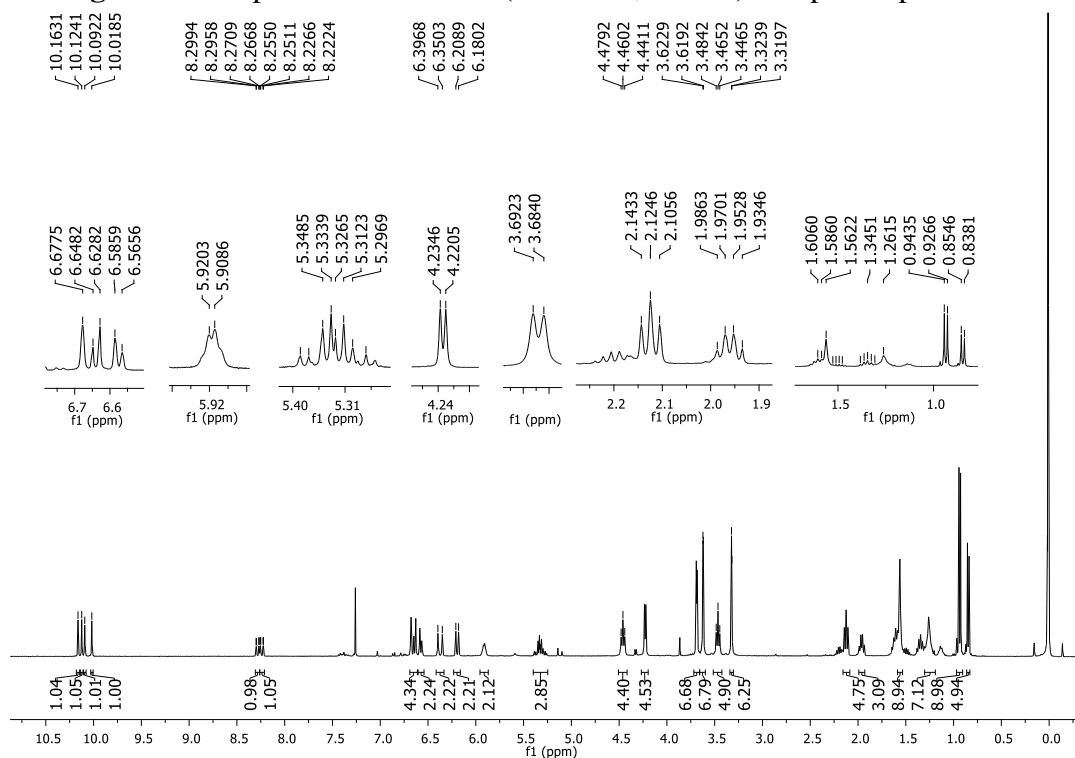


Fonte: Autora (2023).

No espectro de RMN de ^1H do produto **2** (Figura 11), é possível identificar quatro singletos entre 10,1631 e 10,0185 ppm, correspondentes aos hidrogênios H1-4 (Figura 12). Além disso, observa-se um duplo duplete entre 8,2994 e 8,2224 ppm, atribuído ao hidrogênio H-5, e dois dupletos aparentes na região de 6,3968 a 6,1802 ppm, referentes aos quatro hidrogênios H6.

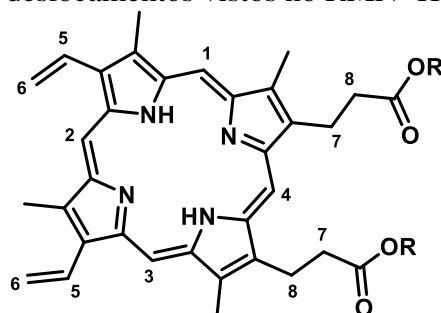
O que evidencia a presença de simetria na molécula e, consequentemente a diesterificação, são os singletos dos doze hidrogênios metílicos ligados ao anel porfirínico, que aparecem em 3,6229 ppm e 3,3239 ppm. Também, dois tripletos correspondentes aos oito hidrogênios metilênicos (H7 e H8) foram registrados entre 4,4792 e 4,4411 ppm, assim como entre 3,4842 e 3,4465 ppm.

Figura 11 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de PpIX-capsaicina **2**.



Fonte: Autora (2023).

Figura 12 - Ambientes químicos de cada hidrogênio do cromóforo PpIX atribuído aos deslocamentos vistos no RMN ^1H .

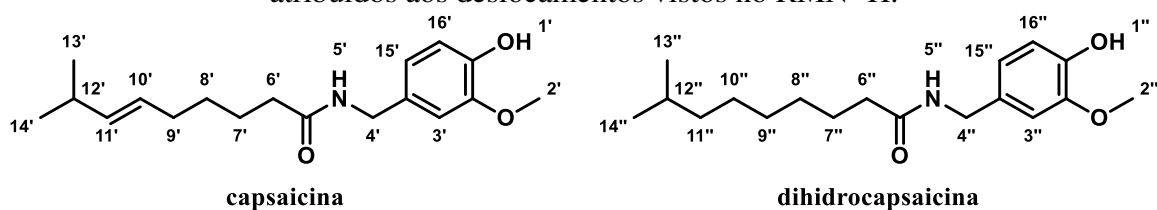


Fonte: Autora (2024).

Estudos realizados por Oliveira Júnior (2019) com padrões comerciais de capsaicina demonstraram, por meio de RMN de ^1H , os deslocamentos químicos da capsaicina e dihidrocapsaicina presentes em uma mesma amostra. Esses dados foram comparados aos deslocamentos químicos obtidos no RMN de ^1H do produto **2**, conforme apresentado na Tabela 1 e Figura 13 (Oliveira Junior *et al.*, 2019). Essa análise permitiu correlacionar os deslocamentos químicos da mistura de capsaicinóides com o espectro de RMN de ^1H do produto **2**, evidenciando a presença tanto de capsaicina quanto de dihidrocapsaicina.

Devido à complexidade de analisar as proporções de hidrogênios diretamente pelas integrais dos espectros, a combinação das informações obtidas na literatura com os dados de HRMS foi essencial para confirmar a formação do produto desejado.

Figura 13 - Ambientes químicos de cada hidrogênio da capsaicina e dihidrocapsaicina atribuídos aos deslocamentos vistos no RMN ^1H .



Fonte: Autora (2025).

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) da capsaicina pureza 60% reportados na literatura (Oliveira Júnior, 2019) e analisados na PpIX-capsaicina **2** (400 MHz, CDCl_3) (Expansões – Figura 11), nos quais os sinais destacados em negrito são os deslocamentos específicos de cada capsaicinóide.

Capsaicina		Dihidrocapsaicina	
δ_{H}^a (m^b , J^c)		δ_{H}^a (m^b , J^c)	
<i>Oliveira Júnior</i> , 2019	PpIX-capsaicina 2 (CDCl_3)	<i>Oliveira Júnior</i> , 2019	PpIX-capsaicina 2 (CDCl_3)

16'	6,85 (1H, d, 8,0)	6,64 (d, 8,0)	15''	6,86 (1H, d, 8,0)	6,64 (d, 8,0)
3'	6,79 (1H, d, 1,8)	6,68 (s)	3''	6,81 (1H, d, 8,0)	6,68 (s)
15'	6,74 (1H, dd, 8,0, 1,8)	6,58 (d, 8,0)	16''	6,76 (1H, dd, 8,0, 1,5)	6,58 (d, 8,0)
11'	5,90 (2H, m)	5,92 - 5,91 (m)	4''	4,35 (2H, d, 6,0)	4,23 (d, 5,6)
10'	5,33 (2H, m)	5,40 - 5,24 (m)	2''	3,88 (3H, s)	3,69 (s)
4'	4,33 (2H, d, 5,6)	4,23 (d, 5,6)	6''	2,19 (2H, t, 7,5)	2,17 - 2,22 (m)
2'	3,85 (3H, s)	3,69 (s)	7''	1,65 (2H, m)	1,58 - 1,64 (m)
6'	2,20 (2H, m)	2,12 (t, 7,6)	12''	1,50 (1H, m)	1,47 - 1,52 (m)
12'	2,20 (1H, m)	2,20 - 2,14 (m)	9''	1,32-1,26 (6H, m)	1,22 - 1,30 (m)
			10''		
			11''		
9'	1,98 (2H, dt, 7,5, 6,7)	1,96 (dd, 13,8, 6,9)	8''	1,15 (2H, m)	1,12 - 1,14 (m)
7'	1,64 (2H, tt, 7,5)	1,58 - 1,64 (m)	13''	0,85 (6H, d, 6,5)	0,85 (d, 6,6)
			14''		
8'	1,37 (2H, tt, 7,5)	1,30 - 1,38 (m)			
13'	0,95 (6H, d, 6,7)	0,94 (d, 6,7)			
14'					

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

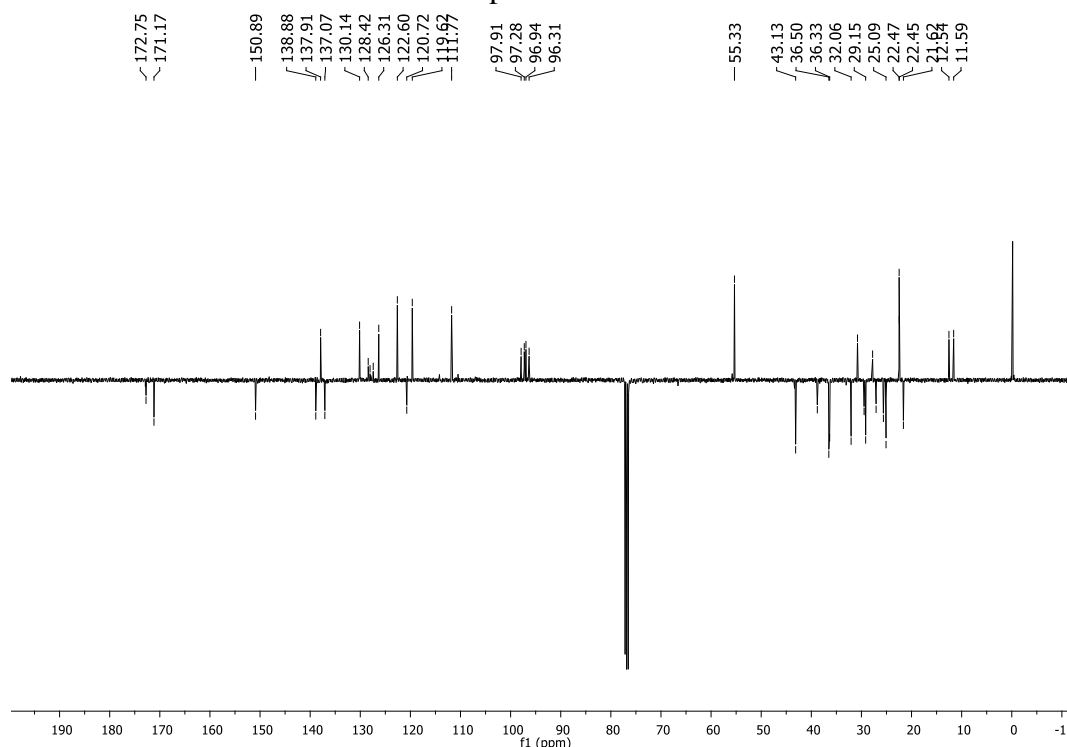
^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) apresentado na Figura 14, são identificados sinais em 172,75 ppm e 171,17 ppm, atribuídos aos carbonos carbonílicos dos ésteres e das amidas. Entre 150,89 ppm e 96,31 ppm, os sinais podem ser classificados como: com fase para cima (CH), correspondentes aos seis carbonos C1-5 e a três carbonos aromáticos dos fragmentos de capsaicinóides; e com fase para baixo (carbonos desidrogenados), relacionados aos carbonos pirrólicos e aos três carbonos aromáticos restantes dos fragmentos de capsaicinóides, além do carbono C6 (CH₂).

Os demais sinais pertencem aos fragmentos de capsaicinóides, com exceção de quatro sinais específicos em 31,28 ppm, 28,09 ppm, 12,81 ppm e 11,82 ppm, que representam os carbonos metílicos dos fragmentos pirróis.

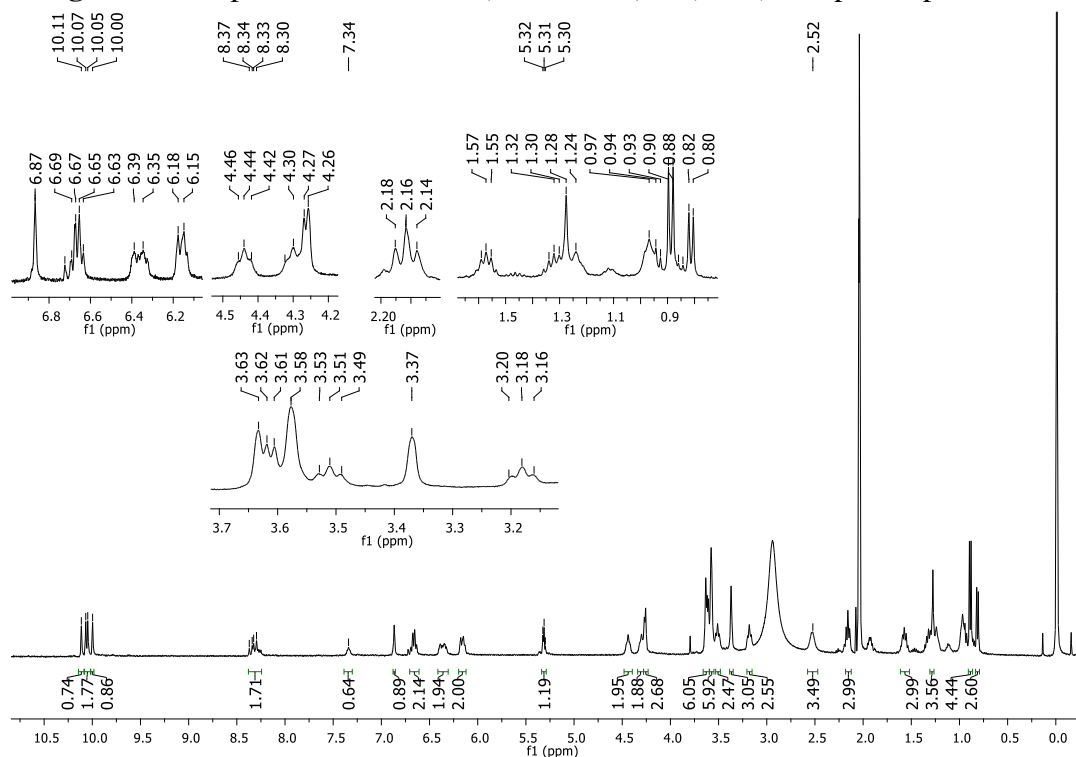
Figura 14 - Espectros de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) da mistura de híbridos PpIX-capsaicina **2**.



Fonte: Autora (2023).

No espectro de RMN de ^1H do produto **1** (Figura 15), observam-se deslocamentos químicos semelhantes aos registrados para o produto **2**, com exceção dos sinais correspondentes aos doze hidrogênios metílicos ligados ao anel porfirínico. Devido à assimetria da molécula, esses sinais aparecem como singletos em 3,6327 – 3,6059 ppm e um singletto adicional em 3,5771 ppm. Os sinais correspondentes aos oito hidrogênios metilênicos (H7 e H8) foram registrados como quatro tripletos em 4,4398 e 4,2993 ppm, assim como em 3,5106 e 3,1813 ppm.

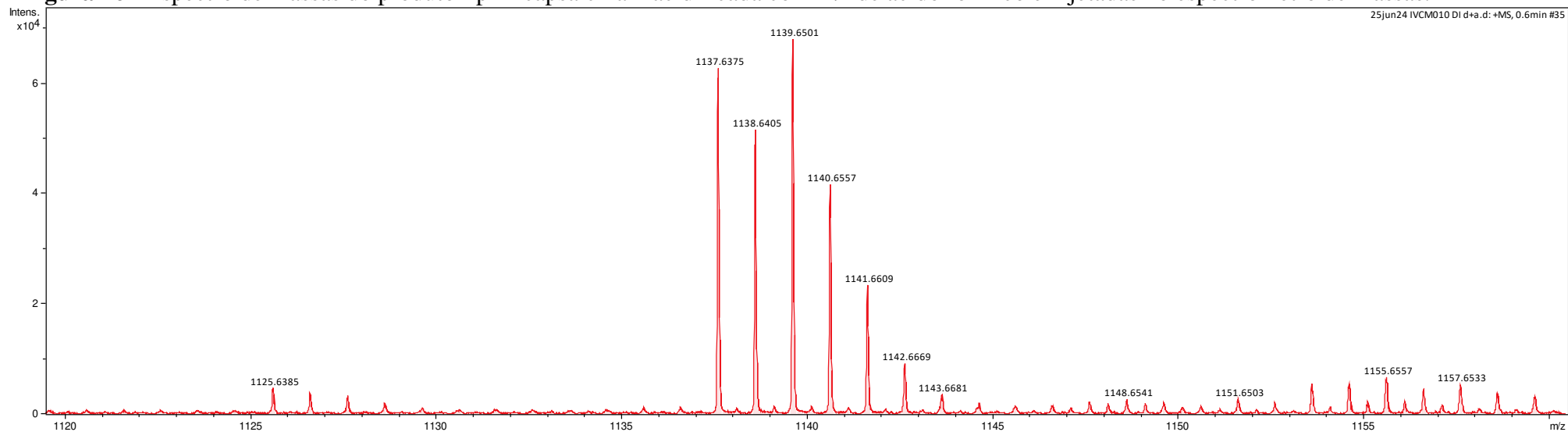
No produto **1**, a presença da mistura de capsaicinóides também é evidenciada pela presença de fragmentos da capsaicina e de dihidrocapsaicina. Desse modo, os dados de HRMS também foram necessários para elucidar as estruturas formadas.

Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de PpIX-capsaicina **1**.

Fonte: Autora (2023).

O espectro de massas de **2** (Figura 16) revelou a presença de diversos picos experimentais de m/z , incluindo 1137,6375, 1138,6405, 1139,6501, 1140,6557, 1141,6609 e 1142,6669, entre outros de menor intensidade. O valor teórico calculado para a massa exata do composto desejado, considerando a esterificação com duas moléculas de capsaicina, é $[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ 1137,6423.

Figura 16 - Espectro de massas do produto PpIX-capsaicina **2** acidificada com 1% de ácido fórmico e injetadas no espectrômetro de massas.

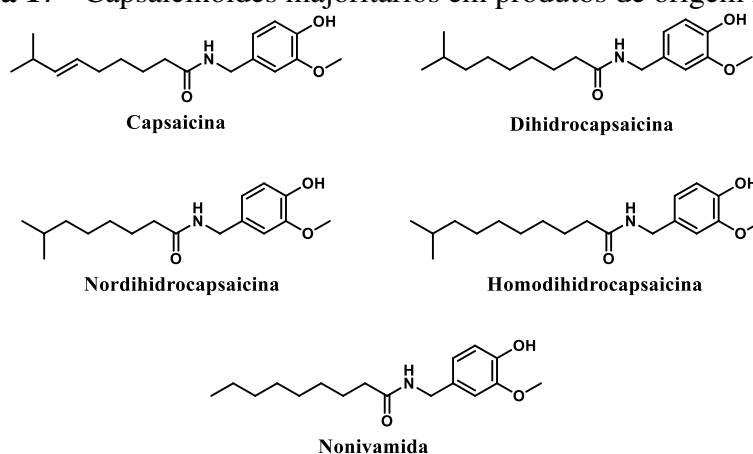


Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LaBioMass), coordenado pelo Dr. Eduardo Jorge Pilau (2024).

A presença de múltiplos picos próximos no espectro de massas sugere a formação de uma mistura de produtos resultante da diesterificação com diferentes capsaicinóides (ver Figuras 17 e 18). Essa heterogeneidade provavelmente decorre da baixa pureza (61,7%) da capsaicina comercial utilizada como reagente na síntese, que contém 32,10% de dihidrocapsaicina como principal impureza, além de menores proporções de outros análogos (Figura 17).

Embora mistura contenha dihidrocapsaicina em uma proporção expressiva, ela apresenta, assim como a capsaicina, atividade inibitória sobre algumas bombas de efluxo, comprovada em micobactérias (Kalia *et al.*, 2012; Prasch *et al.*, 2019). Dessa forma, a presença dessa mistura não compromete, a princípio, a aplicabilidade do produto obtido para os objetivos propostos.

Figura 17 - Capsaicinóides majoritários em produtos de origem natural.



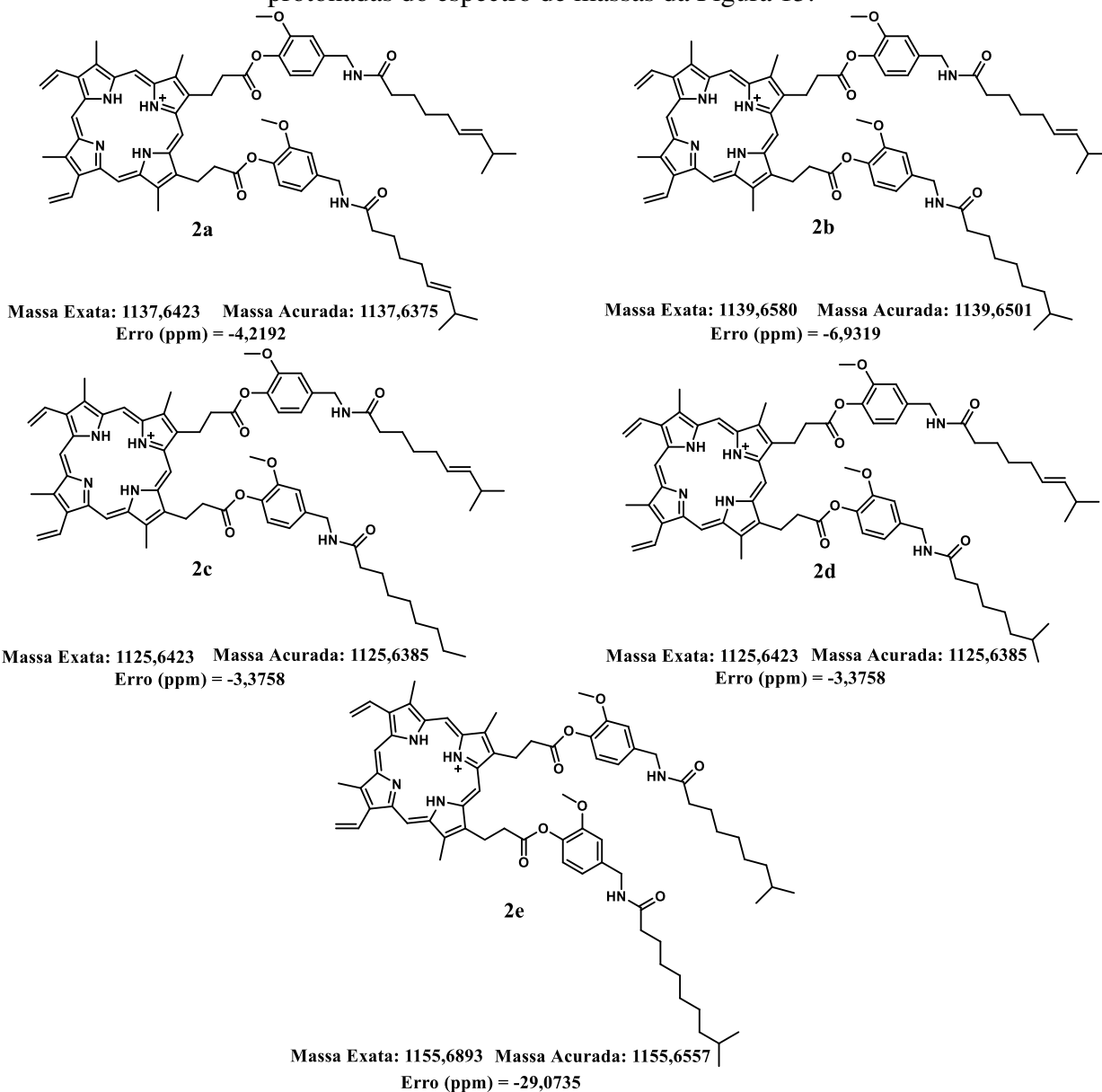
Fonte: Autora (2024).

As demais impurezas presentes na capsaicina comercial (6,20%) são, provavelmente, outras estruturas de capsaicinóides e capsiatos. Estes últimos diferem por apresentarem um grupo éster no lugar da amida (Figura 17) e são extraídos de fontes naturais (Kobata *et al.*, 1998; Valim *et al.*, 2019; Yamasaki *et al.*, 2007). A presença de capsiatos pode justificar os picos observados no espectro de massas com relações m/z de valores pares, como 1138,6405, 1140,6557 e 1142,6669, entre outros.

Devido à sobreposição de sinais químicos semelhantes no RMN, provenientes dos diferentes capsaicinóides presentes, essa técnica não foi a mais adequada para caracterizar os produtos **1** e **2** (Oliveira Junior *et al.*, 2019). No entanto, foi possível identificar por massas que **2** consiste em uma mistura de diésteres (Figura 11 e Tabela 1).

Os subprodutos formados durante a reação (Figura 18) são provavelmente ésteres gerados a partir de diferentes combinações entre os capsaicinóides presentes (Figura 17). Essa inferência é respaldada pelas semelhanças estruturais entre os compostos, que resultam em reatividades semelhantes no ambiente reacional.

Figura 18 - Proposta de algumas estruturas presentes na mistura, a partir das moléculas protonadas do espectro de massas da Figura 15.



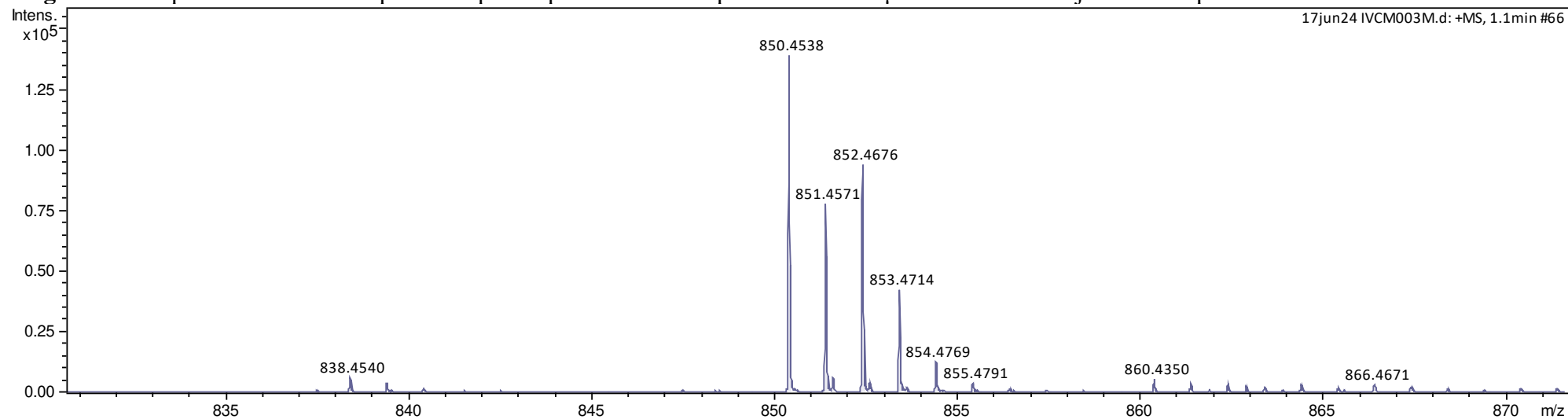
Fonte: Autora (2024).

O espectro de massas de **1** (Figura 19) revelou valores experimentais de razão m/z como 850,4513, 851,4571, 852,4676, 853,4714 e 854,4769, além de outros sinais de menor intensidade. O valor teórico previsto para o produto **1** contendo uma capsaicina é $[M + H]^+ = m/z$ 850,4538, confirmando a formação do produto desejado.

Entretanto, assim como observado para o produto **2**, também foi possível identificar a presença de subprodutos, provavelmente originados dos análogos de capsaicina e capsaiatos presentes na amostra comercial utilizada como reagente (Figura 17). Esses subprodutos estão evidenciados na Figura 19 e ilustrados na Figura 20, reforçando a influência das impurezas na composição final da mistura.

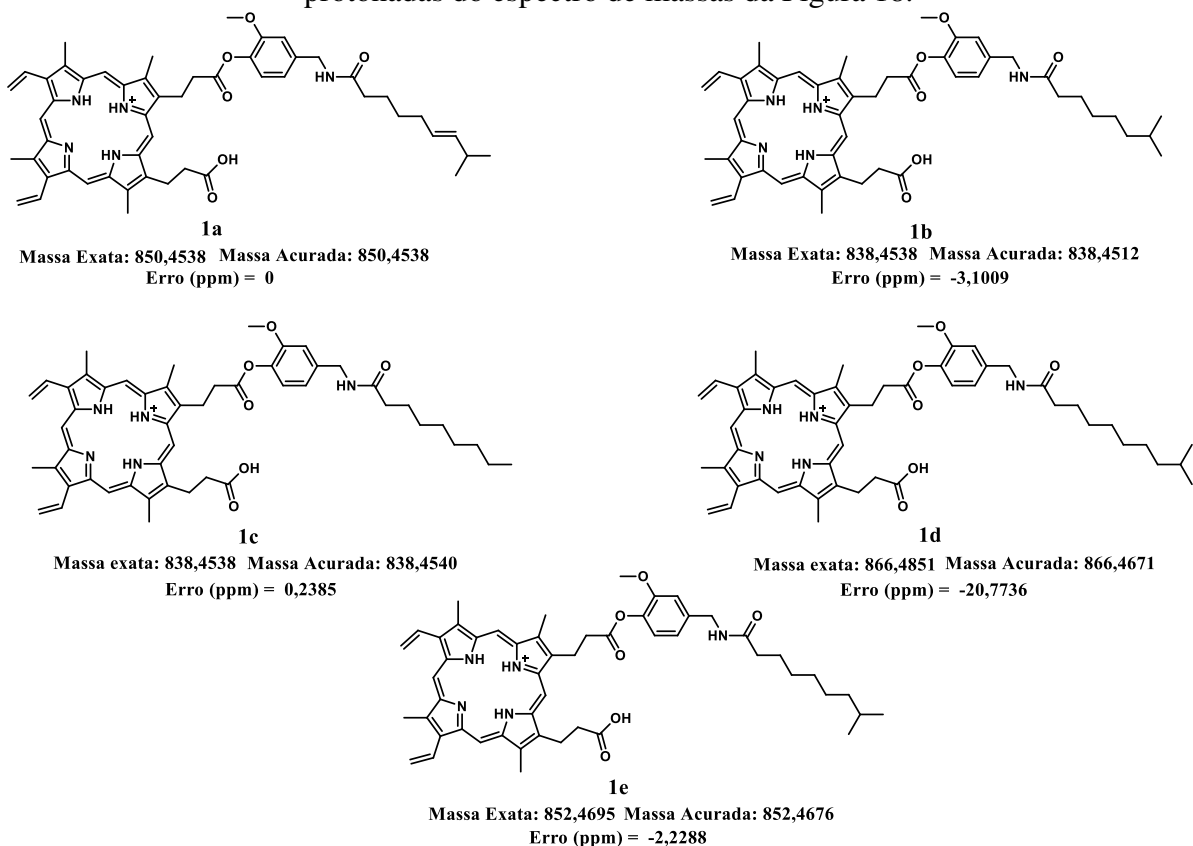
Dessa forma, o produto **1** formado a partir da monoesterificação da PpIX com estruturas de capsaicinóides será denominado como PpIX-capsaicina **1** e o produto **2**, formado a partir da diesterificação de capsaicinóides será referido como PpIX-capsaicina **2** nos experimentos de caracterização e aplicação biológica.

Figura 19 - Espectro de massas do produto PpIX-capsaicina **1** ressuspensionado em 500 μ L de metanol e injetado no espectrômetro de Massas.



Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LaBioMass), coordenado pelo Dr. Eduardo Jorge Pilau (2024).

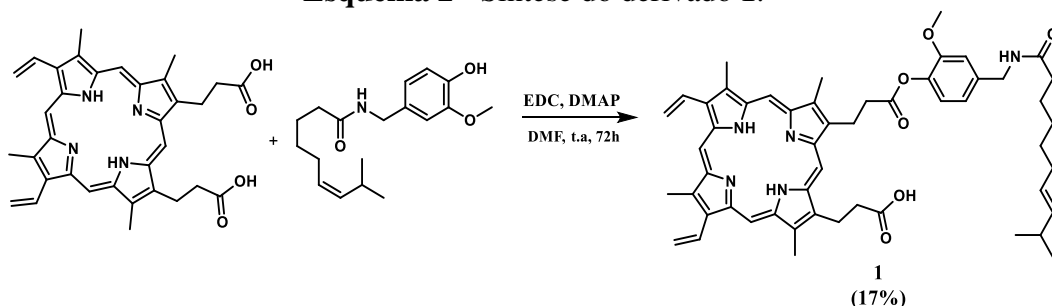
Figura 20 - Proposta de algumas estruturas presentes na mistura, a partir das moléculas protonadas do espectro de massas da Figura 18.



Fonte: Autora (2024).

Para obter mais massa de **1** para experimentos posteriores, foi feita uma nova reação. Essa síntese (Esquema 2) foi planejada com o intuito de minimizar a formação do derivado **2** e maximizar o rendimento de **1**, utilizando menos equivalentes de EDC, DMAP e capsaicina, que foram adicionados lentamente no meio reacional, além de usar um meio reacional mais diluído.

Esquema 2 - Síntese do derivado **1**.

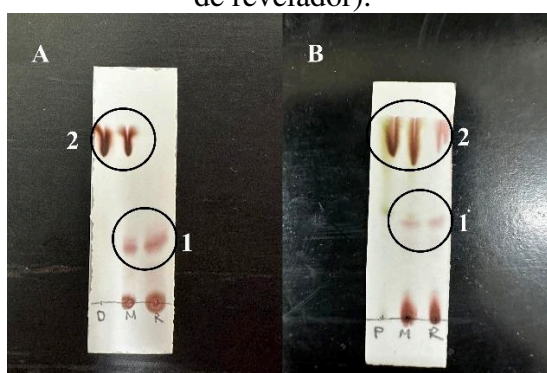


Fonte: Autora (2024).

Após 72 horas de reação, observou-se o início da formação do diéster **2** (Figura 21), indicando que os monoésteres **1** apresentam maior reatividade em comparação à PpIX. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de ligações de hidrogênio intramoleculares

entre os grupos carboxílicos da PpIX, quando solubilizada em DMF, um solvente polar aprótico. Após a ocorrência da primeira esterificação, a interação do segundo ácido carboxílico é perdida, tornando-o mais acessível para reagir. Com o objetivo de minimizar a formação do diéster e facilitar a etapa subsequente de purificação, a reação foi interrompida nesse ponto estratégico.

Figura 21 - (A) CCD feita após 24h da síntese da porfirina PpIX-capsaicina **1**. **D**: PpIX-capsaicina **2**; **M**: misto da reação e padrão de PpIX-capsaicina **2**; **R**: produto de reação. (B) CCD após 72h de reação, onde **P**: PpIX-capsaicina **2**; **M**: misto da reação e padrão de PpIX-capsaicina **2**; **R**: produto de reação. Ambas feitas com diclorometano/metanol 95:5 (sem uso de revelador).



Fonte: Autora (2024).

Os resultados obtidos confirmam a síntese dos produtos **1** e **2**, evidenciada por análises de RMN e espectrometria de massas. Apesar da presença de subprodutos decorrentes de impurezas nos reagentes comerciais, os dados experimentais indicam que as estruturas desejadas foram formadas, com características desejáveis e planejadas para aplicação na TFDA.

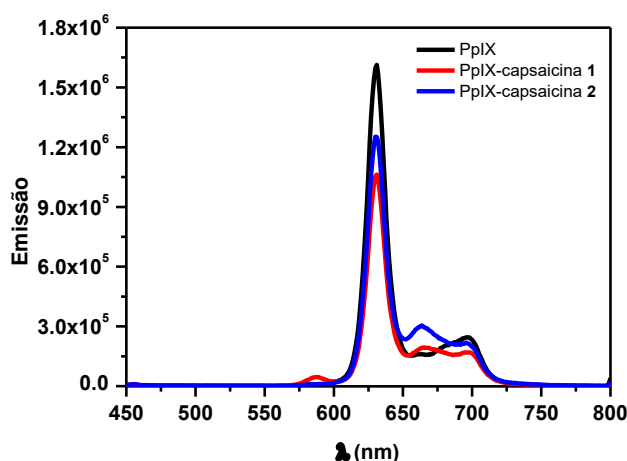
3.2 Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ_Δ)

Investigar as propriedades do estado excitado dos compostos sintetizados é essencial para compreender sua aplicação na TFDA. Nesse sentido, os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ_Δ) são ferramentas cruciais para elucidar o comportamento do FS quando excitado.

As porfirinas podem ser classificadas como fluorescentes ou fosforescentes, dependendo dos valores de seus rendimentos quânticos (Gouterman, 1961). A fluorescência está associada à transição do nível mais baixo do estado excitado singlete para os níveis vibracionais do estado fundamental (De Figueirêdo, 2009).

Os espectros de emissão das porfirinas foram registrados em etanol na faixa de 450 a 800 nm, com excitação em 402 nm. A Figura 22 apresenta os espectros de emissão dos fotossensibilizadores, cujos valores máximos de emissão estão dispostos na Tabela 2.

Figura 22 - Espectros de emissão do precursor PpIX e os derivados sintetizados PpIX-capsaicina **1** e **2**. ($\lambda_{exc} = 402$ nm, fenda 1 - 5 nm).



Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Fotoquímica e Ciência dos Materiais (LaFOT-CM) coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Otavio Patrocínio de Toledo.

Segundo Myrzakhmetov *et al.* (2021), o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da PpIX, é maior em solventes menos polares em comparação com água e tampão fosfato. Essa diferença ocorre porque, em meios aquosos, a PpIX tende a formar agregados devido a interações π - π e ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos carboxílicos, o que reduz significativamente sua fluorescência. Essa observação destaca a relevância do solvente na otimização das propriedades fotofísicas dos compostos, especialmente em aplicações na TFDA (Myrzakhmetov *et al.*, 2021). No caso dos derivados **1** e **2**, o aumento da cadeia carbônica e a provável maior lipofilicidade também podem favorecer a agregação em maior proporção, impactando diretamente na emissão da fluorescência.

Em comparação à PpIX, os valores de rendimento quântico de emissão (Φ_f) dos compostos PpIX-capsaicina **1** e **2** são bem próximos, com valores inferiores a 0,1 (Tabela 2). Isso se deve a processos competitivos de cruzamento intersistema, impedindo que a fluorescência, ou seja, o decaimento radiativo do primeiro estado excitado para o estado fundamental seja o principal processo de decaimento dessas moléculas (Lakowicz, 2006).

O rendimento quântico de alguns fluoróforos pode ser aumentado pela redução da constante de taxa de decaimento não radiativo, o que geralmente é alcançado por meio de baixas temperaturas ou pela inserção do fluoróforo em um ambiente mais rígido (Lakowicz *et al.*,

2001; Rybczyński *et al.*, 2022). A rigidez da estrutura molecular é uma abordagem eficaz para melhorar a eficiência de emissão. Isso pode ser alcançado limitando as vibrações moleculares, um processo frequentemente facilitado pela agregação, que ajuda a estabilizar o estado excitado e reduzir as perdas não radiativas. Esse método destaca a importância dos fatores estruturais e ambientais no design e na otimização de fluoróforos para diversas aplicações (Rybczyński *et al.*, 2022).

Tabela 2 - Valores de rendimento quântico de emissão (Φ_f) das porfirinas em etanol ($\lambda_{exc} = 402$ nm, fenda 1 - 5 nm, Absorbância em 402 nm = 0,1).

Fotossensibilizador	Φ_f
PpIX	0,070*
PpIX-capsaicina 1	0,076
PpIX-capsaicina 2	0,081

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

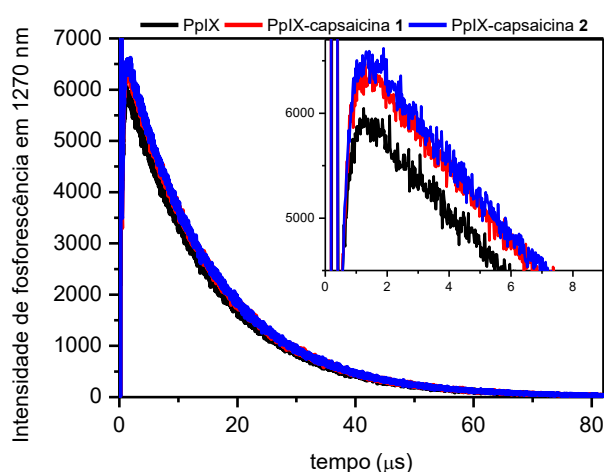
Fonte: Autora (2024).

A tendência de aumento discreto no rendimento quântico de fluorescência a cada adição de um fragmento de capsaicina ao fluoróforo PpIX pode ser correlacionada com os conceitos de modificação estrutural e controle das perdas não radiativas (Lakowicz *et al.*, 2001; Rybczyński *et al.*, 2022). No caso dos derivados **1** e **2**, a introdução dos fragmentos de capsaicina pode estar contribuindo para uma ligeira rigidificação do ambiente molecular ao redor do fluoróforo. Isso limitaria as vibrações moleculares, reduzindo a dissipação de energia por vias não radiativas e, conseqüentemente, melhorando a eficiência do processo de emissão. Embora o aumento observado seja discreto, ele evidencia que as alterações estruturais promovidas pela capsaicina impactam as propriedades fotofísicas do sistema (Lakowicz *et al.*, 2001; Rybczyński *et al.*, 2022).

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) é uma medida que avalia a eficiência de uma molécula fotossensibilizadora em converter a energia absorvida pela luz em oxigênio singlete $^1O_2$, na presença de oxigênio molecular O_2 . Esse parâmetro representa a fração de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador que resulta na formação de $^1O_2$, com valores variando de 0 (nenhuma formação de $^1O_2$) a 1 (100% de eficiência na conversão). Na ação fotodinâmica, o $^1O_2$ é considerado o principal agente envolvido (Maisch *et al.*, 2007). Por ser altamente reativo, o $^1O_2$ inicia reações oxidativas no ambiente próximo, afetando estruturas como a parede celular bacteriana, membranas lipídicas, enzimas e ácidos nucleicos (Maisch *et al.*, 2007). Um gráfico de decaimento de $^1O_2$ ilustra como a intensidade do sinal associado ao

oxigênio singlete (em 1270 nm) diminui ao longo do tempo após sua formação. Esse gráfico reflete a cinética de desativação do $^1\text{O}_2$, que, em sistemas homogêneos, segue uma cinética de primeira ordem, indicando que não há interação significativa entre o $^1\text{O}_2$ e outros sistemas (Scholz *et al.*, 2021; Szewczyk; Mokrzyński; Sarna, 2024). A intensidade inicial do sinal de emissão fosforescência em 1270 nm está diretamente relacionada à eficiência do fotossensibilizador em gerar $^1\text{O}_2$. Uma intensidade inicial maior sugere que o fotossensibilizador absorveu luz e transferiu energia para o oxigênio molecular de forma eficiente (Szewczyk; Mokrzyński; Sarna, 2024). Nos derivados sintetizados **1** e **2**, observa-se uma intensidade inicial maior em comparação ao precursor PpIX (insert da Figura 23), indicando maior eficiência na geração $^1\text{O}_2$, à medida que fragmentos de capsaicina foram acrescentados à estrutura.

Figura 23 - Decaimento de fosforescência de $^1\text{O}_2$ em etanol. ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm, Absorbância em 400 nm = 0,3).



Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) coordenado pelo Prof. Maurício S. Baptista.

A análise da curva de decaimento permite a determinação da meia-vida do $^1\text{O}_2$ (τ_Δ), que corresponde ao tempo necessário para que a intensidade do sinal seja reduzida pela metade (Myrzakhmetov *et al.*, 2021). A meia-vida de $^1\text{O}_2$ foi avaliada em solução etanólica com base nos espectros de decaimento registrados (Figura 22). Nesse meio, τ_Δ é influenciada principalmente pela desativação do $^1\text{O}_2$ devido ao solvente, envolvendo transferências de energia eletrônicas e vibracionais (Myrzakhmetov *et al.*, 2021). Quando não há reação entre o $^1\text{O}_2$ e o FS, os valores de τ_Δ são consistentes e podem ser comparados com dados disponíveis na literatura (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) e tempo de vida (τ_{Δ}) do $^1\text{O}_2$ gerado pelas porfirinas solubilizadas em etanol ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, absorvância = 0,3).

Fotossensibilizador	Φ_{Δ}	$\tau_{\Delta} (\mu\text{s})$
PpIX	0,92*	14,7
		14,9*
PpIX-capsaicina 1	0,99	14,7
PpIX-capsaicina 2	1,01	14,5

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

Fonte: Autora (2024).

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi calculado a partir da equação 2 (item 5.2 da metodologia). Os valores de Φ_{Δ} (Tabela 3) mostram que os derivados PpIX-capsaicina **1** e **2** produzem mais $^1\text{O}_2$ que seu precursor, PpIX. Entretanto, como os valores foram praticamente $\Phi_{\Delta} \approx 1,0$ (Tabela 3), esse experimento ainda será repetido para avaliar reprodutibilidade e se realmente há diferença significativa em relação ao padrão utilizado (PpIX).

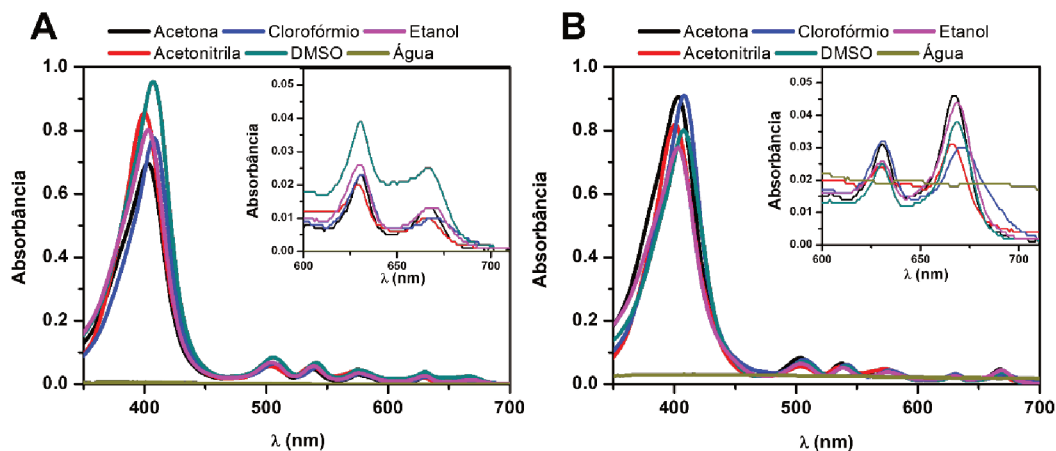
Com base nos dados obtidos, pode-se afirmar que os derivados sintetizados para aplicação a TFDA possuem maior potencial de eficiência do processo de fluorescência e produção de $^1\text{O}_2$, possivelmente devido à ligeira rigidificação do ambiente molecular ao redor do fluoróforo, o que altera as propriedades fotofísicas. Além disso, notou-se que a geração de $^1\text{O}_2$ dos derivados sintetizados também foi um pouco maior que a molécula precursora (PpIX).

3.3 Espectroscopia de absorção no UV-Visível dos derivados de PpIX-capsaicina

As porfirinas são compostos altamente coloridos, caracterizados por um espectro de absorção com uma intensa banda em torno de 420 nm (Soret) e bandas menores, conhecidas como bandas Q, na faixa de 500 a 700 nm (Iglesias, 2012). Quando solubilizadas, as características de polaridade dos solventes interferem nas propriedades eletrônicas das porfirinas, o que altera a posição, intensidade e forma das bandas espectrais (Damasceno, 2014). Isso ocorre devido às interações intermoleculares presentes, o que torna necessária a escolha de um solvente adequado para estudos espectroscópicos desses compostos, a fim de garantir que estejam no estado monomérico (Suppan, 1990).

Para estudar o comportamento das porfirinas **1** e **2** em diferentes solventes, foram feitos espectros de absorção no UV-Vis nos seguintes solventes: acetona, acetonitrila, clorofórmio (CHCl_3), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol e água (Figura 24).

Figura 24 - Espectro de absorção no visível dos derivados PpIX-capsaicina (A) **1** e (B) **2** em solventes de diferentes polaridades.

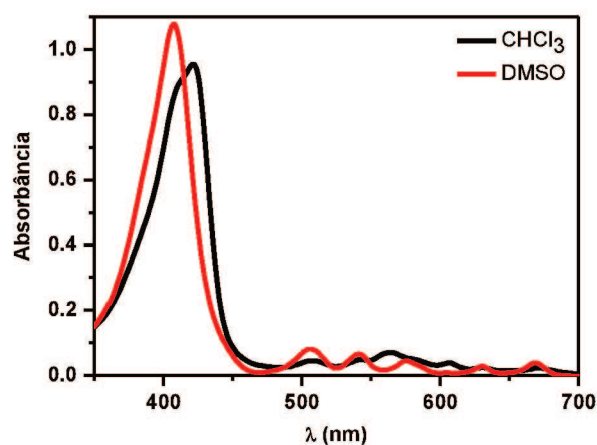


Fonte: Autora (2023).

A partir desses experimentos, observou-se uma banda Soret em torno de 408 nm, quatro bandas Q (entre 475 nm e 650 nm), característico de porfirina (Iglesias, 2012), além da presença de uma banda em 668 nm no espectro de absorção da PpIX-capsaicina **1** e PpIX-capsaicina **2** (inserts da Figura 24). Com exceção da banda em 668 nm e dos espectros dos derivados em água, a faixa de absorção registrada é característica de porfirinas no estado monomérico, cujas bandas é resultante de transições $\pi - \pi^*$ entre orbitais HOMO e LUMO no anel tetrapirrólico (Santos *et al.*, 2015).

Ao monitorar as porfirinas em solução, a PpIX-capsaicina **2** após 10 min solubilizada em clorofórmio apresentou uma diminuição na intensidade da banda Soret, acompanhada pelo surgimento de uma nova banda entre 550-600 nm no espectro de absorção (linha preta da Figura 25). Por outro lado, o espectro de absorção da PpIX-capsaicina **2** solubilizada em DMSO (linha vermelha da Figura 25), apresentou uma banda Soret bem definida, quatro bandas Q características e uma banda adicional em 668 nm, exibindo o mesmo padrão reportado anteriormente na Figura 24. Essas observações indicam que a estabilidade fotoquímica depende do solvente utilizado, refletindo possíveis alterações estruturais. Além disso, a solução preparada em clorofórmio teve a coloração alterada de vermelho para verde, o que foi investigado no item 3.4.

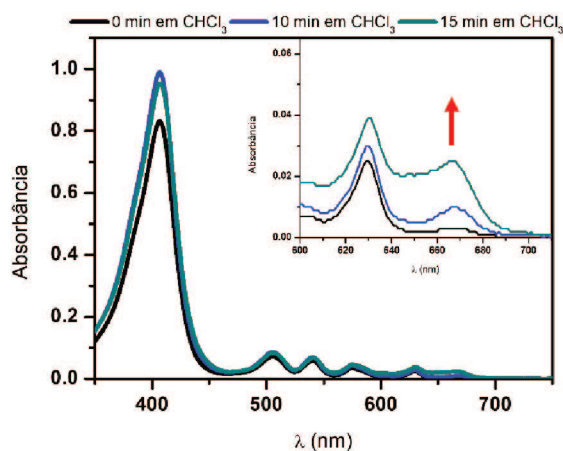
Figura 25 - Espectro de absorção no visível da PpIX-capsaicina **2** solubilizados em clorofórmio (linha preta) e DMSO (linha vermelha).



Fonte: Autora (2023).

Um fenômeno observado antes da realização do experimento da Figura 24 foi o gradual aumento da banda em torno de 668 nm para a PpIX-capsaicina **1** quando solubilizada em clorofórmio. Ao contrário da PpIX-capsaicina **2**, a banda não estava presente inicialmente. Porém, ao longo de 15 min, foi observado o aumento da banda (linha verde, Figura 26). Apesar de se tratar da mesma solução, o aumento de intensidade da banda Soret se deve à evaporação do clorofórmio, que é altamente volátil. Porém, ainda é possível notar que o aumento da banda em 668 nm não é dependente da variação da concentração.

Figura 26 – Aumento da banda em 668 nm em função do tempo (0-15 min) vista para a PpIX-capsaicina **1** em clorofórmio.



Fonte: Autora (2023).

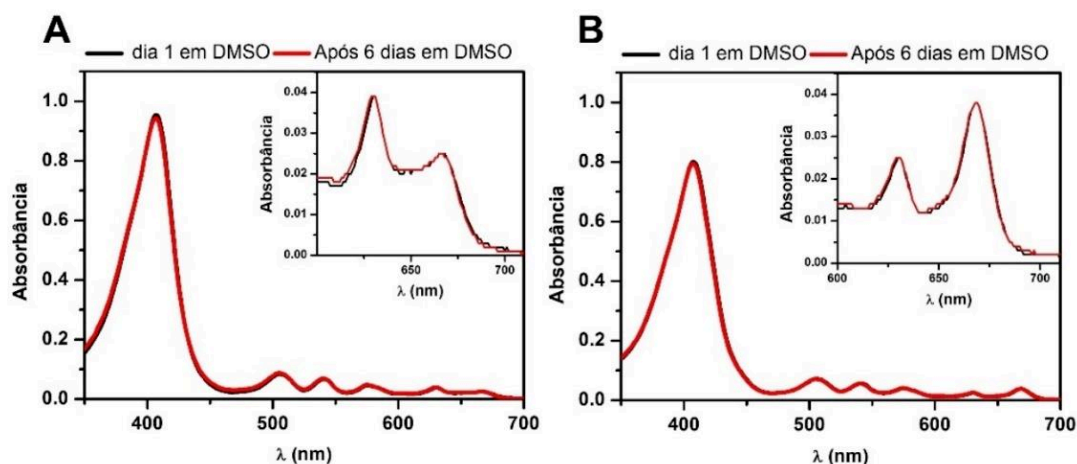
As soluções preparadas em DMSO (Figura 24 – (A) e (B)) para os experimentos de ambas as porfirinas foram reservadas para posteriores medidas de novos espectros para visualizar a estabilidade dos novos compostos nesses solventes.

3.4 Análise de estabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2 em diferentes solventes

A estabilidade de um fotossensibilizador ao longo do tempo de armazenamento é uma característica fundamental para sua aplicação, pois sua eficácia como fármaco depende diretamente desse aspecto (Sternberg; Dolphin; Brückner, 1998). Ao ser solubilizado, as interações entre o soluto e o solvente desempenham um papel crucial, afetando a estrutura do composto ao participar de processos como estabilização de estados reagentes e de transição. Isso ocorre por meio de transferência de calor, massa e de prótons em reações ácido/base (Silva, 2011).

As soluções preparadas previamente em DMSO foram empregadas nos testes de estabilidade. Ambas as porfirinas demonstraram estabilidade durante seis dias, à temperatura ambiente em DMSO, conforme evidenciado na Figura 27.

Figura 27 - Espectros de absorção no visível da (A) PpIX-capsaicina 1 e (B) PpIX-capsaicina 2 em DMSO feitos num intervalo de 6 dias, à temperatura ambiente.

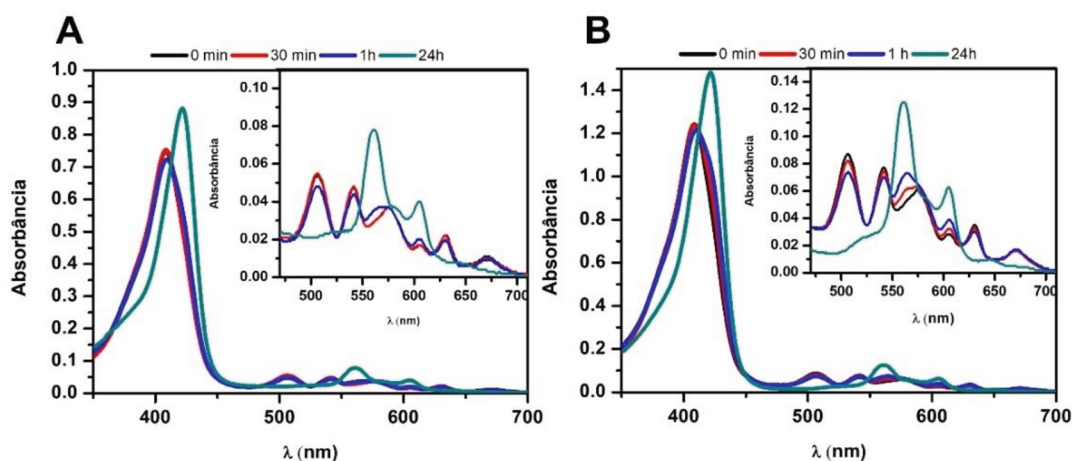


Fonte: Autora (2023).

Contudo, ao estudar o comportamento das porfirinas em clorofórmio, notou-se alterações significativas, como a mudança de coloração da solução de PpIX-capsaicina 2 de vermelho para verde, e o surgimento da banda em 668 nm para a PpIX-capsaicina 1. Para compreender os fatores que influenciaram essas alterações, foram realizadas novas soluções, uma em frasco âmbar, para limitar a exposição à luz, e outra em frasco transparente, para avaliar possíveis efeitos fotossensíveis.

Para a PpIX-capsaicina **2**, os testes realizados em duplicata demonstraram alterações espectrais em ambas as condições. A Figura 28 mostra o desaparecimento das bandas Qs, o surgimento de duas bandas entre 500 e 600 nm, o aumento da intensidade da banda Soret e seu deslocamento batocrômico. Esses resultados sugerem alterações químicas no cromóforo da porfirina na presença de clorofórmio.

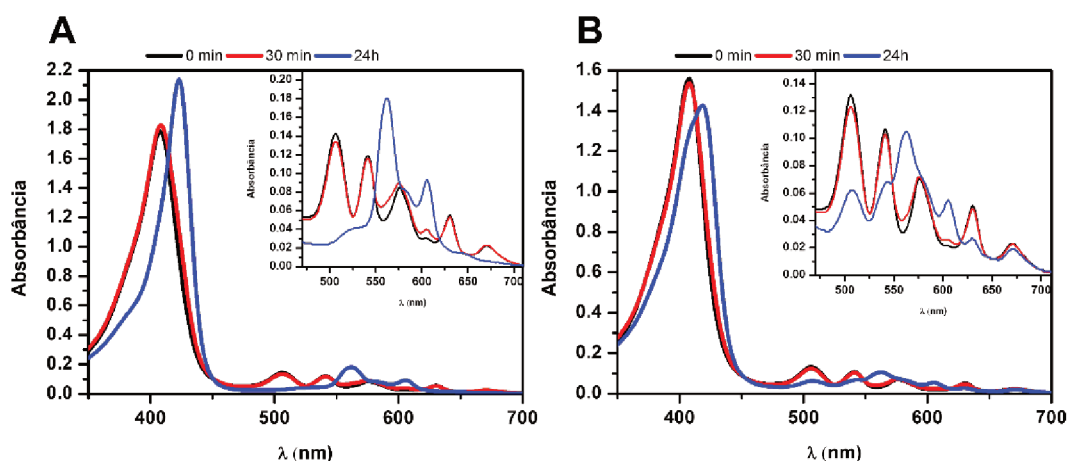
Figura 28 - Avaliação da estabilidade da PpIX-capsaicina **2** em clorofórmio armazenada em um (A) frasco transparente (B) e um frasco âmbar.



Fonte: Autora (2023).

Experimentos semelhantes com a PpIX-capsaicina **1** revelaram mudanças espectrais similares (Figura 29), com maior preservação das bandas Q em frasco âmbar. Em comparação com a PpIX-capsaicina **2**, a PpIX-capsaicina **1** apresentou alterações mais graduais, indicando maior estabilidade frente a mudanças químicas no cromóforo.

Figura 29 - Avaliação da estabilidade da PpIX-capsaicina **1** em clorofórmio armazenada em um (A) frasco transparente (B) e um frasco âmbar, com alterações visíveis em função do tempo e exposição à luz.



Fonte: Autora (2023).

Evidências sugerem que os perfis espectrais observados, semelhantes aos apresentados na Figura 24, estão associados a um estado de equilíbrio químico entre os ésteres neutros da PpIX e sua forma monoprotonada no anel pirrólico (Figura 30) (Hynninen, 2014). Para investigar, foi realizado um teste de neutralização com trietilamina (Figura 31). Ao adicionar trietilamina à solução verde da PpIX-capsaicina **1**, observou-se a mudança imediata da coloração para vermelho, com o restabelecimento das cinco bandas vistas anteriormente (Figura 24). Isso confirma a protonação do composto em clorofórmio e sua desprotonação com a adição de trietilamina. O excesso de trietilamina causou ainda um deslocamento e diminuição da intensidade da banda em 668 nm (insert da Figura 31).

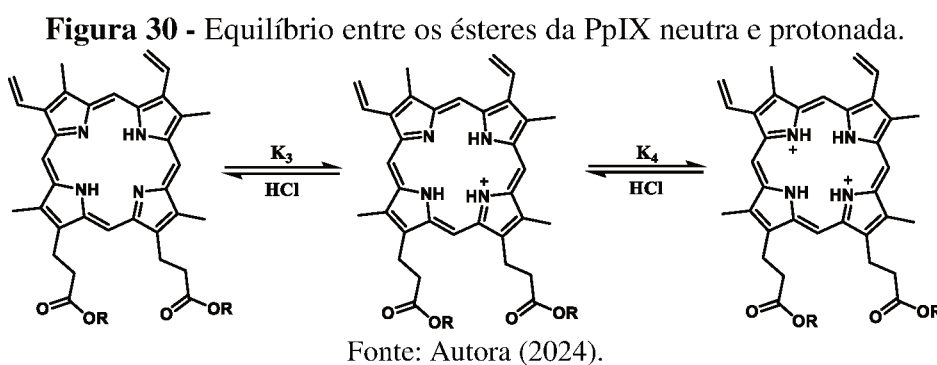
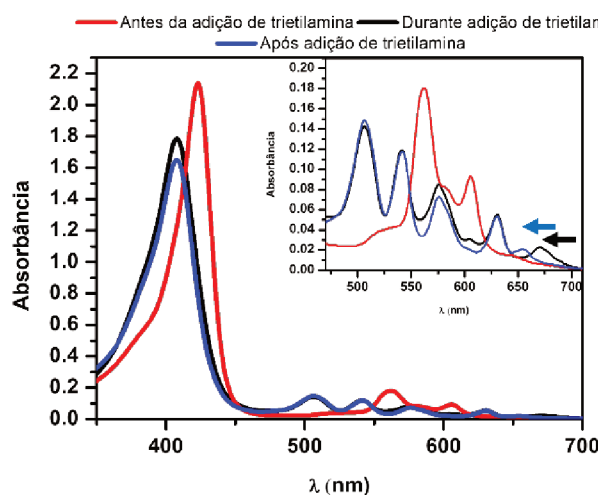


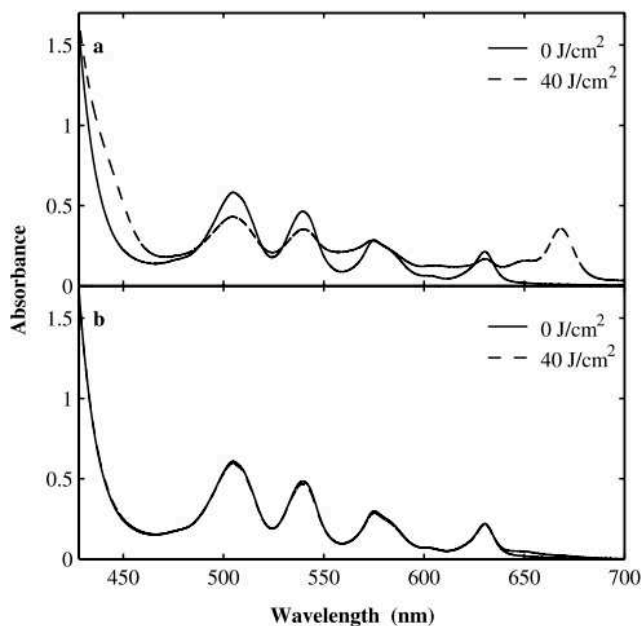
Figura 31 - Espectros de absorvância UV-Vis da PpIX-capsaicina **1** antes e depois da adição de trietilamina em solução de coloração previamente alterada para verde.



Fonte: Autora (2023).

Outra hipótese para o surgimento da banda em 668 nm relaciona-se a reações de fotodegradação na presença de oxigênio. Estudos de Ericson *et al.* (2003) sobre fotobranqueamento de PpIX (Figura 32) registraram a formação de fotoprodutos com absorvância em torno de 670 nm após doses de 40 J/cm² (Ericson *et al.*, 2003).

Figura 32 - Absorção das bandas Q da PpIX antes e após a irradiação (A) na presença de ar (B) e da amostra desoxigenada.



Fonte: Adaptado de (Ericson *et al.*, 2003).

Portanto, a mudança no perfil espectral característico da porfirina — de uma banda Soret acompanhada por quatro bandas Qs para uma Soret com deslocamento batocrômico e duas bandas Qs — pode ser atribuída à total protonação dos anéis pirrólicos. No entanto, a reversibilidade completa dessa transformação, evidenciada pelo desaparecimento da banda em 668 nm, não foi confirmada, sugerindo o envolvimento de processos de monoprotonação e/ou fotoprodutos cuja dinâmica ainda não foi totalmente elucidada.

3.5 Comportamento da PpIX-capsaicina 1 na presença de HCl e pKa

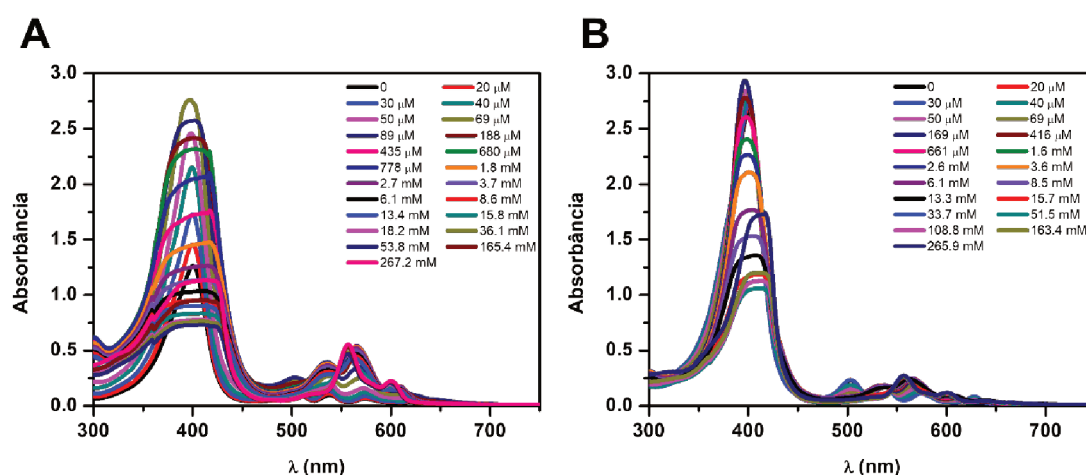
Este experimento foi conduzido para avaliar o comportamento espectral da PpIX-capsaicina 1 e da PpIX na presença de HCl, em uma faixa de pH de 4,69 a 0,17, com a finalidade de elucidar as variações espectrais previamente observadas. Para isso, foram preparadas soluções das porfirinas em metanol e em seguida, foram realizadas adições sequenciais de HCl em metanol anidro (Tabela 5 – item 5.6), permitindo a investigação das alterações espectrais resultantes da acidificação do meio, a identificação do surgimento da banda em aproximadamente 668 nm nessas condições e a determinação do pKa para cada equilíbrio de protonação.

Na Figura 33A, observou-se que o aumento da concentração de HCl provocou diversas alterações nas bandas Soret e Qs para ambas as porfirinas. Notou-se que, a cada adição do ácido, a banda Soret da PpIX apresentava alargamento progressivo, o que pode ser atribuído a

processos de autoagregação decorrentes do aumento da polaridade do meio. Além disso, foi constatado um aumento na intensidade das bandas Qs em torno de 550 nm.

O derivado PpIX-capsaicina **1** apresentou mudanças espectrais distintas da PpIX (Figura 33B) ao ser acidificado. Embora a banda Soret tenha sua intensidade reduzida, não houve indícios de influência de processos de autoagregação. Além disso, as bandas Qs não exibiram aumento significativo de intensidade quando comparadas às da PpIX. Apesar de a PpIX-capsaicina **1** ter sido armazenada à -18°C em forma de pó, a banda em 668 nm foi visível no primeiro espectro, antes mesmo da adição de HCl. Esse fato sugere a ocorrência de processos de degradação na molécula. Além disso, a coloração da solução, após as últimas adições de HCl (Tabela 5 – item 5.6), não mudou para verde, mas sim para violeta.

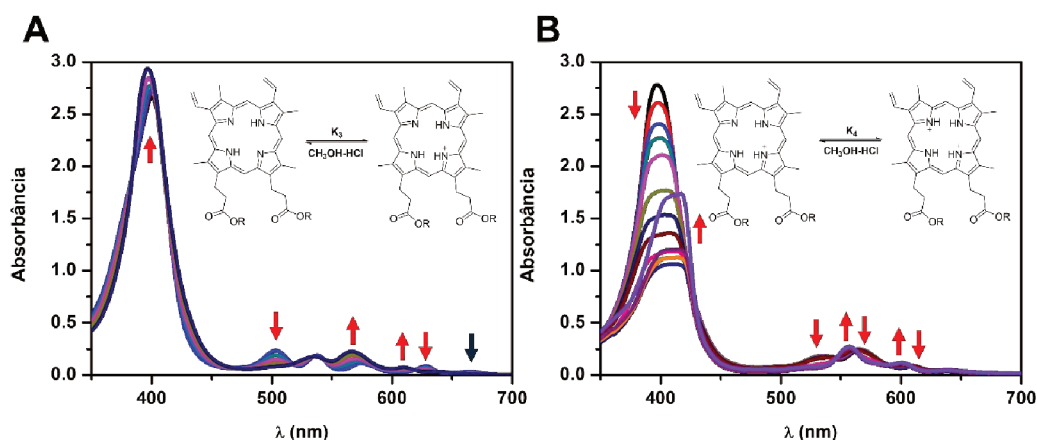
Figura 33 - Espectros de absorvância no UV-Vis da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina **1** em função do aumento da concentração de HCl em metanol.



Fonte: Autora (2024).

Para analisar tendências espectrais da PpIX-capsaicina **1** em cada equilíbrio ácido-base, os gráficos foram divididos em dois comportamentos distintos: monoprotonação (Figura 34A) e diprotonação (Figura 34B) (Hynninen, 2014). Durante a monoprotonação, verificou-se o aumento da intensidade e deslocamento hipsocrômico da banda Soret e da banda Q em 574 nm, bem como a diminuição das bandas em 503 e 628 nm (Figura 34A). Além disso, uma nova banda começou a se formar em 609 nm, enquanto a banda em 668 nm, vista nos espectros de estabilidade anteriores, desapareceu.

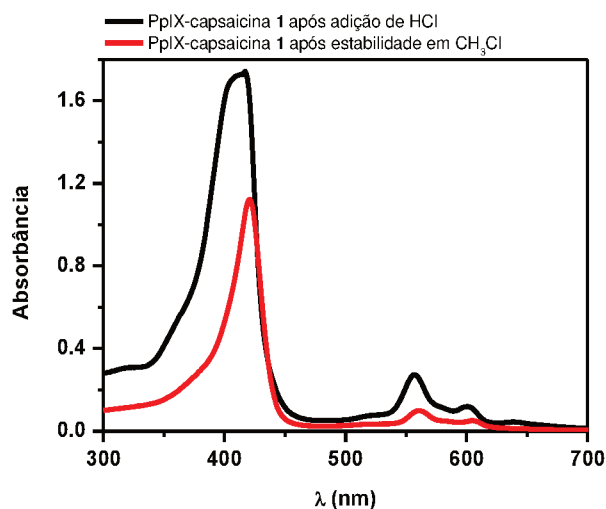
Figura 34 - Espectros de absorvância no UV-Vis da PpIX-capsaicina **1** a cada adição de HCl em metanol, onde (A) o monocátion (pH = 4,69 – 3,77) e (B) dicátion (pH = 3,38 – 0,57) são formados.



Fonte: Autora (2024).

A diprotonação, por sua vez, resultou em alterações opostas às observadas na monoproteção. Houve diminuição inicial da intensidade da banda Soret, seguida de aumento e deslocamento batocrômico, além do surgimento de bandas em 557 nm e 600 nm (Figura 34B). O último espectro registrado, com a maior concentração de HCl (pH = 0,57) na Figura 35, linha preta, apresentou perfil semelhante ao da Figura 29A (Figura 35, linha vermelha), indicando a diprotonação dos anéis tetrapirrólicos da PpIX-capsaicina **1** quando solubilizada em clorofórmio. Embora a banda em 668 nm tenha sido um dos primeiros indícios desse processo, reafirmado pela reversão parcial observada com a adição de trietilamina ao composto protonado, sua presença não pôde ser atribuída exclusivamente à protonação, já que a adição de HCl em metanol não resultou em mudanças significativas nessa banda.

Figura 35 - Espectros de absorvância no UV-Vis da PpIX-capsaicina **1** após a adição de HCl (linha preta) e após o experimento de estabilidade em clorofórmio (linha vermelha).

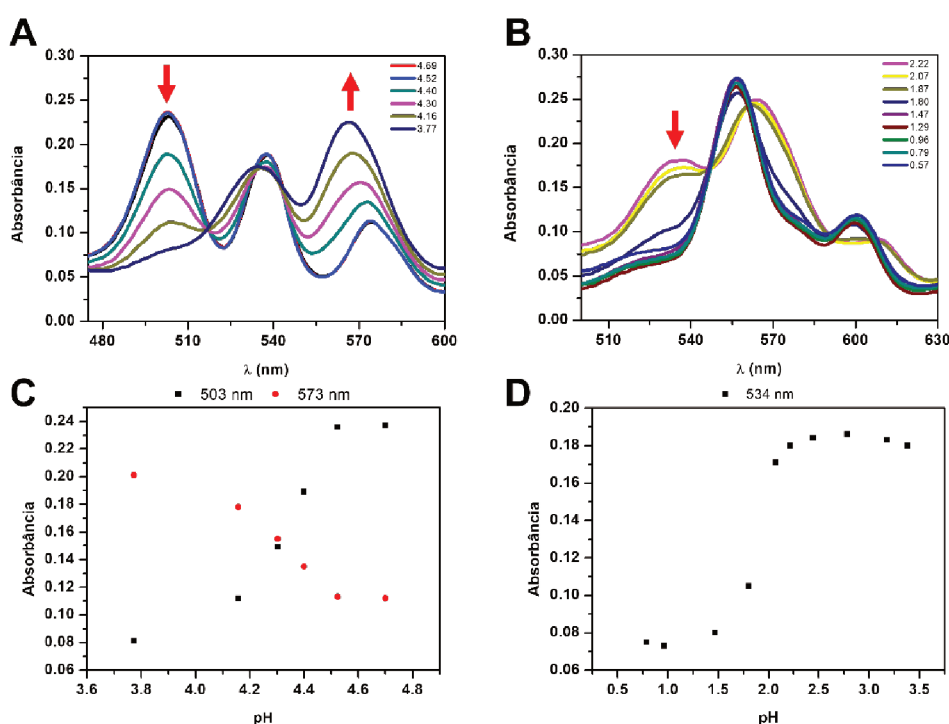


Fonte: Autora (2024).

Para a determinação do pKa de cada equilíbrio de protonação da PpIX-capsaicina **1**, foram selecionados comprimentos de onda correspondentes a bandas com comportamentos espectrais distintos, permitindo o monitoramento simultâneo da conversão entre as diferentes espécies durante a acidificação do meio (Gomes Do Carmo, 2022). Desse modo, para o equilíbrio de formação do monopróton (pK_3), foram escolhidos os comprimentos de onda de 503 nm, representando a diminuição da espécie neutra, e 573 nm, correspondente ao aumento da espécie protonada (Figuras 36A e 36C).

Para a formação da espécie diprotonada (pK_4), foi selecionado o comprimento de onda de 534 nm, que representa o decaimento da espécie monoprotonada, uma vez que a espécie diprotonada não pôde ser acompanhada de forma satisfatória (Figuras 36B e 36D). A partir da variação da absorbância nesses comprimentos de onda em função do pH, foi realizado o ajuste de curva sigmoidal para a determinação dos valores de pKa, apresentados na Tabela 4.

Figura 36 - Titulação espectrofotométrica da PpIX-capsaicina **1** em (A) e (C) pH = 4,69 – 3,77, referente ao equilíbrio da monoprotonação ($\lambda_{\text{espécie neutra}} = 503 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{espécie monoprotonada}} = 573 \text{ nm}$), (B) e (D) pH = 2,22 – 0,57, referente ao equilíbrio de diprotonação ($\lambda_{\text{espécie monoprotonada}} = 534 \text{ nm}$).



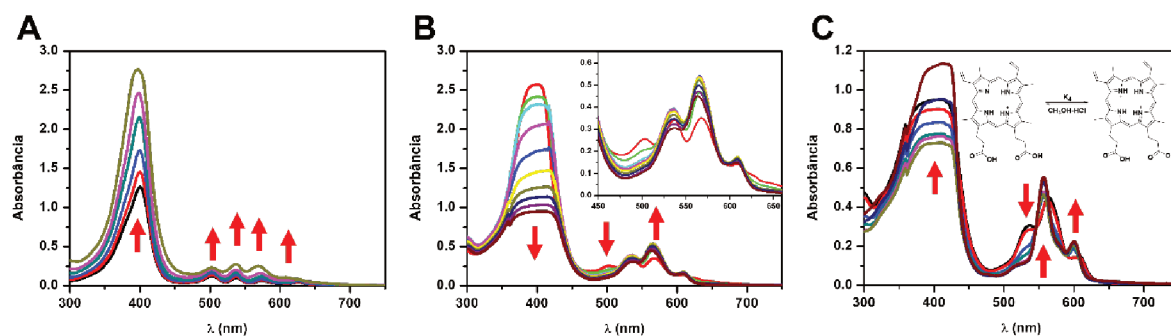
Fonte: Autora (2025).

As tendências espectrais da PpIX foram apresentadas em três gráficos devido à sua maior complexidade. Inicialmente, observou-se um aumento na intensidade de todas as bandas nas primeiras cinco adições de HCl-metanol (Tabela 7 – item 5.6), correspondendo a uma

variação de pH entre 4,69 e 4,15 (Figura 37A). Esse fenômeno pode estar associado a uma maior solubilização da porfirina no meio em função do aumento da polaridade. Na faixa de pH entre 4,04 e 2,07, a banda Soret apresentou redução de intensidade e alargamento, enquanto a banda Q em 502 nm sofreu diminuição de intensidade e a banda Q em torno de 564 nm apresentou um aumento de intensidade (Figura 37B).

O processo de monoprotonação, esperado nessa faixa de pH, não pôde ser acompanhado de forma satisfatória devido à perda de pontos isosbéticos, possivelmente em razão do perfil de autoagregação presente nesse equilíbrio. Apenas o processo de diprotonação pôde ser monitorado (Figura 37C), uma vez que o ponto isosbético em 545 nm permaneceu até pH = 0,57. Nesse equilíbrio, a banda Soret apresentou aumento de intensidade, assim como as bandas em 557 e 600 nm, enquanto a banda Q em 534 nm teve sua intensidade reduzida. Diferentemente da PpIX-capsaicina **1**, nenhuma banda em 668 nm foi detectada.

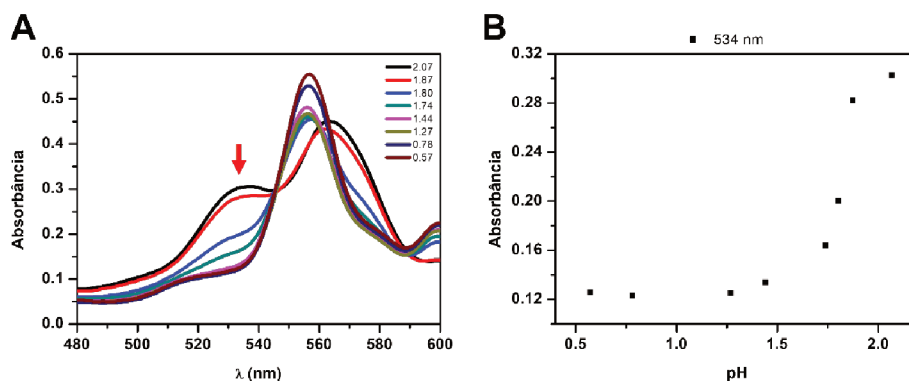
Figura 37 - Espectros de absorvância no UV-Vis da PpIX a cada adição de HCl em metanol, onde (A) pH = 4,69 – 4,15, (B) pH = 4,04 – 2,07 e (C) pH = 2,07 – 0,57, ocorre a diprotonação.



Fonte: Autora (2025).

O valor de pK₄ da PpIX foi determinado com base na redução da intensidade de absorvância em 534 nm (Figura 38A), correspondente ao decaimento da espécie monoprotonada. Seguindo a mesma abordagem empregada para a PpIX-capsaicina **1**, realizou-se o ajuste de curva sigmoidal (Figura 38B) para a obtenção do pK_a, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.

Figura 38 - Titulação espectrofotométrica da PpIX-capsaicina **1** em (A) e (B) pH = 2,07 – 0,57, referente ao equilíbrio de diprotonação ($\lambda_{\text{espécie monoprotônada}} = 534 \text{ nm}$).



Fonte: Autora (2025).

Os valores de pKa obtidos, apresentados na Tabela 4, evidenciam que a modificação da PpIX por esterificação com um fragmento de capsaicina impactou significativamente o equilíbrio de monoproteção. Em comparação com a PpIX-dimetil éster, a basicidade da porfirina neutra aumentou, mesmo com a esterificação de apenas um grupo carboxílico (Hynninen, 2014). Isso sugere que a adição de um segundo fragmento de capsaicina poderia tornar o centro pirrólico ainda mais básico.

Os valores experimentais de pK₄ para a PpIX e a PpIX-capsaicina **1** foram relativamente próximos, com um discreto aumento para o derivado modificado. Em comparação com o valor de pK₄ relatado por Hynninen (2014) para a PpIX, verificou-se um pKa inferior, o que pode ser atribuído ao deslocamento do equilíbrio ácido-base do macrociclo em função da temperatura (Klimovich; Krylov; Kruk, 2021). Esse fenômeno ocorre devido à maior desprotonação do centro pirrólico com o aumento da temperatura, resultando na redução do pKa. Tal diferença pode ser explicada pelo controle rigoroso de temperatura adotado por Hynninen (20°C), enquanto no presente estudo essa variável não pôde ser controlada (Hynninen, 2014).

Tabela 4 - Valores de pKa da PpIX e PpIX-capsaicina **1** obtidos por titulação espectrofotométrica com HCl-metanol.

Fotossensibilizador	pK ₃ (monoproteção)	pK ₄ (diproteção)
PpIX	a	+1,81
	a*	+2,37*
PpIX-dimetil éster*	+3,37*	+2,64*
PpIX-capsaicina 1	+4,33	+1,89

^a Mascarado por processos de autoagregação.

*Valor extraído de (Hynninen, 2014).

Fonte: Autora (2025).

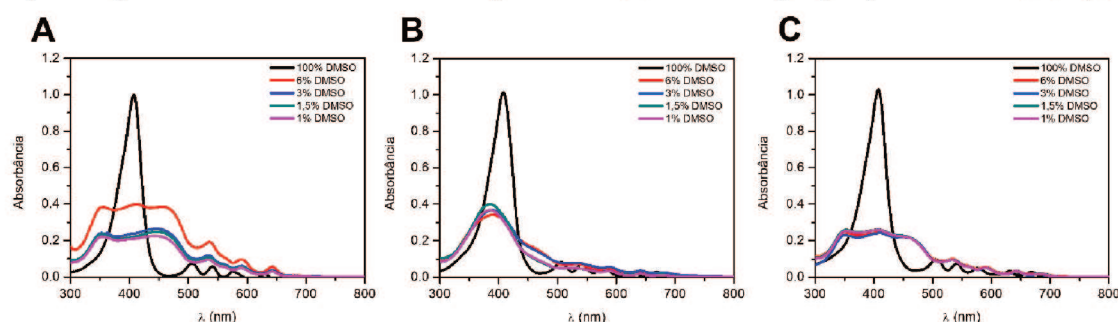
As análises comparativas entre a PpIX e a PpIX-capsaicina **1** evidenciaram diferenças significativas em seus comportamentos espectrais a partir da protonação. A PpIX apresentou um perfil mais complexo, com forte influência de autoagregação e dificuldades na identificação do equilíbrio de monoprotoneação. Em contraste, a PpIX-capsaicina **1** exibiu menor tendência à autoagregação e apresentou uma banda em 668 nm, que sugere processos de degradação. Essas distinções indicam que a modificação estrutural com capsaicina impacta diretamente as propriedades ácido-base e a estabilidade fotoquímica da porfirina.

3.6 Autoagregação dos híbridos PpIX-capsaicina **1** e **2** em meio aquoso

A PpIX possui um centro hidrofóbico volumoso e duas cadeias laterais hidrofílicas que, em meios aquosos, tendem a formar agregados. Esses agregados surgem a partir de interações intermoleculares entre os grupos COOH das cadeias laterais e empilhamentos π - π (Homayoni *et al.*, 2015; Monsù Scolaro *et al.*, 2002). Durante sua aplicação na TFD, a baixa solubilidade em água, associada à agregação, compromete os processos de fluorescência e a eficiência na produção de $^1\text{O}_2$.

Para investigar os efeitos de autoagregação dos novos derivados e analisar as mudanças espectrais associadas às espécies agregadas, foram obtidos espectros de absorção eletrônica no UV-Vis em misturas de água e DMSO, variando-se a proporção volume/volume (v/v) de 1 a 100%, mantendo-se constante a concentração de cada fotossensibilizador (Figura 39). As porfirinas foram facilmente solubilizadas em 100% de DMSO, apresentando espectros UV-Vis com uma banda Soret intensa e quatro bandas Qs menos intensas, características das formas monoméricas dos compostos (Homayoni *et al.*, 2015; Monsù Scolaro *et al.*, 2002). À medida que a proporção de DMSO foi reduzida para 6%, os espectros revelaram uma banda Soret alargada e de menor intensidade em todas as porfirinas, indicando um processo de agregação (Figura 39).

Figura 39 - Espectros de absorção no UV-Vis da (A) PpIX (B) PpIX-capsaicina **1** e (C) PpIX-capsaicina **2** solubilizadas em água e DMSO em uma proporção de 1 a 100% (v/v).



Fonte: Autora (2024).

Para a PpIX (Figura 39A) e o derivado **2** (Figura 39C), o espectro revelou uma banda Soret com três regiões distintas: uma banda deslocada para o azul (354 nm), uma banda central (408 nm para o derivado **2** e 410 nm para a PpIX) e uma banda deslocada para o vermelho (456 nm). Em cada porfirina, as intensidades dessas três bandas são semelhantes entre si, indicando a coexistência de espécies monoméricas e agregadas de tipo H e tipo J em solução (Homayoni *et al.*, 2015; Monsù Scolaro *et al.*, 2002). Os agregados de tipo H estão associados ao empilhamento face-a-face, enquanto os de tipo J resultam de um empilhamento cabeça-a-cauda. Por outro lado, o derivado **1** (Figura 39B), a 6% de DMSO, apresentou um deslocamento hipsocrômico da banda Soret (386 nm), evidenciando predominantemente agregados de tipo H (Homayoni *et al.*, 2015; Monsù Scolaro *et al.*, 2002).

Com a redução do DMSO para 3%, a PpIX mostrou a maior diminuição na intensidade de absorvância, exibindo um espectro com duas bandas distintas. Nesse caso, a banda deslocada para o vermelho (454 nm), associada a agregados de tipo J, apresentou intensidade ligeiramente superior à banda deslocada para o azul (354 nm). Em contrapartida, os derivados **1** e **2** exibiram pouca variação na intensidade de absorvância e no perfil de agregados ao se reduzir a proporção de DMSO de 6% para 1%.

Nas bandas Qs, a PpIX apresentou as maiores alterações, incluindo aumento de intensidade de absorção na região de 515 a 670 nm, deslocamento batocrômico e perda de definição. O derivado **2** manteve as intensidades de absorção praticamente inalteradas, com apenas perda de definição e deslocamento para o vermelho. Já o derivado **1** apresentou um perfil espectral de agregados mais distinto, com leve redução na intensidade de absorção das bandas Qs.

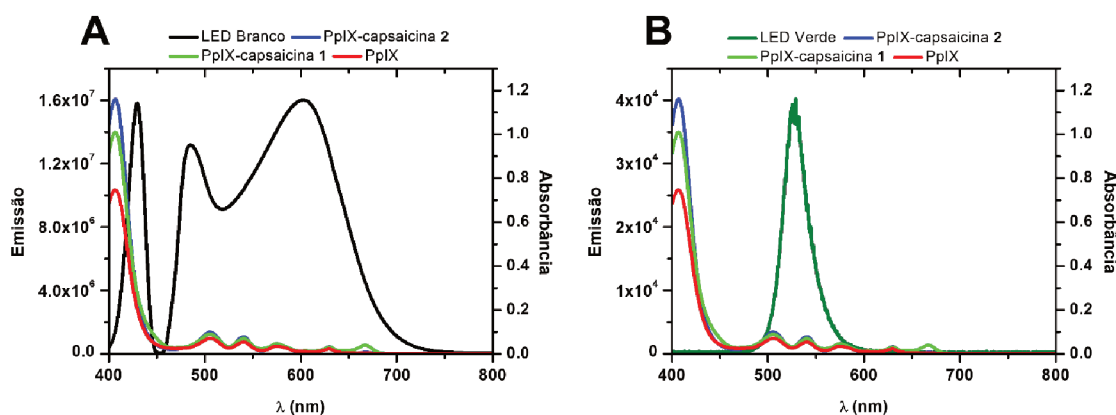
Desta forma, os derivados sintetizados demonstraram maior estabilidade frente à redução da proporção de DMSO em comparação à PpIX, especialmente na faixa de concentração aplicada em ensaios biológicos (1 a 5% de DMSO). Esse comportamento evidencia uma menor propensão à formação de novos tipos de agregados ou à alteração significativa da intensidade de absorção na presença de baixos teores de solvente orgânico. Essa característica é relevante para aplicações fotodinâmicas, pois sugere que os derivados mantêm suas propriedades espectrais e, potencialmente, sua eficiência fotodinâmica em condições mais próximas às do meio biológico.

3.7 Fotoestabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2

A fotodegradação de compostos, frequentemente reconhecida como um fenômeno indesejado, ocorre devido à autogeração de EROs sob irradiação luminosa. Embora fotossensibilizadores com menor energia do HOMO apresentem maior fotoestabilidade, o grau final de degradação é influenciado pela estabilidade intrínseca das moléculas, sua estrutura molecular e a quantidade de EROs geradas durante o processo (Sulek *et al.*, 2020). Nesse contexto, o fotobranqueamento caracteriza-se como um processo no qual moléculas fotossensibilizadoras perdem irreversivelmente a capacidade de fluorescência ou de geração de EROs após exposição à luz, sendo impulsionado por reações fotoquímicas que degradam a estrutura molecular, frequentemente iniciadas pela interação com as EROs geradas durante a excitação luminosa.

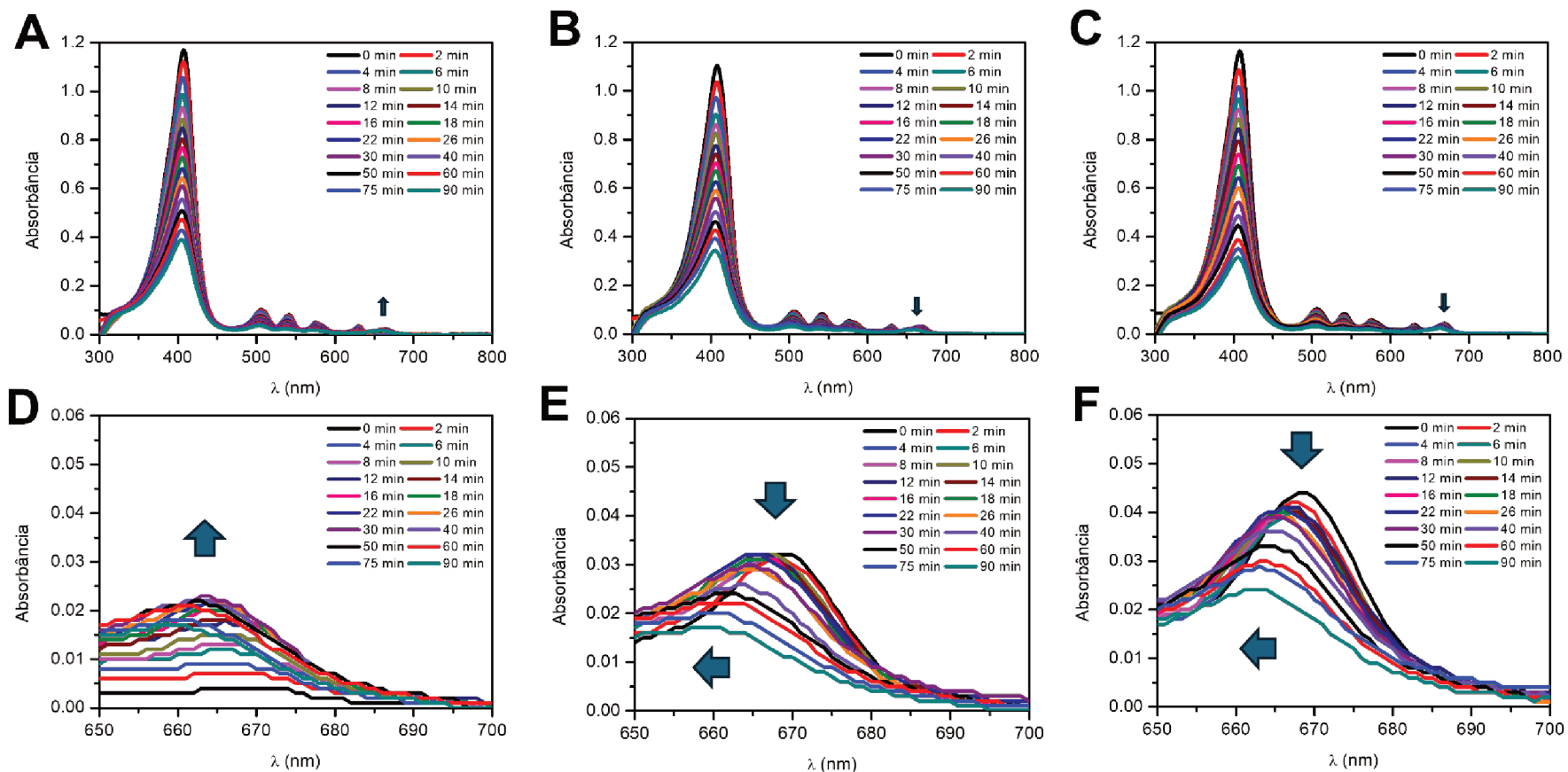
Para investigar os mecanismos de fotodegradação das porfirinas em função de diferentes comprimentos de onda, realizou-se o monitoramento dessas moléculas sob irradiação de LEDs branco e verde (Figura 39). O objetivo foi avaliar a fotoestabilidade dos derivados de PpIX por meio da análise dos espectros de UV-Vis ao longo de 90 minutos de irradiação, registrando pequenas variações na intensidade de absorção, especialmente em compostos que poderiam se degradar rapidamente. Os espectros obtidos ao longo do tempo foram organizados em gráficos únicos (Figuras 41 e 43) para analisar o comportamento das bandas Soret e Q de cada porfirina solubilizada em DMSO ao serem irradiadas.

Figura 40 - Sobreposição de emissão dos LEDs (A) Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$ à 10 cm de distância da amostra) e (B) Verde ($463,5 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ à 15 cm de distância da amostra) utilizados com os espectros de absorção no UV-Vis de cada porfirina.



Fonte: Autora (2024).

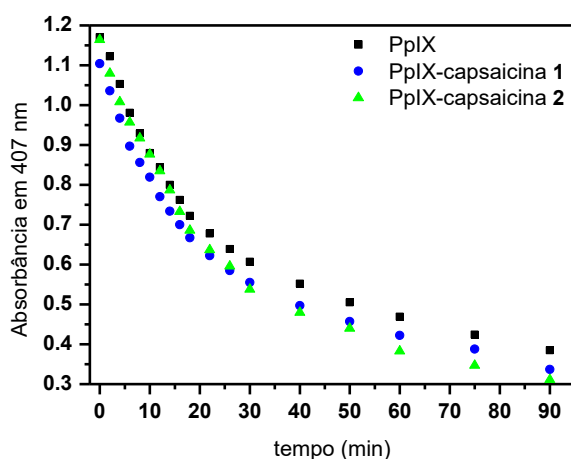
Figura 41 - Espectros obtidos a partir da fotodegradação a partir do LED Branco (14,1 mW/cm² à 10 cm de distância da amostra), registrados ao longo de 90 min da (A e D) PpIX, (B e E) PpIX-capsaicina **1** e (C e F) PpIX-capsaicina **2** em DMSO.



Fonte: Autora (2024).

Durante a irradiação com o LED Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$), observou-se uma diminuição na intensidade da banda Soret em todas as porfirinas (Figuras 41A-C). Na região de 650-700 nm, a PpIX apresentou o surgimento de uma banda em 670 nm (Figura 41D), cuja intensidade aumentou ao longo do tempo, comportamento associado à formação de fotoprodutos, como já relatado por Ericson et al. (2003) (Ericson *et al.*, 2003). Para os derivados PpIX-capsaicina **1** e **2** (Figuras 41E-F), as bandas previamente localizadas em 668 nm diminuíram em intensidade e apresentaram um leve deslocamento hipsocrômico durante a irradiação. A correlação entre a intensidade da banda Soret e o tempo de irradiação (Figura 42) revelou que a PpIX foi o composto menos fotodegradado, seguida pelo derivado **1** e pelo derivado **2**. Esse padrão pode ser atribuído aos maiores rendimentos quânticos de oxigênio singlete (Φ_Δ), que promovem maior degradação quanto maior a interação das EROs com o fotossensibilizador.

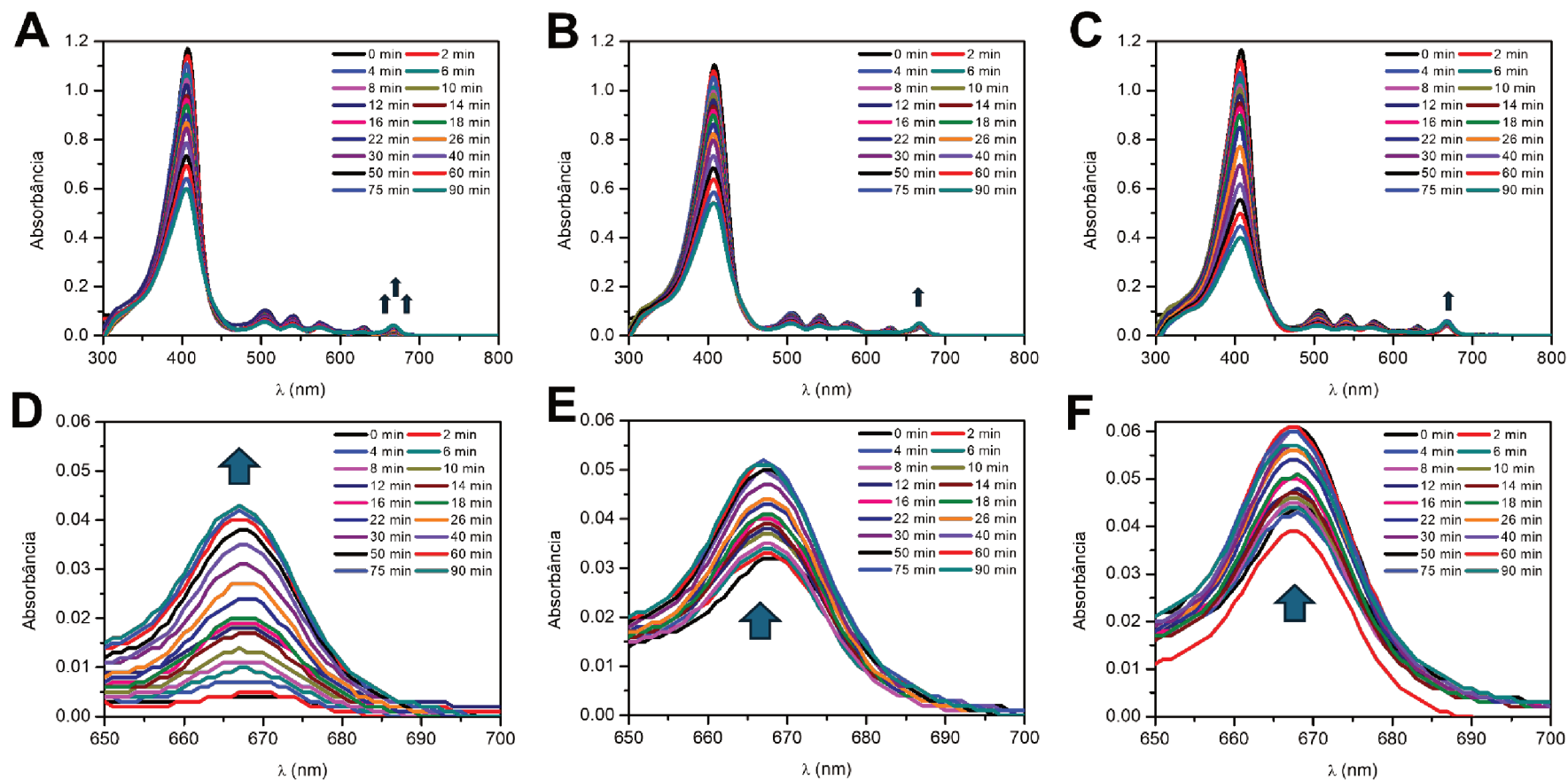
Figura 42 - Representação gráfica do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret em função do tempo de irradiação com LED Branco ($14,1 \text{ mW/cm}^2$, 10 cm de distância) em DMSO.



Fonte: Autora (2024).

A irradiação com o LED Verde ($463,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$) foi realizada pelo mesmo período, mas com doses de luz menores devido à menor potência do LED. Os espectros obtidos (Figura 43) indicaram diminuição na intensidade das bandas Soret para todas as porfirinas, sendo o derivado **2** (Figura 43C) o mais fotodegradado. Na região de 650-700 nm, as três porfirinas apresentaram aumento na intensidade das bandas, comportamento não observado sob irradiação com LED branco. A PpIX (Figura 43A) apresentou o aumento mais pronunciado na banda em 670 nm, enquanto os derivados mostraram incrementos mais discretos na intensidade das bandas em 668 nm.

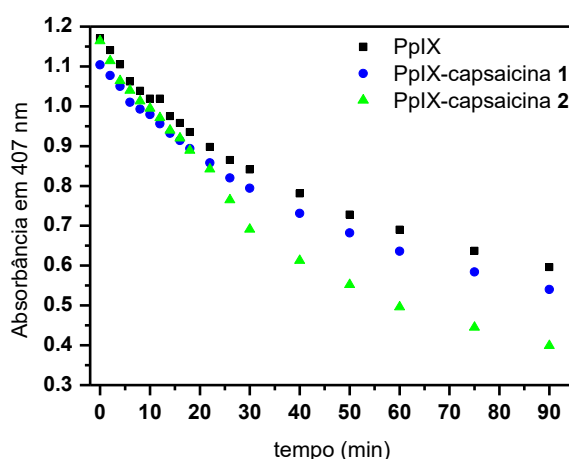
Figura 43 - Espectros obtidos a partir da fotodegradação a partir do LED Verde ($463,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 15 cm de distância), registrados ao longo de 90 min da (A e D) PpIX, (B e E) PpIX-capsaicina **1** e (C e F) PpIX-capsaicina **2** em DMSO.



Fonte: Autora (2024).

Os dados de intensidade da banda Soret ao longo do tempo (Figura 44) reforçam que a PpIX (Figura 44) foi o composto menos fotodegradado, seguida pelo derivado **1**, enquanto o derivado **2** apresentou padrão de fotobranqueamento ainda mais intenso, quando comparado às outras porfirinas.

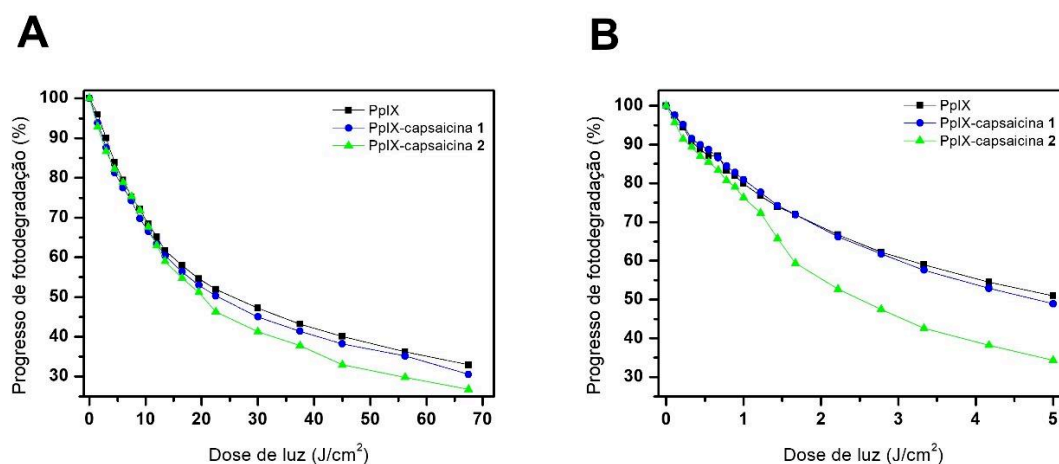
Figura 44 - Representação gráfica do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret em função do tempo de irradiação com LED Verde ($463,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 15 cm de distância) em DMSO.



Fonte: Autora (2024).

A análise da degradação em função da dose de luz utilizada (Figura 45) revelou que, para doses de aproximadamente $5 \text{ J}/\text{cm}^2$, a irradiação com LED Branco causou cerca de 20% de degradação em todos os fotossensibilizadores, enquanto o LED Verde resultou em 50% de degradação para a PpIX e o derivado **1**, e mais de 60% para o derivado **2**. Na dose máxima de luz (cerca de $70 \text{ J}/\text{cm}^2$), o LED Branco alcançou até 60% de fotodegradação.

Figura 45 - Gráficos do progresso de fotodegradação de cada FS, realizado em fontes de luz diferentes: (A) LED Branco ($0-70 \text{ J}/\text{cm}^2$) e (B) LED Verde ($0-5 \text{ J}/\text{cm}^2$).



Fonte: Autora (2024).

Esses resultados evidenciam a complexidade do processo de fotodegradação, reforçando a importância de escolher adequadamente a fonte de luz para aplicações em TFDA. Essa escolha deve priorizar condições nas quais o fotobranqueamento seja minimizado, especialmente em doses de luz mais baixas, garantindo maior eficiência terapêutica.

3.8 Determinação do coeficiente de partição (LogP)

FSs da classe das porfirinas, amplamente utilizados na TFD contra o câncer, também podem ser aplicados na TFDA devido às suas propriedades fotoquímicas, especialmente a capacidade de gerar oxigênio singlete (Alenezi *et al.*, 2017; Amos-Tautua; Songca; Oluwafemi, 2019; Nitzan *et al.*, 1992; Sulek *et al.*, 2020). Entretanto, a eficácia desses compostos depende de fatores estruturais que influenciam sua incorporação celular e localização subcelular, como o coeficiente de partição LogP, que reflete a natureza físico-química do composto (Sulek *et al.*, 2020).

O equilíbrio entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas, além da lipofilicidade do FS, desempenha um papel crucial na eficácia tanto da TFD quanto da TFDA. O coeficiente de partição n-octanol/água (logP) é amplamente aceito como um preditor da atividade biológica de fármacos e outros compostos ativos (Sulek *et al.*, 2020).

Nas células de mamíferos, a membrana celular é formada por uma bicamada fosfolipídica, que atua como barreira para moléculas hidrofílicas. Em contrapartida, moléculas anfifílicas e hidrofóbicas atravessam essa membrana com maior facilidade, sendo rapidamente transportadas para o interior da célula. No caso das bactérias, embora também possuam membranas compostas por uma bicamada de fosfolipídios, estas são cercadas por uma proteção celular adicional, seja por peptidoglicanos ou pela presença dos lipopolissacarídeos, o que afeta a interação com os FSs (Liu, 2015; Sulek *et al.*, 2020).

Devido a essas diferenças estruturais, FSs mais hidrofílicos tendem a apresentar maior eficácia na inativação bacteriana, pois conseguem se ligar à parede celular, ainda que não permeiem pela membrana. Por outro lado, FSs mais hidrofóbicos, apesar de atravessarem facilmente as membranas de células de mamíferos, geralmente enfrentam dificuldades em ultrapassar as paredes celulares bacterianas, limitando sua ação nesse contexto (Sulek *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o LogP de cada porfirina foi determinado em sistema n-octanol/água, pelo método “*Shake-flask*”, a fim de entender o comportamento de lipofilicidade a cada adição

de fragmento de capsaicina à PpIX. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 5 e representados visualmente no gráfico da Figura 46.

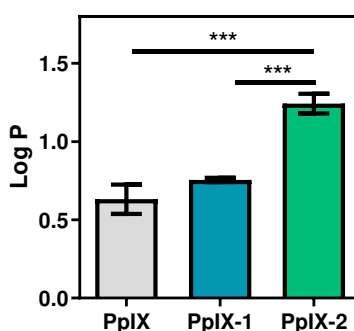
Tabela 5 - Valores de LogP das porfirinas PpIX e derivados 1 e 2 obtidos pelo método "shake-flask".

Composto	LogP
PpIX	0,63 ± 0,07
PpIX-capsaicina 1	0,75 ± 0,01
PpIX-capsaicina 2	1,24 ± 0,04

Fonte: Autora (2024).

A partir dos valores obtidos, a introdução de um fragmento de capsaicinóide aumenta a lipofilicidade discretamente, enquanto a introdução do segundo grupo torna a lipofilicidade duas vezes mais pronunciada, quando comparada à PpIX.

Figura 46 - Representação visual dos valores de LogP calculados e dispostos na Tabela 4. O experimento foi realizado em triplicata (n = 3), e por isso as barras de erro representam desvio padrão. ***p < 0,0001 são diferenças estatisticamente significativas pelo teste ANOVA.



Fonte: Autora (2024).

Com a modificação estrutural do cromóforo PpIX, a diferença se torna significativa apenas a partir do segundo fragmento de capsaicinóide adicionado, como pode ser visto no gráfico presente na Figura 46.

3.9 Inativação fotodinâmica das bactérias *S. aureus* e *E. coli*

A TFDA é uma abordagem promissora para enfrentar o aumento de bactérias multirresistentes (Liu, 2015). Essa técnica baseia-se na fotossensibilização de patógenos por FSs e apresenta vantagens importantes em relação aos antibióticos tradicionais. Entre elas estão: (1) O FS não apresenta toxicidade na ausência de luz, o que impede a bactéria de perceber a

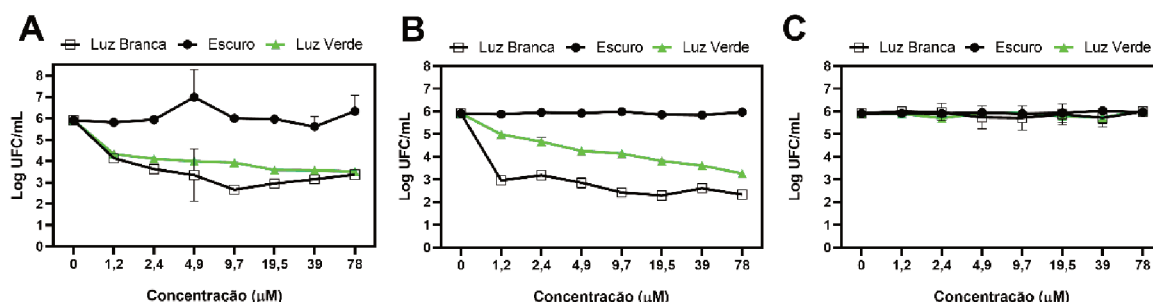
necessidade de desenvolver mecanismos de resistência contra o composto, (2) o intervalo entre administração do FS e a irradiação é curto o suficiente para que a bactéria não desenvolva resistência, e (3) após a irradiação, o dano celular é intenso e rápido o suficiente para impedir mecanismos de trocas genéticas, evitando o desenvolvimento de resistência à TFDA (Liu, 2015). Além disso, até o momento, não foi reportado resistência a FSs, com exceção de casos relacionados a bombas de efluxo, diferentemente dos antibióticos, cujo desenvolvimento de mecanismos de resistência adquirido se torna um problema recorrente após múltiplos tratamentos (Liu, 2015).

Neste estudo, a PpIX e seus derivados, modificados com fragmentos de capsaicinóides (PpIX-capsaicina **1** e **2**), foram aplicados em concentrações de 1,2 a 78 μM para inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus* e *E. coli*, sensíveis e multirresistentes). As irradiações ocorreram sob doses de 30 J/cm² com LED Branco e 2,5 J/cm² com LED Verde.

Para a linhagem sensível de *S. aureus* (ATCC 29213), a PpIX (Figura 47A), não demonstrou atividade antibacteriana em nenhuma concentração na ausência de luz. Após a irradiação, contudo, houve uma inativação bacteriana significativa, confirmando sua eficácia fotodinâmica como FS. Sob LED branco, a PpIX promoveu uma redução de ~1,7 log na menor concentração (1,2 μM) e alcançou redução máxima de ~3,3 logs em 9,7 μM . Concentrações superiores a este valor não apresentaram diminuição adicional significativa no número de células viáveis, possivelmente devido à autoagregação do FS e à maior produção de EROs resultando em fotodegradação do composto (Gerola, 2013; Uchoa; Oliveira; Baptista, 2010). Sob LED verde, os efeitos foram mais modestos, com uma redução máxima de ~2,38 logs observada em 19,5 μM .

A PpIX-capsaicina **1** (Figura 47B) também não inativou bactérias na ausência de luz. Mas mostrou uma inativação significativa após irradiação com LED branco, com uma redução de ~2,9 logs na menor concentração testada (1,2 μM) e atingiu ~3,6 logs em 19,5 μM . Sob LED verde, a redução foi contínua com o aumento da concentração, alcançando ~2,7 logs na maior concentração avaliada (78 μM). Em contrapartida, a PpIX-capsaicina **2** (Figura 47C) não mostrou redução significativa no número de células viáveis, mesmo após irradiação, o que pode ser explicado por sua instabilidade frente à autoagregação, fotodegradação e maior hidrofobicidade, dificultando sua eficácia fotodinâmica como FS.

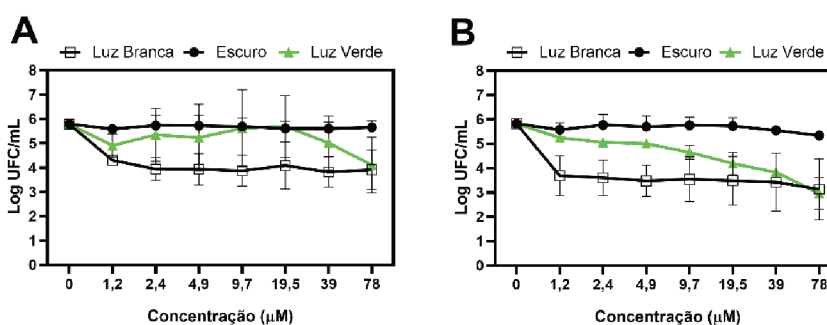
Figura 47 - Redução da população microbiana da *S. aureus* (ATCC 29213) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX, (B) PpIX-capsaicina **1** e (C) PpIX-capsaicina **2**. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média de dois experimentos ($n = 2$).



Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

Na linhagem multirresistente de *S. aureus* (ATCC BAA 44), o comportamento foi semelhante. A PpIX (Figura 48A) reduziu $\sim 1,28$ logs na menor concentração ($1,2 \mu\text{M}$) e alcançou $\sim 1,78$ logs em $39 \mu\text{M}$. Por outro lado, a PpIX-capsaicina **1** (Figura 48B) apresentou maior eficiência, reduzindo $\sim 1,89$ logs na menor concentração e $\sim 2,2$ logs na concentração máxima ($78 \mu\text{M}$). Esses resultados indicam que a PpIX-capsaicina **1** sintetizada neste trabalho foi mais eficaz do que a PpIX comercial, especialmente para *S. aureus*, devido, possivelmente, à maior produção de EROs e à menor formação de agregados em solução aquosa.

Figura 48 - Redução da população microbiana da *S. aureus* (ATCC BAA 44) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina **1**. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média da duplicata ($n = 2$).

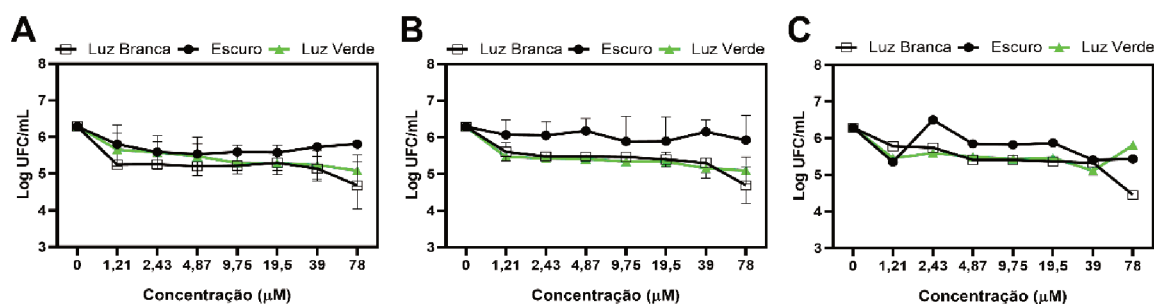


Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

No caso da linhagem sensível de *E. coli* (ATCC 25922), a PpIX (Figura 49A) e a PpIX-capsaicina **1** (Figura 49B) apresentaram fotoinativação menos expressiva do que em *S. aureus* para ambas as doses de luz aplicadas. A PpIX reduziu $\sim 0,55$ logs na menor concentração ($1,2 \mu\text{M}$) e $\sim 1,12$ logs na maior concentração ($78 \mu\text{M}$). A PpIX-capsaicina **1** alcançou redução máxima de $\sim 1,23$ logs na maior concentração, enquanto a PpIX-capsaicina **2** não mostrou um

padrão consistente de fotoinativação em função da concentração. A menor eficiência contra *E. coli* provavelmente está associada a maior dificuldade de permeabilidade e incorporação do FS através da membrana bacteriana, devido à dupla bicamada lipídica presente na membrana de bactérias Gram negativas (Liu, 2015).

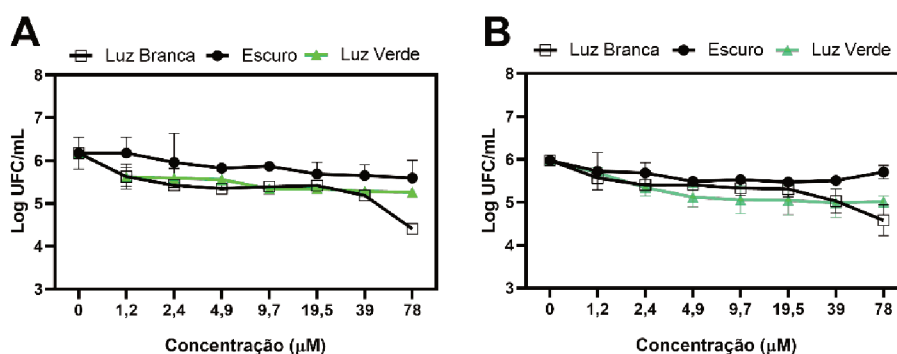
Figura 49 - Redução da população microbiana da *E. coli* (ATCC 25922), por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina **1** e (C) PpIX-capsaicina **2**. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média de dois experimentos ($n = 2$).



Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

Por fim, a linhagem multirresistente de *E. coli* (ATCC BAA 198) apresentou resultados semelhantes aos da linhagem sensível. Na menor concentração (1,2 μM), a PpIX (Figura 50A) reduziu $\sim 0,54$ logs, enquanto a PpIX-capsaicina **1** (Figura 50B) apresentou redução de $\sim 0,12$ logs. Na maior concentração (78 μM), ambas apresentaram reduções semelhantes ($\sim 1,19$ logs para PpIX e $\sim 1,13$ logs para PpIX-capsaicina **1**).

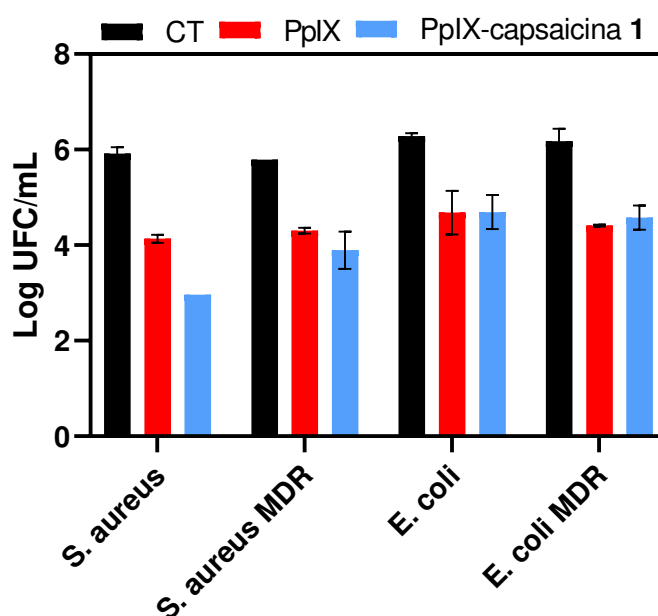
Figura 50 - Redução da população microbiana da *E. coli* (ATCC BAA 198) por meio da TFDA em função da concentração da (A) PpIX e (B) PpIX-capsaicina **1**. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão da média da duplicata ($n = 2$).



Fonte: Autora (2024), feito em parceria com o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

Ao compilar os resultados das quatro linhagens de bactérias testadas (*S. aureus* sensível, *S. aureus* MDR, *E. coli* e *E. coli* MDR) em um único gráfico (Figura 51), fica evidente que a nova molécula (PpIX-capsaicina **1**) sintetizada neste trabalho teve melhor efeito fotodinâmico do que seu precursor comercial (PpIX), para as bactérias Gram-positivas.

Figura 51 - Gráfico comparativo em barras da *S. aureus* sensível, *S. aureus* multirresistente (MDR), *E. coli* e *E. coli* multirresistente (MDR), tratadas na ausência de porfirina (CT) e na presença de PpIX e PpIX-capsaicina **1** na menor concentração (1,2 μ M), irradiada irradiadas com LED branco a 30 J/cm². As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (n = 2).



Fonte: Autora (2024).

Esses achados evidenciam o potencial da TFDA no combate a infecções bacterianas, destacando a maior eficácia da PpIX-capsaicina **1** em relação à PpIX comercial, especialmente contra *S. aureus*. Contudo, a menor fotoinativação observada em *E. coli* ressalta a necessidade de futuras otimizações para expandir a aplicação dessa técnica aplicada a bactérias Gram-negativas, cuja permeabilidade é limitada devido à presença de uma dupla bicamada lipídica e a membrana externa composta por lipopolissacarídeos (Liu, 2015).

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigaram-se novos fotossensibilizadores derivados da PpIX, com intuito de propor novas moléculas capazes de superar as dificuldades encontradas nos casos de bactérias resistentes *via* mecanismo intrínseco mediado por bombas de efluxo. Para isso, acoplou-se o fragmento capsaicina na PpIX, uma vez que a capsaicina é conhecidamente um inibidor de bomba de efluxo da bactéria *S. aureus*. Foram avaliadas as propriedades espectroscópicas, fotodegradação e potencial antimicrobiano dos novos derivados PpIX contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo linhagens sensíveis e multirresistentes.

Durante a síntese das porfirinas, obtiveram-se os derivados PpIX-capsaicina **1** e PpIX-capsaicina **2**, caracterizados por uma mistura funcionalizada com capsaicinóides. Os estudos espectroscópicos em UV-Vis revelaram alterações eletrônicas significativas nos derivados, com influência direta do ambiente químico. Essas mudanças foram atribuídas a uma menor fotoestabilidade dos derivados, além de uma maior basicidade do centro pirrólico neutro à medida que se aumenta o número de fragmentos capsaicinóides no cromóforo.

Os testes de fotoinativação demonstraram que a PpIX-capsaicina **1** possui propriedades superiores ao precursor PpIX em relação à fotoinativação de *S. aureus* sensível e multirresistente. Isso se deve, provavelmente, à sua maior produção de oxigênio singlete ($\phi_{\Delta} = 0,99$), menor tendência de formar diferentes tipos de agregados e maior valor de LogP (0,75) que da PpIX (0,63), o que favorece sua biodisponibilidade. Apesar da maior taxa de fotodegradação observada nos derivados, a PpIX-capsaicina **1** manteve eficiência fotodinâmica considerável, especialmente contra bactérias Gram-positivas.

Por outro lado, a PpIX-capsaicina **2** não apresentou fotoatividade nenhuma, o que pode ser explicado pela instabilidade à fotodegradação, pela maior tendência à autoagregação, maior valor log P, fatores que comprometem sua eficácia fotodinâmica. No caso das bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, a fotoinativação foi menos eficiente, refletindo a menor afinidade das porfirinas neutras pelas membranas dessas células. Ainda assim, a PpIX-capsaicina **1** apresentou alguma atividade em concentrações mais altas, mostrando-se superior ao derivado PpIX-capsaicina **2**.

Conclui-se que a PpIX-capsaicina **1** se destaca como um FS promissor para a TFDA, especialmente no combate a bactérias Gram-positivas, devido à sua capacidade eficiente de geração de EROs e à provável inibição das bombas de efluxo NorA, proporcionada pelo fragmento de capsaicina, o que favorece sua incorporação nas células bacterianas. Contudo, as limitações observadas em relação às bactérias Gram-negativas evidenciam a necessidade de

investigações futuras para otimizar a interação de porfirinas com essas células, explorando estratégias inovadoras, como a inibição de bombas de efluxo, uma abordagem ainda pouco aplicada a esse tipo de bactéria.

5 METODOLOGIA

5.1 Informações Gerais

A menos que especificado, todas as reações foram realizadas utilizando reagentes comerciais e os solventes foram usados sem purificação adicional. O diclorometano (DCM) e a trietilamina (Et_3N) foram previamente destilados. A cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel Macherey-Nagel (230-400 mesh ASTM). A cromatografia em camada fina analítica foi realizada em placas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F254 (Sigma-Aldrich) e a revelação das placas foi feita utilizando luz UV (254 nm) e/ou atmosfera de iodo. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C APT foram adquiridos em CDCl_3 ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ a 400 MHz (^1H) e 101 MHz (^{13}C APT) (Bruker Ascend 400) da Rede de Laboratórios Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (Relam-IQUFU). Os deslocamentos químicos (δ) são relatados em ppm utilizando o pico do solvente residual como padrão interno (CDCl_3 : 7,26 ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$: 2,05 ppm, TMS: 0,00 ppm para espectros de RMN de ^1H , e CDCl_3 : 77,16 ppm, para espectros de RMN de ^{13}C APT). A multiplicidade do pico é relatada usando as seguintes abreviações: s = singlete, d = duplete, t = tripleto, dd = duplete de dupletos, m = multiplete. A multiplicidade é seguida da constante(s) de acoplamento em Hz e integração. Para espectros de RMN de ^{13}C APT, picos apontando para cima correspondem a carbonos primários e terciários, e picos apontando para baixo correspondem a carbonos secundários e quaternários. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi medida utilizando ionização por eletrospray (ESI) por injeção direta (Bruker Daltonics Corporation, geometria Q-TOF Impact II).

5.2 Síntese dos híbridos de Protoporfirina IX (PpIX) com capsaicina

Para obter a PpIX-capsaicina **2**, foram acrescentados 0,053 mmol de (PpIX) e 0,079 mmol de capsaicina (pureza 60%), juntamente com 0,1 mmol de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0,005 mmol de 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) a 1 mL de dimetilformamida (DMF), em agitação e temperatura ambiente por 96h. A reação foi interrompida com adição de 5 mL de água gelada e o sólido resultante filtrado à vácuo ($m = 59,8$ mg).

O sólido filtrado foi submetido à purificação por cromatografia em coluna, utilizando diclorometano/metanol 98:2 como fase móvel e sílica flash como fase estacionária. Assim, foram isolados dois produtos: 24,3 mg do produto diesterificado (sólido de coloração roxa) (**2**) ($R=40\%$), e 2,0 mg do produto monoesterificado (**1**) ($R=4\%$).

Para a síntese da PpIX-capsaicina **1**, foram acrescentados 0,053 mmol de PpIX, 0,053 mmol de capsaicina e 0,005 mmol de DMAP a 3 mL de DMF, sob agitação e temperatura ambiente. O EDC foi adicionado aos poucos, em alíquotas de 100 µL (solução de 0,053 mmol em 2 mL de DMF). A formação de produtos só foi visualizada 12h após a adição total de EDC, e a reação foi interrompida assim que se iniciou a formação de produto diesterificado (**2**).

Foi feita extração com diclorometano (DCM) e purificação por cromatografia em coluna, utilizando diclorometano/metanol 98:2 como fase móvel e sílica flash como fase estacionária, resultando em 7,8 mg do produto monoesterificado (sólido de coloração roxa) (**1**) (R=17%).

5.3 Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ_Δ)

O experimento de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foi feito em parceria com o LaFOT (UFU) e o de rendimento quântico de oxigênio singlete foi feito pela Dra. Helena Couto Junqueira em colaboração com Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces (LPFI) do Instituto de Química da USP. Para a determinação dos Φ_f e Φ_Δ , cada FS foi solubilizado em álcool etílico absoluto P.A de modo a garantir a Abs < 0,3 no comprimento de onda de excitação, com o intuito de diminuir o efeito do filtro interno.

Os espectros de fluorescência dos derivados PpIX-capsaicina **1** e PpIX-capsaicina **2** registrados em etanol à temperatura ambiente foram utilizados para determinar o rendimento quântico de emissão, de acordo com a Equação 1.

$$\Phi_f = \frac{S_{em}}{S_{em}^P} \frac{\varepsilon^P C^P}{\varepsilon C} \Phi_{em}^P \quad (1)$$

Em que,

Φ_f = rendimento quântico do composto de interesse;

S_{em} = rendimento quântico de emissão do composto padrão;

Φ_{em}^P = 0,09 (referência);

C^P = concentração molar do composto padrão;

εC = absortividade molar do composto padrão no comprimento de onda de excitação;

ε = absortividade molar da amostra no comprimento de onda de excitação;

S_{em} = área da banda de emissão da amostra;

S_{em}^P = área da banda de emissão do composto padrão.

Como padrão de emissão, foi utilizado a PpIX (Myrzakhmetov *et al.*, 2021).

O oxigênio singlete emite fosforescência no infravermelho próximo ($\lambda_{\text{máx}} \approx 1270 \text{ nm}$), por isso os decaimentos da intensidade de fosforescência do oxigênio singlete (medidos em 1270 nm) dos derivados PpIX-capsaicina **1** e PpIX-capisacina **2** foram registrados em etanol à temperatura ambiente e determinou-se o rendimento quântico de oxigênio singlete Φ_{Δ} , de acordo com a Equação 2.

$$\Phi_{\Delta}^b = \frac{\Phi_{\Delta}^a}{I^a} I^b \quad (2)$$

Em que,

Φ_{Δ}^b = rendimento quântico de oxigênio singlete composto de interesse;

Φ_{Δ}^a = rendimento quântico de oxigênio singlete do composto padrão;

I^a = intensidade de fosforescência (em 1270 nm) inicial do oxigênio singlete do composto padrão;

I^b = intensidade de fosforescência (em 1270 nm) inicial do oxigênio singlete do composto de interesse.

Como composto padrão de rendimento quântico de oxigênio singlete, foi utilizado $\Phi_{\Delta} = 0,92$ da PpIX em etanol (Myrzakhmetov *et al.*, 2021).

5.4 Espectroscopia de absorção no UV-Visível dos híbridos de PpIX-capsaicina **1** e **2**

Para avaliar o perfil do espectro de absorção dos compostos em diferentes solventes, foi preparada uma solução estoque em clorofórmio de modo que uma alíquota de 100 μL fosse diluída para 2 mL em uma cubeta, e a absorbância da banda Soret ajustada para 1. Alíquotas do mesmo volume (100 μL) de cada foram transferidas para diferentes frascos e os solventes foram secos com fluxo de N_2 , para posterior adição de mesmo volume de solventes de diferentes polaridades: água, etanol, dimetilsulfóxido, clorofórmio, acetonitrila e acetona.

Foram realizados espectros de absorção no UV-Vis de cada solução preparada a fim de avaliar qual o perfil de cada composto em solventes diversos, além de avaliar o solvente que solubilizou mais efetivamente cada composto.

5.5 Análise de estabilidade química em diferentes solventes para os derivados **1** e **2**

Foram feitas análises de estabilidade em clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) para avaliar alterações no espectro de absorção em função do tempo, além de avaliar diferenças nos espectros a partir da exposição das soluções à luz ambiente. Na estabilidade em DMSO, foram selecionadas as soluções preparadas para o item **6.2** para avaliar, a cada 24h, durante 6 dias.

A análise em clorofórmio foi feita a partir de 2 soluções dos derivados **1** e **2** preparadas em um frasco âmbar, a fim de limitar a exposição à luz, e em um frasco transparente, com a absorbância na banda Soret de cada amostra ajustada para 1. A partir disso, foram feitos espectros de absorção no UV-vis após 0,5h, 1h e 24h.

5.6 Comportamento da PpIX-capsaicina **1** na presença de HCl e pKa

O preparo da solução de HCl em metanol foi realizada sob atmosfera de argônio, a partir da adição gota a gota de 17 mL de ácido clorídrico 37%, com auxílio de um funil de separação, a 12 mL de ácido sulfúrico concentrado situado em um kitassato vedado com rolha. O HCl gasoso formado foi borbulhado em um balão de 50 mL contendo 25 mL MeOH, em banho de gelo e sob agitação, por meio de um tubo de vidro conectado às vidrarias. Todo o preparo foi feito sob atmosfera de argônio. Uma alíquota da solução final (2,5 mL) foi diluída para 10 mL e titulada com 0,100 g de carbonato de cálcio solubilizado em 50 mL de água destilada, em triplicata, utilizando o indicador alaranjado de metila 0,01% m/m em H₂O. Assim, foi determinada a concentração de 2,5 mol L⁻¹ de HCl.

Para a titulação do derivado PpIX-capsaicina **1**, foram feitas novas soluções por meio da diluição do estoque de HCl em metanol (2,5 mol L⁻¹) para 0,01, 0,1 e 1 mol L⁻¹. Diferentes alíquotas de cada solução seguindo a Tabela 6, da mais diluída a mais concentrada, foram adicionadas à 16 µM da PpIX-capsaicina **1** em metanol, seguindo o procedimento experimental de Hynninen, (2014) (Hynninen, 2014). A cada volume aliquotado, espectros de absorção eram monitorados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-2501PC).

Tabela 6 – Espectros de absorção no UV-Vis registrados durante a titulação para a protonação da PpIX-capsaicina **1**, $c = 16 \times 10^{-6}$ M.

Espectro	Volume adicionado de HCl em metanol (µL)	[HCl] (mol L ⁻¹)	Volume na cubeta (µL)	n HCl (mol)	C [H ⁺] (mol L ⁻¹)	pH
1	4	0,01	2004	0.04	0,00002	4.70
2	2	0,01	2006	0.06	0,00003	4.52
3	2	0,01	2008	0.08	0,00004	4.40
4	2	0,01	2010	0.1	0,00005	4.30
5	4	0,01	2014	0.14	0,00007	4.16

6	2	0,1	2016	0.34	0.00017	3.78
7	5	0,1	2021	0.84	0.00042	3.38
8	5	0,1	2026	1.34	0.00066	3.18
9	2	1,0	2028	3.34	0.00165	2.78
10	2	1,0	2030	5.34	0.00263	2.56
11	2	1,0	2032	7.34	0.00361	2.44
12	5	1,0	2037	12.34	0.00606	2.22
13	5	1,0	2042	17.34	0.00849	2.07
14	10	1,0	2052	27.34	0.01332	1.87
15	2	2,5	2054	32.34	0.01574	1.80
16	15	2,5	2069	69.84	0.03375	1.47
17	15	2,5	2084	107.34	0.05151	1.29
18	50	2,5	2134	232.34	0.10887	0.96
19	50	2,5	2184	357.34	0.16362	0.79
20	100	2,5	2284	607.34	0.26591	0.57

Fonte: Autora (2024).

Para a titulação da PpIX, foram utilizadas as mesmas soluções obtidas da diluição do estoque de HCl em metanol ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$) para 0,01, 0,1 e 1 mol L^{-1} . Diferentes alíquotas de cada solução seguindo a Tabela 7, da mais diluída a mais concentrada, foram adicionadas à $10 \text{ }\mu\text{M}$ da PpIX em metanol. A cada volume aliqotado, espectros de absorção eram monitorados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-2501PC).

Tabela 7 - Espectros de absorção no UV-Vis registrados durante a titulação para a protonação da PpIX, $c = 10 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Espectro	Volume adicionado de HCl em metanol	[HCl] (mol L^{-1})	Volume na cubeta (μL)	n HCl (mol)	C [H^+] (mol L^{-1})	pH
1	4	0.01	2004	0.04	0,00002	4.69
2	2	0.01	2006	0.06	0,00003	4.52
3	2	0.01	2008	0.08	0,00004	4.39
4	2	0.01	2010	0.1	0,00005	4.30
5	4	0.01	2014	0.14	0,00007	4.16

6	4	0.01	2018	0.18	0,00009	4.05
7	2	0.1	2020	0.38	0.00019	3.72
8	5	0.1	2025	0.88	0.00043	3.36
9	5	0.1	2030	1.38	0.00068	3.17
10	2	0.1	2032	1.58	0.00078	3.11
11	2	1	2034	3.58	0.00176	2.75
12	2	1	2036	5.58	0.00274	2.56
13	2	1	2038	7.58	0.00372	2.43
14	5	1	2043	12.58	0.00616	2.21
15	5	1	2048	17.58	0.00858	2.07
16	10	1	2058	27.58	0.01340	1.87
17	2	2.5	2060	32.58	0.01581	1.80
18	2	2.5	2062	37.58	0.01822	1.74
19	15	2.5	2077	75.08	0.03615	1.44
20	15	2.5	2092	112.58	0.05381	1.27
21	100	2.5	2192	362.58	0.16541	0.78
22	100	2.5	2292	612.58	0.26727	0.57
23	300	2.5	2592	1362.58	0.52569	0.28
24	200	2.5	2792	1862.58	0.66711	0.17

Fonte: Autora (2024).

5.7 Autoagregação dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2 em meio aquoso

As soluções das porfirinas foram preparadas a partir de alíquotas de 20 μL de uma solução estoque concentrada em DMSO. O volume da alíquota foi ajustado de forma que a amostra diluída para 2 mL (100% DMSO) tivesse $\text{Abs}_{408\text{nm}} \approx 1$. Dessa forma, foram preparadas soluções contendo água e DMSO nas proporções de 6%, 3%, 1,5% e 1% de DMSO. Espectros de absorvância foram registrados, a partir de um espectrofotômetro Shimadzu (UV-2501PC) para cada solução preparada. A diminuição da banda Soret e qualquer outra variação espectral foi investigada como parte do processo de autoagregação (Sulek *et al.*, 2020).

5.8 Fotoestabilidade dos híbridos PpIX-capsaicina 1 e 2

As soluções das porfirinas foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque concentrada em DMSO. As soluções preparadas com $\text{Abs}_{408\text{nm}} \approx 1$ foram irradiadas utilizando-

se LED verde ($463,5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ em 526 nm, 15 cm de distância), com doses variando de 0-5 J/cm² e LED branco ($14,1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ em 430 nm, 10 cm de distância), com doses variando de 0-70 J/cm², à temperatura ambiente. Espectros de absorvância foram registrados, a partir de um espectrofotômetro Shimadzu (UV-2501PC), em intervalos de 2, 4, 10 e 15 minutos, durante 90 minutos. A diminuição da banda Soret foi investigada como parte do processo de fotodegradação (Sulek *et al.*, 2020).

5.9 Determinação do coeficiente de partição (LogP)

O coeficiente de partição foi determinado pelo método de agitação em frasco ("*shake-flask method*"). Devido à solubilidade parcial das porfirinas no sistema n-octanol/água, 0,3 mg de cada composto foi dissolvido em 100 μL de DMSO. A amostra foi agitada em vórtex até que todo o composto estivesse dissolvido. Em seguida, foram adicionados 5 mL de água 5 mL de *n*-octanol ao frasco. A mistura resultante foi agitada em vórtex por 10 minutos. Posteriormente, a amostra foi deixada em repouso para garantir uma separação precisa das fases. Em seguida, 200 μL de cada fase foi retirada e diluída em 2,0 mL de DMSO para leitura da absorvância no espectrofotômetro. O cálculo de LogP foi feito a partir da equação (3) (Soares *et al.*, 2022; Sulek *et al.*, 2020).

$$\log P = \log \left(\frac{A_{\text{octanol}}}{A_{\text{água}}} \right) \quad (3)$$

Em que,

$\log P$ = coeficiente de partição;

A_{octanol} = valor de absorvância em $\lambda_{\text{máx}}$ do composto em octanol;

$A_{\text{água}}$ = valor de absorvância em $\lambda_{\text{máx}}$ do composto em água.

5.10 Inativação fotodinâmica das bactérias *S. aureus* e *E. coli*

A atividade antibacteriana foi realizada frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), sensíveis a maioria dos antimicrobianos; *S. aureus* (ATCC BAA 44) e *E. coli* (ATCC BAA 198) multirresistentes (resistentes a mais de três classes de antimicrobianos) em parceria com o Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique G. Martins. As bactérias fazem parte da American Type Culture Collection (ATCC) e estavam criopreservados a -80°C no LEA da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Inicialmente, foram pesados 1 mg de cada composto e solubilizados em DMSO, o que resultou em soluções estoque de concentração 1,17 mM dos derivados de PpIX-capsaicina **1** e **2**. Posteriormente, foram retirados 125 µL dos estoques e diluídos em 500 µL de caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), definida como solução mãe. A partir de 50 µL de cada solução-mãe adicionados ao primeiro poço em uma placa de 96 poços, foi realizada a diluição seriada seguindo a técnica de microdiluição em caldo, a fim de atingir as concentrações finais de 78 µM-1,2 µM (Anane *et al.*, 2020; CLSI, 2018; Sulek *et al.*, 2020). Os inóculos bacterianos foram ajustados na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), resultando em $1-2 \times 10^8$ UFC/mL de células bacterianas por poço (Sabino *et al.*, 2019). Inicialmente, todas as 3 placas foram incubadas no escuro por 15 min a 37°C para incorporação dos fotossensibilizadores nas células bacterianas (Anane *et al.*, 2020; Sabino *et al.*, 2019). Após a incubação, uma placa foi mantida no escuro como controle, a segunda foi irradiada com LED branco com dose de 30 J/cm² e outra placa foi irradiada com LED verde com dose de 2,5 J/cm² (Anane *et al.*, 2020; Sabino *et al.*, 2019; Sulek *et al.*, 2020).

Imediatamente após a irradiação, as suspensões foram diluídas em caldo BHI para obter diluições de 10^{-1} a 10^{-7} vezes a concentração inicial (Sabino *et al.*, 2019). Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram acrescentadas em placas petri contendo ágar Mueller Hinton (MHA) em duplicata e incubadas à 37°C durante 24h para a bactéria Gram-positiva e 16h para a Gram-negativa, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (Lin *et al.*, 2021; Sabino *et al.*, 2019).

6 REFERÊNCIAS

ACUNHA, T. V. **Caracterização e avaliação da atividade fotodinâmica de tetra-meso-[(piridil)porfirina] platina (II) frente à microorganismos.** 2017. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/13928>. Acesso em: 6 jan. 2025.

ALENEZI, K. *et al.* Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 17, 2017. ISSN: 18731597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.11.009>.

ALMATAR, M. *et al.* **Efflux pump inhibitors: new updates.** **Pharmacological Reports** 2021. (1) ISSN: 22995684. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00160-9>.

ALVES, E. *et al.* **An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation.** **Future Medicinal Chemistry** 2014. (2) ISSN: 17568919. DOI: <https://doi.org/10.4155/fmc.13.211>.

AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. **Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy.** **Molecules** MDPI AG, 2019. (13) ISSN: 14203049. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24132456>.

ANANE, Y. A. *et al.* In vitro antimicrobial photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilm using Protoporphyrin IX and Methylene blue. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 30, 2020. ISSN: 18731597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101752>.

ARNAUT, L. G. Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy. **Advances in Inorganic Chemistry**, [s. l.], v. 63, p. 187–233, 2011. ISSN: 08988838. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385904-4.00006-8>.

BALL, P. R.; CHOPRA, I.; ECCLES, S. J. Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli* K-12. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 77, n. 4, 1977. ISSN: 10902104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(77\)80148-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(77)80148-4).

BALL, P. R.; SHALES, S. W.; CHOPRA, I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 93, n. 1, 1980. ISSN: 10902104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80247-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80247-6).

BERTOLONI, G. *et al.* HEMATOPORPHYRIN-SENSITIZED PHOTOINACTIVATION OF *Streptococcus faecalis*. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 39, 1984. ISSN: 17511097. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb08864.x>.

BONNEAU, S.; VEVER-BIZET, C. Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches. **Expert Opin. Ther. Patents**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1011–1025, 2008. ISSN: 1354-3776. DOI: <https://doi.org/10.1517/13543770802303368>.

CERNICCHI, G.; FELICETTI, T.; SABATINI, S. **Microbial efflux pump inhibitors: A journey around quinoline and indole derivatives**. **Molecules** 2021. (22) ISSN: 14203049. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26226996>.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. **Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence**. **Journal of Molecular Evolution** 2020. (1) ISSN: 14321432. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Wayne, PA. Disponível em: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf. Acesso em: 6 jan. 2025.

CONNELL, S. R. *et al.* **Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2003. (12) ISSN: 00664804. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3675-3681.2003>.

CORDEIRO, R. M.; MIOTTO, R.; BAPTISTA, M. S. Photodynamic efficiency of cationic meso -porphyrins at lipid bilayers: Insights from molecular dynamics simulations. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 116, n. 50, 2012. ISSN: 15206106. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp308179h>.

CORREIA, J. H. *et al.* Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 9, 2021. ISSN: 19994923. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.

COSTA, D. C. S. *et al.* Comparative photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria by first and second generation cationic photosensitizers. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1905–1913, 2012. ISSN: 14749092. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2pp25113b>.

COX, G. S.; WHITTEN, D. G. Photooxidation of Protoporphyrin IX in Solution. **American Chemical Society**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 516–521, 1982. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja00366a023>.

COX, G.; WRIGHT, G. D. **Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions**. **International Journal of Medical Microbiology** 2013. (6–7) ISSN: 14384221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>.

DA CUNHA, I. V. *et al.* Photosensitizer associated with efflux pump inhibitors as a strategy for photodynamic therapy against bacterial resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 284, 2025. ISSN: 17683254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117197>.

DADGOSTAR, P. **Antimicrobial resistance: implications and costs**. **Infection and Drug Resistance** 2019. ISSN: 11786973. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.

DAMASCENO, M. V. A. **Estudos dos efeitos de solventes no espectro de absorção eletrônica da merocianina de Brooker e Derivados**. 2014. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/T.43.2015.tde-07042015-145330>.

DANCER, S. J.; SHEARS, P.; PLATT, D. J. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's High Arctic. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 5, 1997. ISSN: 1364-5072. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb02868.x>.

DE FIGUEIRÊDO, M. V. A. F. **Estrutura eletrônica e propriedades espectroscópicas de compósitos polianilina/ouro: uma investigação ab initio**. 2009. Universidade Federal de Pernambuco, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/6188>. Acesso em: 6 jan. 2025.

EICHWURZEL, I. Photophysical studies of the pheophorbide a dimer. **J. Photochemistry. Photobiology.** **B**, [s. l.], v. 54, p. 194–200, 200DC. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00016-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00016-6).

ERICSON, M. B. *et al.* A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 56–62, 2003. ISSN: 02688921. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-002-0254-2>.

GEROLA, A. P. **Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos**. 2013. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/4720>. Acesso em: 6 jan. 2025.

WHO. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report**. [S. l.: s. n.], .

GOMES DO CARMO, M. E. **Propriedades fotofísicas de complexos bisheterolépticos de Ir(III) contendo o ligante 2-(2- piridil)benzimidazol e seus potenciais usos como biomarcadores** . 2022. 72–75 f. Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2022. DOI: <https://doi.org/http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.383>.

GOUTERMAN, M. Spectra of Porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 6, p. 138163, 1961. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2852\(61\)90236-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2852(61)90236-3).

HAMBLIN, M. R. Drug efflux pumps in photodynamic therapy. *In: Drug Efflux Pumps in Cancer Resistance Pathways: From Molecular Recognition and Characterization to Possible Inhibition Strategies in Chemotherapy*. [S. l.: s. n.], . DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816434-1.00008-5>.

HANAKOVA, A. *et al.* The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 169, n. 2–3, 2014. ISSN: 09445013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.005>.

HOMAYONI, H. *et al.* Enhancement of Protoporphyrin IX Performance in Aqueous Solutions for Photodynamic Therapy. [s. l.], 2015. ISBN: 8172721064. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.01.003>. Disponível em: <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>.

HYNNINEN, P. H. Protonation-deprotonation equilibria in tetrapyrroles Part 4. Mono- and diprotonations of deuterio-, hemato-, meso-, and protoporphyrin IX dimethyl esters in methanolic hydrochloric acid. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 385–395, 2014. ISSN: 10991409. DOI: <https://doi.org/10.1142/S1088424614500126>.

IGLESIAS, B. A. **Síntese e Propriedades Espectroscópicas e Eletroquímicas de uma Triazeno-Porfirina**. 2012. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/T.46.2012.tde-05092012-100130>.

INHOFFEN, H. H.; BROCKMANN, H. Jr.; BLIESENER, K. M. Chlorophyll and hemin. Photoporphyrins and their transformation into spirographis- and isospirographis-porphyrin. **Justus Liebigs Ann Chem**, [s. l.], p. 173–185, 1969.

JOSHI, P. *et al.* Osthol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: Reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. **MedChemComm**, [s. l.], v. 5, n. 10, 2014. ISSN: 20402511. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4md00196f>.

KALIA, N. P. *et al.* Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 67, n. 10, 2012. ISSN: 03057453. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.

KELBAUSKAS, L.; DIETEL, W. Internalization of Aggregated Photosensitizers by Tumor Cells: Subcellular Time-resolved Fluorescence Spectroscopy on Derivatives of

Pyropheophorbide-a Ethers and Chlorin e6 under Femtosecond One- and Two-photon Excitation]. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 686, 2002. ISSN: 0031-8655. DOI: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)076<0686:ioapbt>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)076<0686:ioapbt>2.0.co;2).

KHAN, I. A. *et al.* Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 2, 2006. ISSN: 00664804. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.810-812.2006>.

KLIMOVICH, P. G.; KRYLOV, A. B.; KRUK, M. M. Spectral Manifestations of Specific Solvation of 5,10,15,20-Tetrakis-(4-Sulfonatophenyl)-Porphyrin and its Doubly Protonated Form in Aqueous Solutions. **Journal of Applied Spectroscopy**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 19–26, 2021. ISSN: 15738647. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10812-021-01135-1>.

KOBATA, K. *et al.* Novel Capsaicinoid-like Substances, Capsiate and Dihydrocapsiate, from the Fruits of a Nonpungent Cultivar, CH-19 Sweet, of Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 1998. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf980135c>.

LAKOWICZ, J. R. *et al.* Intrinsic fluorescence from DNA can be enhanced by metallic particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 286, n. 5, p. 875–879, 2001. ISSN: 0006291X. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5445>.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed., [s. l.], : Springer, 2006.

LAMBRECHTS, S. A. G. *et al.* Effect of monovalent and divalent cations on the photoinactivation of bacteria with meso-substituted cationic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 79, n. 3, 2007. ISSN: 00318655. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00399.x>.

LEVY, S. B.; MCMURRY, L. **Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline [24]**. *Nature* 1978. (5683) ISSN: 00280836. DOI: <https://doi.org/10.1038/276090a0>.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 2, 2015. ISSN: 10986618. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.

LIN, G. *et al.* Discovery of Meso-(meta-Pyridinium) BODIPY Photosensitizers: In Vitro and in Vivo Evaluations for Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 24, 2021. ISSN: 15204804. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01643>.

LIU, Y. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, [s. l.], 2015. ISSN: 2424-810X. DOI: <https://doi.org/10.18053/jctres.201503.002>.

LLOR, C.; BJERRUM, L. **Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. Therapeutic Advances in Drug Safety** 2014. (6) ISSN: 20420994. DOI: <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>.

MAISCH, T. *et al.* The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. **Applied Physical Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 17, p. 7223–7228, 2007. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0611328104>. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611328104.

MARGALIT, R.; COHEN, S. Studies of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative equilibria in heterogeneous systems. Porphyrin-liposome binding and porphyrin aqueous dimerization. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 736, p. 163–170, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90280-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90280-8).

MARGALIT, R.; ROTENBERG, M. Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. **Biochem. J**, [s. l.], v. 219, p. 445–450, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2190445>.

MARQUEZ, B. **Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie** 2005. (12) ISSN: 61831638. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.012>.

MOJZISOVA, H.; BONNEAU, S.; BRAULT, D. Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells. **European Biophysics Journal**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 943–953, 2007. ISSN: 01757571. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0204-9>.

MONSÙ SCOLARO, L. *et al.* Aggregation behavior of protoporphyrin IX in aqueous solutions: Clear evidence of vesicle formation. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 106, n. 10, p. 2453–2459, 2002. ISSN: 10895647. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp013155h>.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. **Antimicrobial Resistance. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America** 2020. (4) ISSN: 15581950. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>.

MYRZAKHMETOV, B. *et al.* Photophysical properties of protoporphyrin IX, pyropheophorbide-a and photofrin® in different conditions. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–21, 2021. ISSN: 14248247. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14020138>.

NAINU, F. *et al.* **Pharmaceutical approaches to antimicrobial resistance: prospects and challenges. Antibiotics** 2021. (8) ISSN: 20796382. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080981>.

NITZAN, Y. *et al.* INACTIVATION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA BY PHOTSENSITIZED PORPHYRINS. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 55, n. 1, 1992. ISSN: 17511097. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04213.x>.

NITZAN, Y.; LADAN, H.; MALIK, Z. Growth-inhibitory effect of hemin on staphylococci. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 5, 1987. ISSN: 03438651. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01568137>.

OLIVEIRA JUNIOR, N. *et al.* Evaluation of Natural Capsaicin (N.Cap) in Pepper Spray by GC-MS/FID, NMR and HPLC as an Alternative to the Use of Oleoresin Capsicum (OC). **Human Factors and Mechanical Engineering for Defense and Safety**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2019. ISSN: 23672544. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41314-019-0024-6>.

ORENSTEIN, A. *et al.* The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 4, 1997. ISSN: 09288244. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(97\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(97)00097-7).

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 8, 2006. ISSN: 17401526. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1464>.

POOLE, K. **Efflux-mediated antimicrobial resistance**. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2005. (1) ISSN: 03057453. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>.

PRASCH, S. *et al.* Resistance modulatory and efflux-inhibitory activities of capsaicinoids and capsinoids. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 82, 2019. ISSN: 10902120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.062>.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. **Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon**. **Pathogens and Global Health** 2015. (7) ISSN: 20477732. DOI: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>.

RINEH, A. *et al.* Attaching the NorA Efflux Pump Inhibitor INF55 to Methylene Blue Enhances Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Vitro and in Vivo. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 10, 2017. ISSN: 23738227. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00095>.

ROCHA, F. S. **Interação de ftalocianinas de zinco com óxido de grafeno: estudo das propriedades fotoquímicas**. 2018. [s. l.], 2018. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.26512/2018.01.D.32241>.

ROEDER, B.; WABNITZ, H. Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorin e6 in ethanol and aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, [s. l.], v. 1, p. 103–113, 1987. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344\(87\)80010-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1011-1344(87)80010-6).

RYBCZYŃSKI, P. *et al.* Controlling the fluorescence quantum yields of benzothiazole-difluoroborates by optimal substitution. **Chemical Science**, [s. l.], v. 13, n. 45, p. 13347–13360, 2022. ISSN: 20416539. DOI: <https://doi.org/10.1039/d2sc05044g>.

SABINO, C. P. *et al.* Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 28, 2019. ISSN: 18731597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.022>.

SANGWAN, P. L. *et al.* Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 22, 2008. ISSN: 09680896. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.042>.

SANTOS, S. C. Dos *et al.* Photophysical properties of porphyrin derivatives: Influence of the alkyl chains in homogeneous and micro-heterogeneous systems. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, [s. l.], v. 19, n. 8, 2015. ISSN: 10991409. DOI: <https://doi.org/10.1142/S1088424615500650>.

SCHASTAK, S. *et al.* Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 7, 2010. ISSN: 19326203. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011674>.

SCHINDLER, B. D.; KAATZ, G. W. **Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. Drug Resistance Updates** 2016. ISSN: 15322084. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>.

SCHOLZ, M. **Methods of Study of Photosensitizer-Photophysics with Application on Thiazolyl-porphyrins**. 2011. [s. l.], 2011. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2052.7768>.

SCHOLZ, M. *et al.* Understanding delayed fluorescence and triplet decays of Protoporphyrin IX under hypoxic conditions. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 843–857, 2021. ISSN: 14749092. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00044-8>.

SEUKEP, A. J. *et al.* **Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification.** *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2020. (4) ISSN: 20951779. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.002>.

SEUKEP, A. J. *et al.* **What Approaches to Thwart Bacterial Efflux Pumps-Mediated Resistance?** *Antibiotics* 2022. (10) ISSN: 20796382. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101287>.

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. **Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside.** *Indian Journal of Medical Research* 2019. (2) ISSN: 09715916. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17.

SHIAH, J. G. *et al.* Influence of pH on Aggregation and Photoproperties of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer-Meso-Chlorine 6 Conjugates. *Drug Delivery*, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 119–126, 1998. DOI: <https://doi.org/10.3109/10717549809031387>.

SILVA, P. L. **Solvatação em Solventes Puros e Misturas Binárias: Fundamentos e Aplicações.** 2011. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-02112011-122800/>. Acesso em: 6 jan. 2025.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500016>.

SOARES, J. X. *et al.* Liquid Chromatography on the Different Methods for the Determination of Lipophilicity: An Essential Analytical Tool in Medicinal Chemistry. *Chemosensors*, [s. l.], v. 10, n. 8, 2022. ISSN: 22279040. DOI: <https://doi.org/10.3390/chemosensors10080340>.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. **Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy.** *Tetrahedron* 1998. (17) ISSN: 00404020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5).

SULEK, A. *et al.* Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ros generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 22, 2020. ISSN: 14220067. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228716>.

SUPPAN, P. Invited review solvatochromic shifts: The influence of the medium on the energy of electronic states. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 3, 1990. ISSN: 10106030. DOI: [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(90\)87021-3](https://doi.org/10.1016/1010-6030(90)87021-3).

SZEWCZYK, G.; MOKRZYŃSKI, K.; SARNA, T. Generation of singlet oxygen inside living cells: correlation between phosphorescence decay lifetime, localization and outcome of photodynamic action. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s. l.], 2024. ISSN: 14749092. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00620-8>.

TATSUMI, R.; WACHI, M. TolC-Dependent Exclusion of Porphyrins in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 190, n. 18, p. 6228–6233, 2008.

TAVARES, A. *et al.* Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 10, 2011. ISSN: 14749092. DOI: <https://doi.org/10.1039/c1pp05097d>.

TEGOS, G. P. *et al.* Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 52, n. 9, 2008. ISSN: 00664804. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00006-08>.

TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 1, 2006. ISSN: 00664804. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.196-203.2006>.

UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, C. S.; BAPTISTA, M. S. Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. **Journal of Porphyrins and**

Phthalocyanines, [s. l.], v. 14, n. 9, 2010. ISSN: 10884246. DOI: <https://doi.org/10.1142/S108842461000263X>.

VALIM, T. C. *et al.* Quantification of capsaicinoids from chili peppers using ¹H NMR without deuterated solvent. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 11, n. 14, 2019. ISSN: 17599679. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9ay00292h>.

VENEZIO, F. R. *et al.* Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 151, n. 1, 1985. ISSN: 15376613. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/151.1.166>.

WANG, Z. C. *et al.* Capsaicin derivatives with nitrothiophene substituents: Design, synthesis and antibacterial activity against multidrug-resistant *S. aureus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 198, 2020. ISSN: 17683254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112352>.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 1, 2003. ISSN: 03057453. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.

WEIJER, R. *et al.* **Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery.** **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews** 2015. ISSN: 13895567. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.05.002>.

WEISS, C. Optical spectra of chlorophylls. *In*: DOLPHIN, D. (org.). **The Porphyrins, Physical Chemistry. Part A**. [S. l.: s. n.], . v. III. p. 211–224.

WHO. **Antimicrobial Resistance**. [S. l.: s. n.], . Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 9 jul. 2024.

YAMASAKI, M. *et al.* Cough reflex and oral chemesthesis induced by capsaicin and capsiate in healthy never-smokers. **Cough**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2007. ISSN: 17459974. DOI: <https://doi.org/10.1186/1745-9974-3-9>.