



Universidade Federal de Goiás  
Instituto de Física  
Programa de Pós-Graduação em Física

---

**Estudo das interações de porfirinas com sistemas de  
interesse biológico: potencial uso no transporte de  
fármacos e aplicação fotodinâmica**

*Fábio de Castro Bezerra*

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS  
DE TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

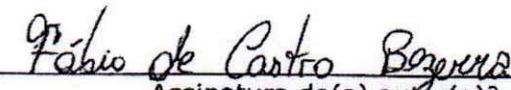
Nome completo do autor: Fábio de Castro Bezerra

Título do trabalho: Estudo das interações de porfirinas com sistemas de interesse biológico: potencial uso no transporte de fármacos e aplicação fotodinâmica

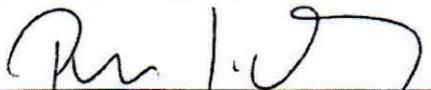
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 20/08/2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: *Fábio de Castro Bezerra*

Título do trabalho: *Estudo das interações de porfirinas com sistemas de interesse biológico: potencial uso no transporte de fármacos e aplicação fotodinâmica.*

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

*Fábio de Castro Bezerra*  
Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

Data: *03 / 08 / 2022*

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**Estudo das interações de porfirinas com sistemas de  
interesse biológico: potencial uso no transporte de  
fármacos e aplicação fotodinâmica**

*Fábio de Castro Bezerra*

**Orientador:** *Prof. Dr. Pablo José Gonçalves*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

de Castro Bezerra, Fábio

Estudo das interações de porfirinas com sistemas de interesse biológico: potencial uso no transporte de fármacos e aplicação fotodinâmica [manuscrito] / Fábio de Castro Bezerra. - 2019. lxxi, 71 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2019. Bibliografia. Apêndice.

Inclui símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Porphirinas. 3. Biomoléculas. 4. Interação. I. José Gonçalves, Pablo, orient. II. Título.

CDU 53



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

### INSTITUTO DE FÍSICA

#### **ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº 50 da sessão de Defesa de Tese de Fábio de Castro Bezerra que confere o título de Doutor em Física, na área de concentração em Física.

Aos 23 dias do mês de agosto de 2019, a partir das 14h00min, no Anfiteatro I do Instituto de Física da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Estudo das interações de porfirinas com sistemas de interesse biológico: potencial uso no transporte de fármacos e aplicação fotodinâmica”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Pablo José Gonçalves (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Leonardo de Boni (IFSC/USP São Carlos), membro titular externo; Professor Doutor Bernardo Almeida Iglesias (DQ/UFSM), membro titular externo; Professor Doutor Iouri Borissevitch (IF/UFG), membro titular interno; Professor Doutor Antonio Alonso (IF/UFG), membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Pablo José Gonçalves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 23 dias do mês de agosto de 2019.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Pablo José Gonçalves**, **Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2019, às 17:55, 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 **Bernardo Almeida Iglesias, Usuário Externo**, em 23/08/2019, às 17:56, 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 **Iouri Borissevitch,**

**Usuário Externo**, em 23/08/2019, às 17:57, 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 **Leonardo De Boni,**

**Usuário Externo**, em 23/08/2019, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2019, às 18:00, 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://sei.ufg.br>

[/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0838334**

e o código CRC **14032E4B**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.018186/2019-43

SEI nº 0838334

## Agradecimentos

- ✓ À Deus por ter me mantido com saúde e disposição para o trabalho.
- ✓ À minha esposa Fernanda pela paciência e compreensão em todos os momentos em que estive me dedicando a este trabalho.
- ✓ Aos meus filhos Ester e Isaque que são a razão de todo o meu esforço.
- ✓ À toda a minha família, especialmente aos meus pais que sempre me encorajaram a prosseguir.
- ✓ Ao professor Pablo José Gonçalves pela paciência, confiança em mim depositada, pelas discussões e grandes ensinamentos durante a realização deste trabalho.
- ✓ À todos os colegas de grupo pelas inúmeras contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao professor Guilherme e toda a sua equipe pela participação direta no desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Instituto de Física de UFG pela oportunidade de crescimento pessoal.
- ✓ À CAPES pela bolsa de pesquisa.

## Resumo

No presente trabalho, tivemos como objetivo o estudo das interações de porfirinas com sistemas de interesse biológico, visando aplicações no transporte de fármacos e aplicação fotodinâmica. Foram avaliadas as interações das porfirinas aniônica *meso*-tetrakis(*p*-sulfonatofenil)porfirina (TPPS<sub>4</sub>) e catiônica *meso*-tetrakis(4-metil-piridil)porfirina (TMPyP) com albumina de soro bovino (BSA), anticorpos, DNA e nanopartículas biocompatíveis de maghemita. Para obter as constantes de ligação e parâmetros termodinâmicos foram empregadas as técnicas espectroscópicas de absorção UV/vis e fluorescência. As constantes de ligação indicam uma maior afinidade da porfirina TPPS<sub>4</sub> pelas proteínas em comparação com a TMPyP. Os parâmetros termodinâmicos mostraram que as interações eletrostática e hidrofóbica mediam as interações da BSA com as porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP, respectivamente. Por outro lado, a natureza das interações das porfirinas com anticorpos apresentam um comportamento oposto ao observado para a BSA (eletrostática para TMPyP e hidrofóbica para a TPPS<sub>4</sub>), indicando que o local de ligação da porfirina TMPyP nos anticorpos, provavelmente, possui uma carga líquida negativa. Na interação da porfirina TPPS<sub>4</sub> com a nanopartícula de maghemita, além de obter os parâmetros de ligação da interação, foi possível estimar o número de 21 porfirinas acopladas em cada nanopartícula. Com relação à interação do DNA com as porfirinas TPPS<sub>4</sub>, TMPyP e seus complexos com zinco, foi observado que a ZnTMPyP possui maior afinidade pelo DNA que a TMPyP, enquanto que a TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> não se ligam ao DNA, o que explica os resultados de fotodegradação do DNA por essas porfirinas.

Palavras-chaves: Terapia fotodinâmica, Porphirinas, Biomoléculas, Interação

## Abstract

The purpose of this work was to study the interactions of porphyrins in systems of biological interest aiming at drug transport and photodynamic applications. Interactions of anionic *meso*-tetrakis(p-sulphonatephenyl) porphyrin (TPPS<sub>4</sub>) and cationic *meso*-tetrakis (4-methyl-pyridyl) porphyrin (TMPyP) porphyrins with bovine serum albumin (BSA), antibodies, DNA and biocompatible nanoparticles of maghemite were evaluated. To obtain the binding constants and thermodynamic parameters, spectroscopic UV/Vis absorption and fluorescence techniques were used. Binding constants indicate a higher affinity of porphyrin TPPS<sub>4</sub> for proteins compared to TMPyP. Thermodynamic parameters showed that electrostatic and hydrophobic interactions mediated the BSA interactions with the porphyrins TPPS<sub>4</sub> and TMPyP, respectively. On the other hand, the nature of porphyrin-antibody interactions shows a behavior opposite to that observed for BSA (electrostatic for TMPyP and hydrophobic for TPPS<sub>4</sub>), indicating that the binding site of porphyrin TMPyP in the antibodies is likely to have a net negative charge. In the porphyrin TPPS<sub>4</sub> interaction with maghemite nanoparticles, besides obtaining the binding parameters of the interaction, it was possible to estimate the number of 21 porphyrins coupled in each nanoparticle. Regarding the interaction of DNA with the porphyrins TPPS<sub>4</sub>, TMPyP and its complexes with zinc, it was observed that ZnTMPyP has higher affinity for DNA than TMPyP, whereas TPPS<sub>4</sub> and ZnTPPS<sub>4</sub> do not bind to DNA, which explains the results of photodegradation of DNA by these porphyrins.

Keywords: Photodynamic Therapy, Porphyrins, Biomolecules, Interaction

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> diagrama de Jablonski mostrando: Absorção, CI (Conversão interna), fluorescência, CIS (Cruzamento intersistemas) e fosforescência. Adaptado de [16].	8
<b>Figura 2:</b> estrutura química do núcleo das porfirinas.	10
<b>Figura 3:</b> espectro de absorção óptica de uma porfirina mostrando a banda de Soret a) e as bandas Q b).	10
<b>Figura 4:</b> esquema dos processos envolvidos na formação das espécies reativas de oxigênio singlete. Adaptado de [25]	12
<b>Figura 5:</b> atenuação do feixe de luz pela amostra. Adaptado de [32].	13
<b>Figura 6:</b> diagrama de energia esquemático para a supressão dinâmica.	18
<b>Figura 7:</b> representação esquemática do mecanismo de supressão estática. As moléculas supressoras Q suprimem a fluorescência das moléculas fluorescentes M quando há a formação dos complexos MQ e, dessa forma, a fluorescência observada é proveniente das moléculas M livres.	20
<b>Figura 8:</b> energia livre da Gibbs em função de extensão de um processo. Adaptado de [49].	28
<b>Figura 9:</b> representação esquemática dos dipolos elétricos oscilante doador e receptor. Adaptado de [56].	33
<b>Figura 10:</b> dipolos doador e receptor evidenciando suas orientações.	35
<b>Figura 11:</b> estruturas das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b).	44
<b>Figura 12:</b> representação da luz incidindo sob um ângulo de 90° com a face da cubeta.	46
<b>Figura 13:</b> efeito do acréscimo das concentrações das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b) sobre a emissão ( $\lambda_{exc}=280$ nm) fluorescente da proteína BSA em temperatura ambiente.	47
<b>Figura 14:</b> gráficos de Stern-Volmer para as supressões de fluorescência da albumina por TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b).	48
<b>Figura 15:</b> representação da albumina de soro bovino (BSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano. Adaptado de [92].	50
<b>Figura 16:</b> gráficos de van't Hoff para a ligação das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b) com a BSA.	51
<b>Figura 17:</b> representação esquemática da excitação dos resíduos de triptofano (a), as relaxações vibracionais (b), emissão fluorescente do triptofano (c) e a emissão do receptor (d). Adaptado de [101].	52

<b>Figura 18:</b> dimensões da BSA. Adaptado de [103].....	53
<b>Figura 19:</b> sobreposições espectrais entre a emissão da BSA e o espectro de absorção molar das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b). .....	54
<b>Figura 20:</b> efeito do acréscimo das concentrações das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b) sobre a emissão ( $\lambda_{exc}=280$ nm) fluorescente da proteína Ig em temperatura ambiente.....	54
<b>Figura 21:</b> gráficos de Stern-Volmer para as supressões de fluorescência de Ig por TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b) com os respectivos gráficos de Hill-Langmuir (inset). .....	55
<b>Figura 22:</b> gráficos de van't Hoff para a ligação das porfirinas com Ig. ....	57
<b>Figura 23:</b> sobreposições espectrais entre a emissão da Ig e o espectro de absorção molar das porfirinas TPPS <sub>4</sub> a) e TMPyP b).....	58
<b>Figura 24:</b> estrutura esquemática de um anticorpo. Nessa figura estão representados os domínios variáveis das cadeias leves (light - V <sub>L</sub> ) e pesados (heavy - V <sub>H</sub> ) bem como os domínios constantes das cadeias leves (light - C <sub>L</sub> ) e pesadas (heavy - C <sub>H</sub> ). Estão representados também as porções Fab (região de reconhecimento da IgG pelas células do sistema imune) e F <sub>c</sub> (região de reconhecimento do antígeno). Adaptado de [107]. ....	59
<b>Figura 25:</b> espectros de absorção a) e espectros de emissão de fluorescência b) da porfirina TPPS <sub>4</sub> na forma diprotonada (pontilhado) e não-protonada (linha sólida). O inset em a) mostra as bandas Q de ambas as formas com mais detalhes. ....	65
<b>Figura 26:</b> espectros de emissão da porfirina TPPS <sub>4</sub> na presença de nanopartículas de magnetita em dois diferentes comprimentos de onda de excitação: 640 nm a) e 515 nm b). O inset mostra a intensidade de fluorescência em função da concentração de nanopartículas. ....	67
<b>Figura 27:</b> espectro da TPPS <sub>4</sub> diprotonada (10 $\mu$ mol/L) na presença a) e na ausência de MNPs (inset de a)); subtração do espectro de absorção de MNPs do espectro da solução de porfirina TPPS <sub>4</sub> + MNPs b) e espectros comparativos da porfirina TPPS <sub>4</sub> , MNPs e a interação entre eles c). ....	69
<b>Figura 28:</b> gráfico da equação Stern-Volmer modificada para a supressão da fluorescência TPPS <sub>4</sub> por MNPs. ....	71
<b>Figura 29:</b> estrutura molecular da TPPS <sub>4</sub> apresentado as suas dimensões. Adaptado de [146]. .....	72
<b>Figura 30:</b> a) representação esquemática da técnica de eletroforese em gel de agarose e b) padrão das bandas no gel. Adaptado de [162]. ....	78
<b>Figura 31:</b> alterações nos espectros de absorção das porfirinas TMPyP a), TPPS <sub>4</sub> b), ZnTMPyP c) ZnTPPS <sub>4</sub> devido à presença do DNA. Nos insets estão as absorções (medidas e corrigidas devido à diluição) nas bandas de Soret em função da concentração de DNA. As	

concentrações das porfirinas foram mantidas à 1,4 $\mu\text{mol/L}$ e a concentração do DNA variou de 3 $\mu\text{mol/L}$ até 10 $\mu\text{mol/L}$ .....	82
<b>Figura 32:</b> estrutura esquemática do DNA mostrando as interações entre as bases nitrogenadas bem com o esqueleto de fosfato aniônico [167]. .....	84
<b>Figura 33:</b> gráficos de $[\text{DNA}]_0 / (\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)$ em função de $[\text{DNA}]_0$ para as porfirinas TMPyP a), TPPS <sub>4</sub> , ZnTMPyP c) e ZnTPPS <sub>4</sub> d). .....	85
<b>Figura 34:</b> ensaio eletroforético de DNA plasmidial em gel de agarose irradiado por diferentes tempos. Nos painéis (A a D) estão as amostras de DNA incubadas com TPPS <sub>4</sub> , ZnTPPS <sub>4</sub> , TMPyP e ZnTMPyP respectivamente. Na pista 1, estão os controles de DNA sem irradiação. Nas pistas de 2 a 7, estão as amostras irradiadas durante 30, 60, 90, 120, 150, 180 min respectivamente. ....	87
<b>Figura 35:</b> sobreposições entre os espectros das porfirinas catiônicas à 5 $\mu\text{mol/L}$ com a emissão da lâmpada halógena (130 W/m <sup>2</sup> ). .....	88
<b>Figura 36:</b> estrutura molecular das porfirina de rutênio em bipyridina RuTPyP a) e ZnRuTPyP b).....	93
<b>Figura 37:</b> espectros de absorção UV/Vis das porfirinas RuTPyP a) e ZnRuTPyP b) em função da concentração. No inset, os gráficos $A \times c$ para obtenção do coeficiente de absorção molar. ....	97
<b>Figura 38:</b> espectros de emissão fluorescente para as porfirinas RuTPyP a), ZnRuTPyP b) e TPP c) utilizados nos cálculos de rendimento quântico de fluorescência. ....	98
<b>Figura 39:</b> espectro de emissão do laser verde sobreposto aos espectros de absorção de ZnRuTPyP para três concentrações (5,0 $\mu\text{mol/L}$ , 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e 1,0 $\mu\text{mol/L}$ ), e a banda de AU mostrando as degradações promovidas pela ZnRuTPyP à 5,0 $\mu\text{mol/L}$ . No inset a) estão as constantes de degradação do AU e em c) o gráfico para a obtenção da eficiência de formação de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> . ....	101
<b>Figura 40:</b> sobreposições espectrais para o cálculo do número de fótons absorvidos.....	102
<b>Figura 41:</b> unidades formadoras de colônia (CFU) em função do tempo de irradiação.....	103

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> parâmetros da interação entre TMPyP e TPPS <sub>4</sub> com BSA: constante de supressão $K$ , variação da energia livre de Gibbs $\Delta G$ , variação da entalpia $\Delta H$ , variação da entropia e distância doador-receptor $r_{RD}$ .....	49
<b>Tabela 2:</b> parâmetros da interação entre TMPyP e TPPS <sub>4</sub> com Ig.....	56
<b>Tabela 3:</b> constantes de ligação para as porfirinas TMPyP e ZnTMPyP. ....	83
<b>Tabela 4:</b> rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, fluxo de fótons absorvidos e número de moléculas de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> produzidas por segundo pelas porfirinas ZnTMPyP e TMPyP. ....	88
<b>Tabela 5:</b> coeficiente de absorção das porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP .....	97
<b>Tabela 6:</b> eficiência e rendimento quântico de formação de oxigênio singlete para as porfirinas TPP, RuTPyP e ZnRuTPyP.....	102
<b>Tabela 7:</b> fluxo de fótons absorvidos e número de moléculas de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> produzidas por segundo pelas porfirinas TPP, ZnRuTPyP e RuTPyP. ....	103

## Lista de símbolos

TPPS <sub>4</sub>	<i>meso</i> -tetrakis(p-sulfonatofenil)porfirina
TMPyP	<i>meso</i> -tetrakis(4-metilpiridil)porfirina
ZnTPPS <sub>4</sub>	zinco(II)- <i>meso</i> -tetrakis(p-sulfonatofenil)porfirina
ZnTMPyP	zinco(II)- <i>meso</i> -tetrakis(4-metilpiridil)porfirina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
UV/vis	Ultravioleta/visível
RuTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirina
ZnRuTPyP	<i>meso</i> -tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirinatozinco(III)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
FS	Fotossensibilizadores
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistemas
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio tripleto
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion-radical superóxido
H <sup>+</sup>	Próton
HOO <sup>•</sup>	Radical hidroperoxila
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxila
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Variação de entropia
K	Constante de ligação
f <sub>a</sub>	Fração da fluorescência suprimida
Φ <sub>Δ</sub>	Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete
Φ <sub>F</sub>	Rendimento quântico de fluorescência
Ig	Imunoglobulinas
CDRs	<i>Complementarity Determining Regions</i>
HSA	<i>Human serum albumin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
βLG	β-lactoglobulina
k <sub>q</sub>	Constante de supressão bimolecular
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
r <sub>DR</sub>	Distância entre o doador e o receptor
k <sub>T</sub>	Taxa de transferência de energia de Förster
R <sub>0</sub>	Distância de Förster
Pt	Platina
Ru	Rutênio
Os	Ósmio
Tyr	Tirosina
Trp	Triptofano
Phe	Fenilalanina
MNPs	<i>Magnetic nanoparticles</i>
HPT	Hipertermia
ZnO	Óxido de zinco
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghemita
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
TPP	Tetrafenilporfirina
$\varepsilon$	Coefficiente de absorção molar
$N_{abs}$	Número de fótons absorvidos
$n_{abs}$	Fluxo de fótons absorvidos
$N_{^1O_2}$	Número de moléculas de oxigênio singleto
$n_{^1O_2}$	Fluxo de moléculas de oxigênio singleto
$k$	Constante de degradação do sensor
$\gamma_{\Delta}$	Eficiência de formação de oxigênio singleto
UFC	Unidades formadoras de colônias
AU	Ácido úrico

# Sumário

## Capítulo 1: Introdução

1.1. Justificativa.....	1
1.2. Objetivos.....	2

## Capítulo 2: Tópicos teóricos

2.1. Terapia fotodinâmica.....	6
2.2. Fotofísica de uma molécula típica.....	7
2.3. Porfirinas.....	9
2.4. Espécies reativas de oxigênio.....	11
2.5. Espectroscopia de absorção UV/Vis.....	13
2.6. Espectroscopia de fluorescência.....	15
2.7. Supressão de fluorescência.....	18
2.7.1. Supressão dinâmica.....	19
2.7.2. Supressão estática.....	21
2.8. Termodinâmica da interação fluoróforo-supressor.....	25
2.9. Transferência de energia ressonante de Förster.....	32

## Capítulo 3: Interação de porfirinas hidrossolúveis com anticorpos e albumina de soro bovino

3.1. Interações com anticorpos e albuminas.....	42
3.2. <i>Meso</i> -porfirinas.....	43
3.3. Materiais e Métodos.....	44
3.3.1. O efeito de filtro interno.....	45
3.4. Resultados e discussões.....	46
3.4.1. Supressão da fluorescência intrínseca da BSA pelas porfirinas TMPyP e TPPS <sub>4</sub> .....	46
3.4.2. Supressão da fluorescência intrínseca dos anticorpos pelas porfirinas TMPyP e TPPS <sub>4</sub> .....	54
3.5. Conclusões.....	60

## Capítulo 4: Estudo das interações de porfirinas com nanopartículas magnéticas biocompatíveis

4.1. Introdução.....	62
4.2. Materiais e Métodos.....	63
4.3. Resultados e discussões.....	64
4.3.1. Caracterização fotofísica da porfirina TPPS <sub>4</sub> .....	64
4.3.2. Estudo da interação TPPS <sub>4</sub> -MNPs.....	66
4.3.3. Parâmetros de ligação.....	69
4.3.4. Estimativa do número de porfirinas por nanopartículas.....	71
4.4. Conclusões.....	72

## Capítulo 5: Estudo das interações de porfirinas com DNA e sua foto-degradação

5.1. Interações com DNA.....	73
5.2. Metaloporfirinas.....	74
5.3. Materiais e Métodos.....	75

5.3.1. Modelo de ligação porfirinas-DNA.....	75
5.3.2. Eletroforese em gel de agarose.....	77
5.3.3. Determinação do potencial de ataque fotoquímico de um fotossensibilizador: o fluxo de moléculas de oxigênio singlete produzidas.....	79
5.3.4. Determinação da constante de ligação.....	80
5.3.5. Fotodegradação do DNA.....	81
5.4. Resultados e discussões.....	81
5.4.1. Avaliação da afinidade nas interações porfirinas-DNA.....	81
5.4.2. Avaliação da fotodegradação do DNA por eletroforese em gel de agarose.....	86
5.5. Conclusões.....	89
<b>Considerações finais.....</b>	<b>91</b>
<b>Apêndice A.....</b>	<b>93</b>
<b>Apêndice B.....</b>	<b>106</b>
<b>Referências.....</b>	<b>110</b>

# Capítulo 1 : Introdução

## 1.1. Justificativa

Este trabalho, teve como foco dois dos principais temas de pesquisas na área de terapia fotodinâmica: interação de fotossensibilizadores (porfirinas) com sistemas de interesse biológico (macromoléculas e nanopartículas magnéticas) e a avaliação do potencial fotodinâmico de porfirinas em sistemas biológicos.

Uma melhor compreensão da farmacocinética ou da atividade citotóxica de fármacos fotossensibilizadores deve passar, invariavelmente, por estudos de interação desses compostos com macromoléculas biológicas e/ou com sistemas macromoleculares sintéticos de interesse biológicos [1], [2]. Entender como fotossensibilizadores interagem com macromoléculas tais como nanopartículas magnéticas, DNA, imunoglobulinas (anticorpos) e albuminas (proteínas do soro do sangue responsáveis por transportar vários tipos de moléculas pelo organismo) pode contribuir para o sucesso do uso desses compostos em terapia fotodinâmica.

Atualmente, existe um interesse crescente por sistemas capazes de direcionar fármacos para alvos específicos dentro do organismo (*drug delivery systems*) [3]. As macromoléculas biológicas vêm ganhando destaque dentro deste cenário, pois diversos sistemas de entrega dirigida de fármacos têm sido construídos com base nessas biomoléculas. As albuminas, por exemplo, devido a sua alta capacidade de se ligar à diversos tipos de fármacos, têm sido utilizadas com sucesso na fotomedicina do câncer como sistema de transporte de fármacos, inclusive porfirinas, aumentando o acúmulo específico dos fármacos em tumores [4], [5].

Outras biomoléculas que têm despertado interesse, por se mostrarem poderosos sistemas de entrega dirigida de fármacos, são os anticorpos [6]. A especificidade dos anticorpos para determinados alvos tem sido utilizada como uma estratégia para direcionar fármacos para locais específicos do organismo [6]. Neste contexto, estudos de interações de anticorpos com fotossensibilizadores, como as porfirinas, tem ganhado destaque, pois os anticorpos podem ser,

de fato, uma alternativa interessante para o problema da ausência da afinidade específica com alvos desejados que várias porfirinas apresentam.

Ainda dentro do contexto das estruturas carreadoras de fármacos, as nanopartículas magnéticas têm apresentado grande potencial para aplicações em bionanotecnologia e nanomedicina [7]. As nanopartículas magnéticas vêm sendo utilizadas como sistemas de entrega de fármacos, inclusive fotossensibilizadores [8], [9]. Além de constituírem sistemas de entrega de fármacos, as nanopartículas magnéticas também são utilizadas em um modalidade terapêutica contra o câncer conhecida como hipertemia magnética [10], [11]. Nesta terapia, as nanopartículas, após se acumularem no tecido alvo, são submetidas a um campo magnético alternado externo promovendo um aumento na temperatura local, e conseqüentemente a morte do tecido. Dessa forma, sistemas multimodais com base no acoplamento de nanopartículas com porfirinas tem sido propostos, com o objetivo de reunir, numa mesma plataforma, funções terapêuticas e diagnósticas (associadas com a emissão fluorescente dos fotossensibilizadores), a chamada teranóstica. Além disso, a obtenção de tais sistemas pode permitir o uso combinado das terapias fotodinâmica e hipertermia magnética, aumentando o dano ao tecido alvo em relação à aplicação dessas terapias isoladamente.

Recentemente, as pesquisas na área de terapia fotodinâmica estão concentradas, no desenvolvimento de novas moléculas fotoativas, de sistemas carreadores dessas moléculas e na compreensão da ação fotodinâmica causada pelos fotossensibilizadores em sistemas biológicos. Como será discutido com mais detalhes no corpo deste trabalho, a ação fotodinâmica, provocada pelas moléculas fotossensibilizadoras, está fundamentalmente relacionada à geração de uma espécie reativa de oxigênio capaz de causar danos em sistemas biológicos: o oxigênio singlete. Neste contexto, técnicas de quantificação do rendimento de produção de oxigênio singlete por moléculas fotoativas, e avaliação do potencial de ataque fotoquímico dessas moléculas a sistemas biológicos, ganham destaque.

Dentre os muitos alvos para as espécies reativas de oxigênio no interior da célula, a molécula de DNA, se destaca como um dos principais. O DNA é um alvo para diversos tipos de fármacos, inclusive os utilizados no tratamento do câncer. Os danos provocados ao DNA por esses fármacos são responsáveis por induzir a morte da célula, geralmente por apoptose (morte programada da célula). Dessa forma, entender como um fotossensibilizador produz danos ao DNA é parte obrigatória para o uso efetivo dessas moléculas em terapia fotodinâmica.

O presente trabalho de doutoramento é uma continuidade dos estudos iniciados no mestrado, quando foram avaliados alguns parâmetros associados à ligação de anticorpos reativos à herpes vírus bovino com as porfirinas *meso*-tetrakis(p-sulfonatofenil) (TPPS<sub>4</sub>) e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil) (TMPyP). No doutorado, ampliamos nossos estudos para as interações dessas, e outras porfirinas, com diversos sistemas macromoleculares (albuminas, nanopartículas e DNA), onde avaliamos parâmetros termodinâmicos, que revelam com maior clareza a natureza das interações. Os estudos das interações feitos no mestrado, também foram revisitados no doutorado, onde obtivemos a natureza das interações por meio dos parâmetros termodinâmicos. Além das investigações sobre as interações, fizemos também, avaliações do potencial fotodinâmico de várias porfirinas, por meio de medidas de rendimento quântico de formação de oxigênio singleto, fotodegradação de DNA, além de testes *in vitro* da inativação fotodinâmica de microrganismo (vírus e bactérias), que foram realizados em parceria com a equipe Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

Esta tese está organizada em capítulos, de tal forma que, no presente capítulo estão as motivações bem como os objetivos desse estudo. No capítulo 2, estão as bases teóricas que fundamentam este trabalho. O capítulo 3, apresenta as investigações das interações das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com albumina de soro bovino e anticorpos. No capítulo 4 apresentamos os estudos de interação da porfirina TPPS<sub>4</sub> com a nanopartícula magnética de maghemita. No capítulo 5 foram feitos estudos de interação das porfirinas TPPS<sub>4</sub>, TMPyP e os

seus complexos com zinco com DNA, além da avaliação do fotodano promovido pelas porfirinas a essa biomolécula. Em anexo a este trabalho está um estudo envolvendo algumas caracterizações fotofísicas e fotoquímicas de duas porfirinas tetra-rutenadas (a *meso*-tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirina - RuTPyP e a *meso*-tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirinatozinco(III) - ZnRuTPyP), e os testes de potencial fotodinâmico antimicrobiano contra *Salmonella* como uma aplicação de terapia fotodinâmica *in vitro*. Por fim, fizemos algumas considerações finais e um breve memorial dos artigos publicados e trabalhos apresentados, que foram desdobramentos dos estudos aqui apresentados.

## 1.2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo das interações de porfirinas hidrossolúveis (a porfirina aniônica *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil) - TPPS<sub>4</sub> e a catiônica *meso*-tetrakis(4-metilpiridil) - TMPyP) com moléculas de interesse biológico (albumina de soro bovino, imunoglobulinas, nanopartículas magnéticas e DNA plasmidial). Este estudo foi realizado empregando as técnicas espectroscópicas de absorção UV/vis e fluorescência.

Como objetivos específicos podemos destacar:

1. Avaliar as afinidades das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com duas proteínas do sangue (albumina e imunoglobulina) através das constantes de ligação, obtidas por meio da técnica de supressão de fluorescência, e estabelecer comparações entre essas afinidades em função das cargas das porfirinas.
2. Investigar a natureza das interações intermoleculares das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com as proteínas através da obtenção dos parâmetros termodinâmicos, e entender como as cargas das porfirinas se relacionam com essas interações.
3. Estudar a interação da porfirina TPPS<sub>4</sub> com a nanopartícula magnética de maghemita através de espectroscopia de absorção UV/vis e de fluorescência.
4. Avaliar as interações das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com DNA plasmidial, através de técnicas de absorção UV/vis, e investigar como a inserção do zinco no anel central dessas porfirinas afeta as afinidades com essa biomolécula.
5. Investigar o potencial fotodinâmico das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP contra o DNA através da técnica de eletroforese, e entender como a presença do zinco no anel central dessas porfirinas afeta o potencial de fotodano ao DNA.

## Capítulo 2 : Tópicos teóricos

### 2.1. Terapia fotodinâmica

Um ramo da medicina moderna que vem ganhando destaque nos últimos anos é a fotomedicina, que consiste na utilização da luz no tratamento de patologias. Comumente, se diferenciam três tipos de tratamentos com a luz: fototerapia (somente o uso da luz), fotoquimioterapia (uso da luz associada a compostos químicos que absorvem luz UV/Vis ou IV próximo) e Terapia Fotodinâmica (PDT – *Photodynamic Therapy*) que, além compostos fotossensibilizadores (FS), requer também a presença do oxigênio molecular [12]. A fototerapia data dos primórdios das civilizações, no entanto, permaneceu praticamente esquecida por muitos séculos e só foi redescoberta no início do século XX [13].

Em 1900, Oscar Raab foi o primeiro a observar os efeitos tóxicos de acridina em paramércios sob irradiação luminosa [13]. As tentativas pioneiras de aplicação de PDT para tratamento de tumores foram realizadas em 1903 pelo grupo de von Tappeiner, no qual Raab era estudante. Após esses primeiros testes, a PDT ficou praticamente esquecida durante várias décadas devido ao surgimento de antimicrobianos muito eficazes na chamada “Era dos Antibióticos”. No entanto, com aparecimento recente de bactérias resistentes a antibióticos e a busca por terapias alternativas contra o câncer, o efeito fotodinâmico tem ressurgido como uma alternativa promissora para esses males [12]. Hoje, especialistas da área de saúde, conhecem e usam o efeito fotodinâmico para tratamentos de diversas doenças, tais como câncer, ceratoses actínicas, [14] bem como contra microrganismos como fungos, bactérias, vírus, dentre outros [15]. Os avanços recentes na utilização da ação fotodinâmica tem sido cada vez mais impulsionados pelo desenvolvimento de novas fontes de luz, FS mais eficazes e sistemas de entrega de fármacos que melhoram a distribuição dos FS pelo organismo [4], [5].

De uma forma geral, a ação fotodinâmica consiste na combinação de uma molécula fotossensibilizadora, oxigênio molecular (abundante em sistema biológico) e luz na região do visível ou até o infravermelho próximo. O mecanismo da ação fotodinâmica pode ser explicado através dos processos fotofísicos e fotoquímicos decorrentes da absorção luz que serão apresentados na próxima seção.

## 2.2. Fotofísica de uma molécula típica

O ponto de partida para entender os mecanismos envolvidos na atividade fotodinâmica é conhecer os processos fotofísicos associados às moléculas fotossensibilizadoras. Para isso, consideremos o diagrama de níveis de energia apresentado na Figura 1, também conhecido como diagrama de Jablonski, que mostra o estado fundamental singlete ( $S_0$ ) do composto fotossensibilizador, dois estados excitados singletos ( $S_1$  e  $S_2$ ) e um estado excitado tripleto ( $T_1$ ).

No equilíbrio termodinâmico, as moléculas se encontram no estado singlete fundamental  $S_0$ . Após a absorção de um fóton de energia apropriada, esta molécula sofre uma transição para algum estado excitado,  $S_1$  ou  $S_2$ . Uma vez no estado  $S_2$ , por exemplo, a molécula sofrerá uma transição isoenergética para o estado  $S_1$ , conhecida como conversão interna (CI), e em seguida, perderá parte do excesso de energia por relaxação vibracional, até atingir o nível mais baixo do estado  $S_1$ . A partir do estado  $S_1$  a molécula poderá relaxar por três vias:

1. Retornar ao estado fundamental  $S_0$  por processo radiativo, através da emissão fluorescente;
2. Retornar a  $S_0$  por conversão interna (CI) seguida de relaxação vibracional, que é um processo não radiativo, ou
3. Sofrer um cruzamento intersistemas (CIS) formando o estado tripleto ( $T_1$ ), devido a uma inversão de spin.

Neste estado tripleto, a molécula pode retornar à  $S_0$  por um novo processo de cruzamento intersistemas seguindo pela relaxação vibracional ou pela emissão de fosforescência (radiativo). Para amostras em solução a relaxação vibracional é dominante e geralmente não ocorre o processo de fosforescência.

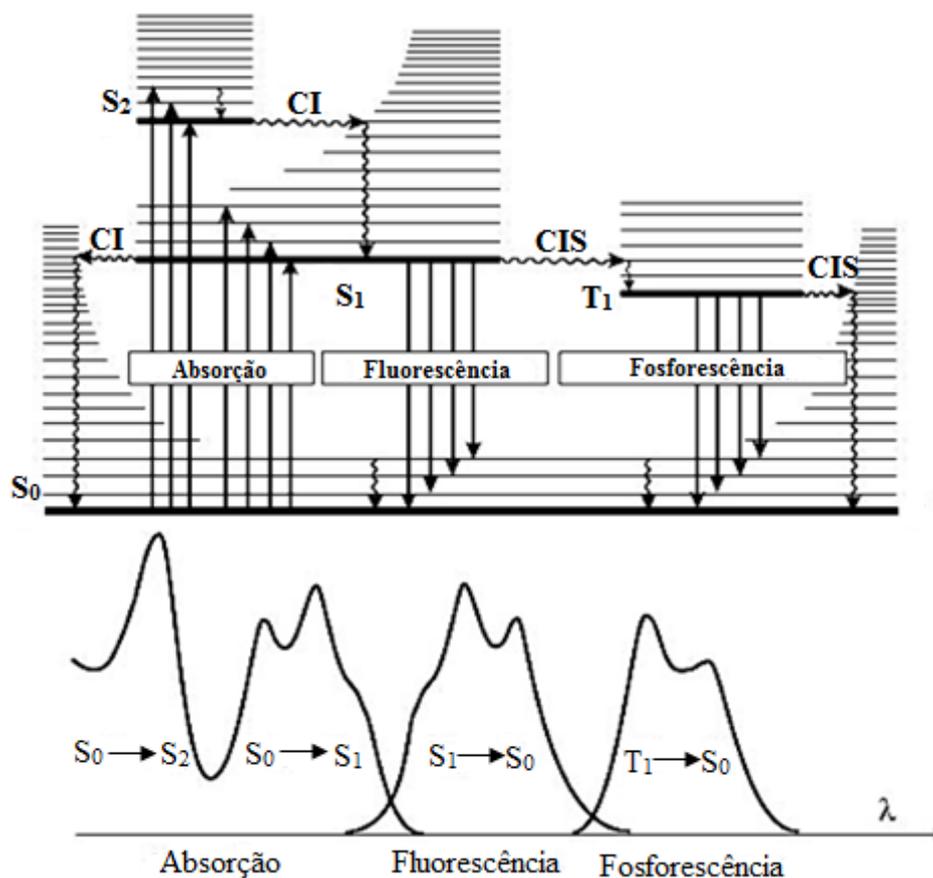


Figura 1: diagrama de Jablonski mostrando: Absorção, CI (Conversão interna), fluorescência, CIS (Cruzamento intersistemas) e fosforescência.

Adaptado de [16].

Estando ainda no estado excitado ( $S_1$ ) ou ( $T_1$ ), a molécula pode perder elétrons para moléculas em sua vizinhança, gerando espécies reativas citotóxicas tais como, ânion-radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidropoxila ( $HOO^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). A inviabilização celular que ocorre através da ação dessas espécies reativas é conhecida como mecanismo fotodinâmico do tipo I.

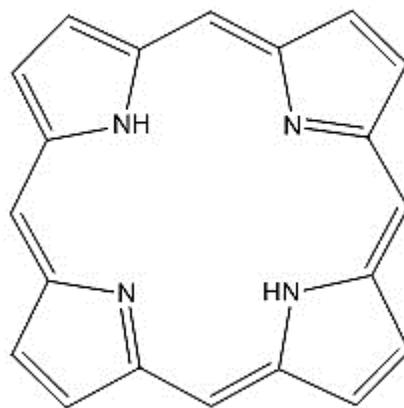
No processo de relaxação do estado tripleto para o fundamental, o FS pode transferir energia para o oxigênio molecular, em seu estado fundamental tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), formando uma espécie altamente reativa, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que também pode provocar uma série de reações bioquímicas que levam à morte de células. A atividade citotóxica relacionada com essa via de desativação do FS é conhecida como mecanismo fotodinâmico do tipo II [17].

Apesar de ambos os mecanismos I e II serem capazes de inviabilizar células, a atividade citotóxica tem sido atribuída principalmente ao mecanismo do tipo II [18]. Os mecanismos de ação da PDT (tipos I e II) fazem dessa terapia uma técnica interessante no combate às possíveis adaptações genéticas que deixam as células ou os micro-organismos mais resistentes aos fármacos, tendo em vista a sua diversidade de alvos moleculares dentro da célula [19].

Diversos fotossensibilizadores têm sido utilizados em PDT, dentre eles se destacam moléculas baseadas em núcleos tetrapirrólicos como as porfirinas, clorinas e bacterioclorinas; derivados de xantenos (Rosa bengala); fenotiazínicos tais como azul de toluidina e azul de metileno, acridinas; dentre outras. Neste trabalho serão avaliados compostos porfirínicos e seus complexos metálicos.

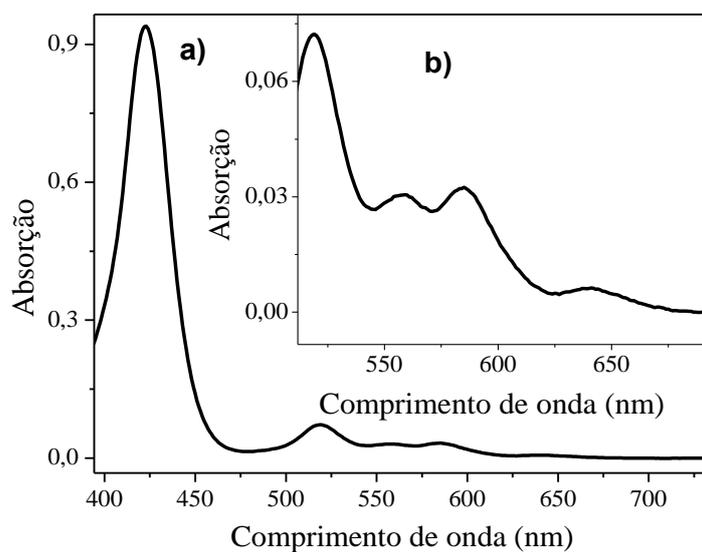
### **2.3. Porfirinas**

Porfirinas são moléculas orgânicas fotossensibilizadoras que desempenham um papel fundamental na natureza. O grupo heme, por exemplo, é uma porfirina associada à estrutura da hemoglobina, responsável pelo transporte e armazenamento do oxigênio molecular nos animais. Podemos destacar também as clorinas que são uma versão parcialmente hidrogenadas das porfirinas, importantes no processo fotossintético das plantas [20]. As porfirinas possuem em sua estrutura um macrociclo contendo quatro anéis pirrólicos, conforme apresentado na Figura 2, que lhes proporcionam uma extensa conjugação  $\pi$ .



*Figura 2: estrutura química do núcleo das porfirinas.*

As porfirinas são caracterizadas por uma intensa absorção na região próxima de 400 nm denominada banda de Soret ou banda B (Figura 3a), e outras bandas entre 500-650 nm conhecidas como bandas Q (Figura 3b). Embora os picos das bandas Q sejam bem menos intensos que o pico da banda B, muitas aplicações são conduzidas com fonte de luz vermelha entre 600 e 800 nm, dentro da “janela fototerapêutica”, onde ocorre uma maior penetração da luz em tecidos biológicos [21].



*Figura 3: espectro de absorção óptica de uma porfirina mostrando a banda de Soret a) e as bandas Q b).*

A primeira geração de FS utilizados em PDT contra o câncer foram as hematoporfirinas e seu derivados, por exemplo, a protoporfirina. Apesar dessas moléculas apresentarem alta eficiência de formação de estados tripleto e altos rendimentos de formação de oxigênio singleto, elas mostram alguns inconvenientes na prática clínica, com o considerável efeito de fotossensibilização tardia em pacientes e baixa absorção da luz na região de interesse para a PDT (janela fototerapêutica) [22]. Essas e outras limitações vêm impulsionando o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, de tal forma que, a maioria dos fotossensibilizadores de segunda geração são moléculas que apresentam uma maior absorção dentro da janela fototerapêutica, rápida metabolização pelo organismo e acúmulo seletivo nos tecidos [23].

## 2.4. Espécies reativas de oxigênio

Conforme foi exposto brevemente na seção 2.1, para ocorrer a ação fotodinâmica na PDT, utiliza-se um composto fotossensibilizador que, ao ser ativado pela luz, transfere energia ou elétrons para o ambiente circunvizinho, gerando as espécies reativas de oxigênio (*ROS*, *Reactive Oxygen Species*). O processo que se segue, são reações que geram um intenso estresse oxidativo local, provocando danos irreversíveis a célula-alvo. As *ROS* são constituídas principalmente pelo ânion-radical superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) [24].

Ao receber um elétron, o oxigênio molecular forma o ânion-radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), conforme a Figura 4. Em meios ácidos, abundante em  $\text{H}^+$ , o radical superóxido pode ser protonado e formar o radical hidroperoxila ( $\text{HOO}^{\bullet}$ ). Se receber dois elétrons e  $2\text{H}^+$ , o oxigênio molecular dará origem ao peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e três elétrons mais  $3\text{H}^+$ , formará o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), ou com a inversão de spin ocorrerá a formação do oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ). Existem estudos que indicam que o ânion radical-superóxido e o radical hidroxila,

possuem maior facilidade de atravessar membranas biológicas, e por isso agem principalmente no interior das organelas [25]. Por outro lado, o radical hidroperoxila atua principalmente nas membranas, devido ao seu caráter lipofílico.

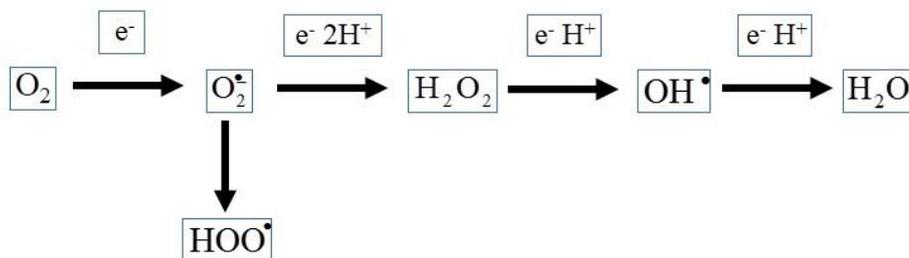


Figura 4: esquema dos processos envolvidas na formação das espécies reativas de oxigênio singlete. Adaptado de [25]

O oxigênio singlete é considerado o principal responsável pelos efeitos deletérios que ocorrem na terapia fotodinâmica, atuando em diversos alvos biológicos macromoleculares, tais com lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas [26]. Por isso, algumas técnicas que possibilitem medir a eficiência de geração de oxigênio singlete pelas moléculas fotossensíveis têm sido desenvolvidas. Essa eficiência pode ser medida através do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, que é um importante parâmetro de avaliação da eficácia de um FS na terapia fotodinâmica.

Um método muito utilizado para determinar o rendimento quântico de  $^1O_2$ , consiste em medir a sua emissão fosforescente, em 1279 nm, que ocorre devido ao retorno da molécula de oxigênio para o seu estado fundamental, contudo, esse é um método que demanda sistemas de detecção sofisticados e bastante caros. Por isso, têm sido desenvolvidos métodos de determinação indireta que consistem na análise da foto-oxidação de moléculas orgânicas, que agem como sensores químicos de  $^1O_2$  [27], [28]. Muitos sensores vêm sendo utilizados em diversos trabalhos, como ácido úrico [29], 1,3-difenilbenzofurano [30], ácido p-nitrosodimetilamina [31] e betacianinas [27], e os resultados obtidos são bastante satisfatórios quando comparados aos adquiridos pelo método direto [27].

## 2.5. Espectroscopia de absorção UV/Vis

O processo de absorção da radiação pode ser descrito através da lei de Lambert-Beer, que nos mostra a dependência entre a atenuação do feixe incidente na amostra com a concentração das moléculas, o coeficiente de absorção molar e a extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção.

Considere um feixe de luz de intensidade inicial  $I_{\lambda}^0$  incidindo numa amostra de caminho óptico  $\ell$  e concentração  $c$ , Figura 5. Em virtude das interações entre os fótons e as partículas absorvedoras, a intensidade do feixe decresce de  $I_{\lambda}^0$  para  $I_{\lambda}$ . A lei de Beer prevê um decaimento exponencial para a intensidade da luz incidente à medida em que o feixe percorre o caminho óptico da amostra, que pode ser apresentado pela equação:

$$I_{\lambda} = I_{\lambda}^0 \cdot 10^{-A} \quad 2.1$$

sendo  $A$  a absorbância da amostra. Podemos ainda definir a transmitância  $T$ , que é a fração da radiação incidente transmitida pela solução, da seguinte forma:

$$T = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda}^0} \quad 2.2$$

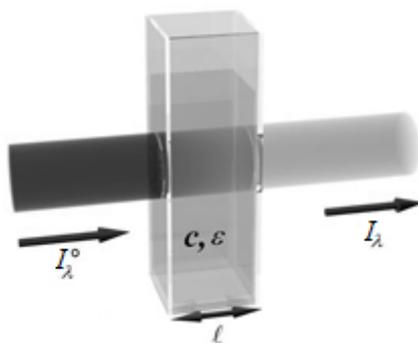


Figura 5: atenuação do feixe de luz pela amostra. Adaptado de [32].

Aplicando o logaritmo na Equação 2.1, a absorbância fica relacionada com a transmitância da seguinte forma:

$$A = -\log T = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} \quad 2.3$$

Por outro lado a lei de Lambert-Beer pode ser escrita em termos da absorbância  $A(\lambda)$ , que depende do comprimento de onda, concentração da amostra  $c$  e do caminho óptico  $\ell$  do meio absorvente como,

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)\ell \cdot c \quad 2.4$$

sendo  $\varepsilon(\lambda)$  o coeficiente de absorção molar da amostra, que é dependente do comprimento de onda da radiação incidente. A Equação (2.4) geralmente não é válida para concentrações muito elevadas, nessa situação são observados desvios da linearidade prevista pela lei Lambert-Beer entre a absorbância e a concentração [33]. Empregando a lei de Lambert-Beer podemos calcular o coeficiente de absorção molar das espécies se a concentração for conhecida. Por outro lado, uma das grandes vantagens de utilizar a Equação (2.4) consiste em poder obter a concentração de uma amostra se os valores da absorbância, coeficiente de absorvidade molar e caminho óptico forem conhecidos.

A medida da razão entre as potências dos feixes transmitido e incidente, que é forma experimental empregada para se obter o valor da absorbância, é feita utilizando-se os espectrofotômetros. Várias dezenas de modelos de espectrofotômetros estão disponíveis comercialmente. A maioria dos espectrofotômetros cobre a região do UV/Vis e, ocasionalmente, a região do infravermelho próximo. A maior parte das medidas de absorção UV/Vis feitas neste trabalho foram realizadas com um espectrofotômetro Hitachi U-2900 no laboratório de Biofotônica do Instituto de Física da UFG.

## 2.6. Espectroscopia de fluorescência

Enquanto a técnica de espectroscopia de absorção UV/Vis fornece informações sobre o primeiro passo dos processos fotofísicos, a espectroscopia de fluorescência permite avaliar os processos de relaxação do estado excitado singlete via emissão radiativa, conforme discutido inicialmente na seção 2.2 (Figura 1). Tipicamente, uma molécula fotossensibilizadora, em seu estado excitado singlete  $S_1$ , pode retornar ao estado fundamental por três vias: processos radiativos ( $r$ ), cruzamento intersistemas ( $CIS$ ), e conversão interna ( $CI$ ). A soma das taxas associadas ( $k$ ) a essas vias de relaxação está relacionada com a taxa de retorno ao estado fundamental  $k_m$  ou com o tempo de vida  $\tau_0$  dessa molécula no estado excitado  $S_1$  pela seguinte equação:

$$k_m = \frac{1}{\tau_0} = k_r + k_{CIS} + k_{CI} \quad 2.5$$

onde,  $k_r$ ,  $k_{CIS}$  e  $k_{CI}$  representam as taxas associadas aos processos radiativos, cruzamento intersistemas e conversão interna respectivamente. Embora esses três processos estejam envolvidos na relaxação do estado  $S_1$ , a fluorescência emitida pelo composto é uma valiosa ferramenta para determinar o tempo de vida desse estado. Por isso, geralmente, é usado de forma coloquial que o tempo de vida de fluorescência é o tempo de vida do estado  $S_1$ .

No processo de relaxação da amostra excitada, a molécula permanece no estado singlete excitado por um tempo da ordem de nanosegundos. Este tempo é suficiente para que a molécula excitada interaja com o meio, tornando o processo de emissão fluorescente fortemente dependente da sua vizinhança. Por essa razão a técnica de detecção de emissão fluorescente é muito importante, pois fornece informações preciosas sobre o meio em que a molécula se encontra [34].

A técnica de fluorescência pode ser empregada nas formas estática e temporal. Diversos parâmetros podem ser obtidos por meio da aplicação dessas duas técnicas. Na forma estática

podemos avaliar, por exemplo, o comprimento de onda de emissão ou quantificar a eficiência de emissão fluorescente, enquanto que na forma temporal pode-se obter o tempo de vida do estado excitado.

Para medir o tempo de vida de fluorescência, a amostra é exposta a um pulso intenso de luz, onde a largura do pulso é tipicamente menor do que o tempo de decaimento da amostra. Este decaimento da intensidade é registrado com um sistema de detecção rápido que permite medir a intensidade na escala de tempo de nanossegundos. Dessa forma, se uma molécula fotossensibilizadora exibe um decaimento monoexponencial na sua intensidade de fluorescência  $I(t)$  após o pulso de luz, o tempo de vida de fluorescência  $\tau_0$  pode ser obtido do ajuste dos dados experimentais pela seguinte equação:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau_0} \quad 2.6$$

A eficiência da emissão fluorescente pode ser obtida pelo rendimento quântico de fluorescência. Este parâmetro é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos por um fluoróforo ou em termos das taxas dos processos que ocorrem. A expressão para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) é dada por:

$$\Phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad 2.7$$

onde  $k_f$  é a taxa de emissão fluorescente do fluoróforo e  $k_{nr}$  é a taxa de decaimento através de mecanismos não radiativos. No entanto, na prática é mais fácil determinar o rendimento quântico de uma molécula fluorescente pela comparação com padrões de rendimentos quânticos conhecidos, conforme a equação a seguir [35]:

$$\Phi_F = \Phi_R \frac{f}{f_R} \frac{A_R}{A} \frac{n_0^2}{n_{0R}^2} \quad 2.8$$

Nessa equação,  $\Phi$  é o rendimento quântico de fluorescência,  $f$  é a área delimitada pelo espectro de emissão,  $A$  é a absorvância e  $n$  é o índice de refração do solvente da amostra. O subscrito  $R$  rotula os parâmetro associados ao fluoróforo de referência com rendimento quântico conhecido.

Uma gama de técnicas e métodos utilizam a emissão fluorescente de um fluoróforo para obter informações sobre o próprio fluoróforo ou sobre processos intermoleculares que afetam o seu estado excitado. Na próxima seção, serão apresentados os detalhes de um método baseado nas alterações dos espectros de emissão de uma molécula fluorescente devido às interações intermoleculares. Esse método conhecido como supressão de fluorescência é o cenário da maioria das investigações feitas neste trabalho.

## 2.7. Supressão de fluorescência

Supressão de fluorescência são processos que resultam na redução de intensidade de emissão de um fluoróforo. Geralmente, esses processos possuem duração equiparável ao tempo de vida do estado excitado de uma molécula fluorescente e competem com os processos de relaxação intrínsecos. A maioria desses processos estão associados à interações intermoleculares entre uma molécula excitada  $M^*$  e outra molécula  $Q$  denominada genericamente de supressora, conforme a Figura 6, onde  $k_q$  é a constante associada com o processo bimolecular. Essa técnica tem sido amplamente utilizada como fonte de informações sobre sistemas biofísicos e bioquímicos [36]–[39].

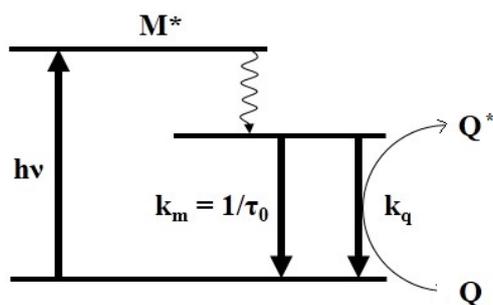


Figura 6: diagrama de energia esquemático para a supressão dinâmica.

O processo bimolecular fornece à molécula excitada  $M^*$  uma via adicional de desexcitação e retorno ao estado fundamental. Conseqüentemente, provoca a redução do tempo de vida do fluoróforo na presença do supressor (Q), bem como da intensidade de fluorescência emitida pelas moléculas excitadas. Geralmente, os mecanismos de supressão são classificados em estático e dinâmico. Esses dois tipos de mecanismos de supressão serão detalhados a seguir.

### 2.7.1 Supressão dinâmica

O processo de supressão dinâmica resulta de colisões entre o fluoróforo e o supressor. A partir do esquema apresentado na Figura 6 a evolução temporal da espécie excitada  $M^*$  pode ser descrita pela seguinte equação de taxas:

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -(k_m + k_q[Q])[M^*] \quad 2.9$$

Resolvendo essa equação diferencial com as condições iniciais  $[M^*] = [M^*]_0$ , onde  $[M^*]_0$  é a concentração inicial de moléculas excitadas no instante inicial ( $t_0 = 0$ ), obtemos a seguinte solução:

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-(k_m + k_q[Q])t} \quad 2.10$$

Dessa forma, fica claro que o termo  $(k_m + k_q[Q])$  representa uma taxa efetiva  $k$  de retorno ao estado fundamental que leva em consideração a taxa associada ao processo de supressão bimolecular. Dessa forma, podemos reescrever esse termo da seguinte maneira:

$$k = \frac{1}{\tau} = k_m + k_q[Q] \quad 2.11$$

ou ainda,

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad 2.12$$

onde  $\tau$  representa o tempo de vida de fluorescência na presença do supressor,  $F$  e  $F_0$  são as intensidades de emissão fluorescente na presença e na ausência do supressor respectivamente.

A Equação 2.12 é conhecida com equação de Stern-Volmer e o produto  $K_{SV} = k_q\tau_0$  é a chamada constante de Stern-Volmer, que reflete a eficiência do processo de supressão dinâmica. A constante de Stern-Volmer pode ser obtida através da inclinação de um gráfico da razão  $F_0/F$  em função da concentração do supressor  $[Q]$  e, de posse de  $K_{SV}$ , pode-se determinar também  $k_q$ , se o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor for conhecido.

De forma ideal, se todas as colisões entre fluoróforos e supressores resultarem na atenuação da fluorescência, dizemos que o processo de supressão dinâmica é controlado por difusão. Neste caso, a constante de supressão bimolecular  $k_q$  pode ser representada pela constante difusional  $k_1$  definida na teoria das reações controladas por difusão de Smoluchowski [16], pela equação abaixo:

$$k_1 = 4\pi NR_c D \quad 2.13$$

onde  $N$  é o número de Avogadro,  $R_c$  é a menor distância possível entre o fluoróforo e o supressor e  $D$  é o coeficiente de difusão que é dado pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{f\pi\eta} \left( \frac{1}{R_M} + \frac{1}{R_Q} \right) \quad 2.14$$

onde  $T$  é a temperatura,  $k$  é constante de Boltzmann  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $f$  é um coeficiente relacionado com as condições de contorno,  $R_M$  e  $R_Q$  são os raios do fluoróforo e do supressor respectivamente. O valor do coeficiente de difusão  $D$  para a maioria das moléculas em solução é da ordem de  $10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$  o que resulta em valores de  $k_f$  da ordem de  $10^9$ - $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [16]. Dessa forma, valores de  $k_q$ , obtidos por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência, que apresentam valores com esta ordem de grandeza, geralmente sugerem que o mecanismo de supressão é colisional.

### 2.7.2 Supressão estática

O processo de supressão estática ocorre devido a formação de um complexo não fluorescente no estado fundamental (MQ) e a fluorescência que se observa da amostra é proveniente apenas dos fluoróforos (M) não complexados com os supressores (Q), conforme representado esquematicamente na Figura 7.

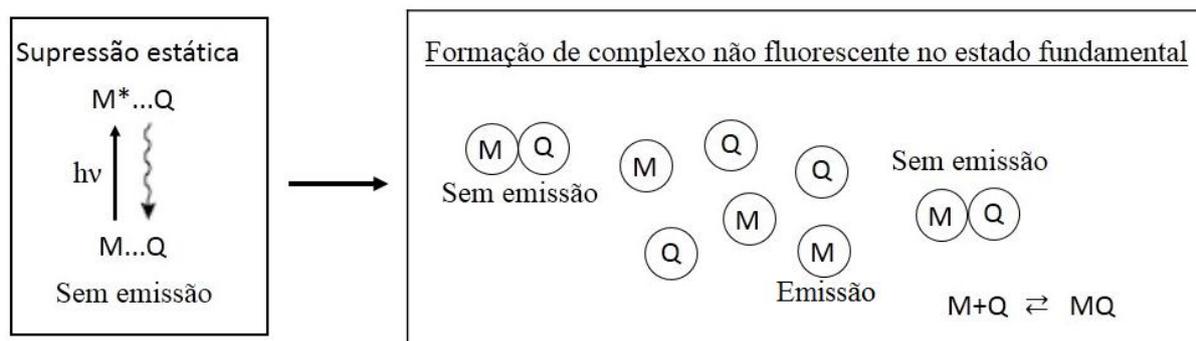


Figura 7: representação esquemática do mecanismo de supressão estática. As moléculas supressoras  $Q$  suprimem a fluorescência das moléculas fluorescentes  $M$  quando há a formação dos complexos  $MQ$  e, dessa forma, a fluorescência observada é proveniente das moléculas  $M$  livres.

A formação do complexo não fluorescente no estado fundamental, na proporção 1:1, pode ser representada pela seguinte equação de equilíbrio:



A constante de equilíbrio para a Equação 2.15 pode ser escrita com:

$$K = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad 2.16$$

Utilizando a relação de conservação de massa  $[M_0] = [M] + [MQ]$ , neste caso  $[M_0]$  é a concentração total do fluoróforo, podemos reescrever a Equação 2.16 da seguinte forma:

$$\frac{[M]}{[M_0]} = \frac{1}{1 + K[Q]} \quad 2.17$$

Sabendo que, em baixas concentrações, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo, podemos apresentar a Equação 2.17 de seguinte forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad 2.18$$

Essa relação possui exatamente a mesma forma que a Equação 2.12, no entanto, no contexto da supressão estática, um gráfico da razão entre o tempo de vida de fluorescência do fluoróforo na ausência do supressor, pelo tempo de vida na presença do supressor ( $\tau_0/\tau$ ) em função da concentração do supressor  $[Q]$  apresenta um perfil constante enquanto que na supressão dinâmica esse mesmo gráfico é uma reta crescente. Isso ocorre porque o tempo de vida do fluoróforo na supressão estática não é afetado pelo supressor enquanto que, na supressão dinâmica, o tempo de vida é reduzido à medida em que se aumenta a concentração do supressor, e conseqüentemente as colisões entre o supressor e o fluoróforo. Com isso, avaliar o comportamento dos gráficos de  $\tau_0/\tau$  em função de  $[Q]$  tem sido um método bastante utilizado para indicar se a supressão no sistema é estática ou dinâmica [40], [41].

Outra forma de determinar se a supressão ocorre pelo mecanismo estático ou dinâmico, é avaliar o comportamento da constante de supressão na Equação 2.18 em função de temperatura. Embora não haja uma dependência explícita da temperatura na Equação 2.18, na supressão estática, os complexos não fluorescentes formados no estado fundamental são desestabilizados pelo aumento da temperatura, resultando no decréscimo dos valores de  $K$ . Por outro lado, no mecanismo dinâmico, o aumento da temperatura favorece a difusão do supressor para o fluoróforo, resultando num aumento da frequência colisional e, com isso, os valores da constante de supressão também aumentam [35].

Como foi mencionado previamente, a Equação 2.18 foi demonstrada para um contexto de interações que ocorrem com estequiometria na proporcionalidade de 1:1. No entanto, esse não é o cenário para diversos tipos de interações intermoleculares, principalmente quando macromoléculas biológicas estão envolvidas nessas interações.

Um modelo construído por Archibald Hill em 1910 [42], inicialmente para descrever a ligação do  $O_2$  à hemoglobina, tem sido bastante utilizado para interpretar dados de supressão de fluorescência intrínseca de proteínas [43]–[45]. Geralmente, a interação de uma proteína (P) e um ligante (L) resulta na formação de um complexo (PL) e pode ser descrita por uma equação de equilíbrio do tipo:



De acordo com a Equação 2.16, podemos associar uma constante de equilíbrio  $K$  à Equação 2.19, de tal maneira que,

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad 2.20$$

Podemos definir também a fração  $\theta$  dos sítios de ligação da proteína que são ocupados pelo ligante da seguinte forma,

$$\theta = \frac{\text{sítios de ligação ocupados}}{\text{total de sítios de ligação}} = \frac{[PL]}{[PL] + [P]} \quad 2.21$$

onde o denominador representa a soma de todos os sítios da proteína, ocupados  $[PL]$  e desocupados  $[P]$ . Substituindo a Equação 2.21 em 2.20 e rearranjando os termos obtemos:

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K}} \quad 2.22$$

Para uma proteína com  $n$  sítios de ligação, a equação de equilíbrio fica da seguinte maneira:



A expressão para  $\theta$  fica:

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K} \quad 2.24$$

Rearranjado os termos e tomando o log de ambos os lados da equação 2.24 obtemos:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log[L] - \log K \quad 2.25$$

A Equação 2.25 é conhecida como equação de Hill-Langmuir e um gráfico de  $\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right)$  em função de  $\log[L]$  fornece, a partir do coeficiente linear, a constante  $K$  enquanto que a inclinação fornece o parâmetro  $n$ , conhecido como coeficiente de Hill. A suposição de que  $n$  representa o número de sítios de ligação pode ser tentadora, como se pudéssemos prever o número de sítios de ligação em um proteína específica por um simples ajuste de curva. No

entanto, já foi demonstrado que o coeficiente  $n$  não é uma estimativa correta para o número de sítios de ligação [46]. Quando várias moléculas de ligante se ligam a uma proteína, o valor do coeficiente de Hill é geralmente menor que o número de sítios de ligação. Portanto, seu significado é pouco informativo, podendo no máximo refletir a extensão da cooperatividade entre os sítios de ligação (forma com os sítios interagem entre si) [46].

A correspondência entre a equação de Hill-Langmuir e a supressão de fluorescência de uma proteína é feita através do parâmetro  $\theta$ . Na prática, a estimativa desse parâmetro pode ser dada pela fração da fluorescência inicial da proteína que é suprimida na presença do supressor. Quando fazemos essa correspondência, estamos dizendo que a fluorescência que está ao alcance do ligante/supressor em determinado sítio de ligação é suprimida, e que a fluorescência observada é proveniente de regiões da proteína onde se encontram os sítios de ligação desocupados. Portanto, a correspondência fica da seguinte forma:

$$\theta = \frac{F_0 - F}{F_0} = \frac{\Delta F}{F_0} \quad 2.26$$

onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do supressor, respectivamente.

## 2.8. Termodinâmica da interação fluoróforo-supressor

Diversas forças são responsáveis pelas interações intermoleculares, dentre as quais se destacam interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio [47]. Em geral, para identificar as forças responsáveis pela estabilidade dessas interações, são calculados parâmetros termodinâmicos como a entalpia, a entropia e a energia livre de Gibbs.

Especificamente, os parâmetros termodinâmicos relativos às interações entre um fluoróforo e um supressor, podem ser obtidos por meio de técnicas de espectroscopia UV/Vis e de fluorescência. O caminho matemático que viabiliza a obtenção desses parâmetros por técnicas espectroscópicas é a equação de van't Hoff, que será apresentada nesta seção. A equação de van't Hoff relaciona os parâmetros termodinâmicos com uma quantidade fundamentalmente experimental que é a constante de equilíbrio de uma interação intermolecular. A seguir serão apresentados, de forma breve, os parâmetros termodinâmicos entalpia, entropia e energia livre de Gibbs e a argumentação matemática necessárias para a apresentação da equação de van't Hoff.

A entalpia  $H(T,P)$  é uma função de estado que, em processos isobáricos, está diretamente associada com as energias trocadas pelo sistema na forma de calor [48]. Podemos escrever:

$$dH = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_P dT + \left( \frac{\partial H}{\partial P} \right)_T dP \quad 2.27$$

O segundo termo da Equação 2.27, para processos isobáricos, é nulo e o primeiro termo está relacionado com a capacidade térmica à pressão constante  $C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_P$ . Dessa forma, a Equação 2.27 pode ser reescrita com:

$$dH = C_p \cdot dT \quad 2.28$$

A Equação 2.28 deixa clara a relação direta entre a entalpia e energia trocada pelo sistema na forma de calor a pressão constante.

Em 1865, Rudolf Clausius apresentou a primeira formulação matemática para o conceito de entropia. Considerando  $Q$  a energia na forma de calor trocada entre o sistema e sua

vizinhança à temperatura absoluta  $T$ , a integral de linha da razão  $\frac{\delta Q}{T}$  é independente do caminho que leva o sistema do estado inicial (1) ao estado final (2). Dessa forma, existe uma função de estado do sistema  $S(P, V, T)$ , chamada de entropia, cuja variação entre os estados 1 e 2 é dada por:

$$\Delta S = S_2 - S_1 = \int_1^2 \frac{\delta Q}{T} \quad 2.29$$

De um modo geral, podemos considerar a variação da entropia como a soma da variação da entropia da vizinhança de um determinado sistema  $\Delta S_{viz}$  com a variação da entropia do próprio sistema  $\Delta S_{sis}$ :

$$\Delta S_{universo} = \Delta S_{viz} + \Delta S_{sis} \quad 2.30$$

Para processos reversíveis sempre se observa a igualdade  $\Delta S_{viz} = -\Delta S_{sis}$ , de forma que a variação de entropia do universo é nula. Por outro lado, as trocas de energia na forma de calor entre o sistema e a vizinhança em processos irreversíveis resultam sempre em um aumento na entropia do universo  $\Delta S_{universo} > 0$ . Na prática, apesar de existirem processos que muito se aproximam dos reversíveis, toda transformação leva a um aumento na entropia total do universo.

Em resumo, a entropia é uma função de estado vinculada a um princípio de maximização: a entropia associada ao estado de equilíbrio de um sistema isolado é sempre a máxima possível. Na prática, esse princípio é traduzido pela medida do grau de irreversibilidade de um sistema. Dessa forma, a entropia pode ser tomada com um bom parâmetro de espontaneidade de um processo.

No entanto, em estudos que envolvem interações intermoleculares e reações químicas, utiliza-se principalmente a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) como critério de espontaneidade de uma

transformação/reação. A energia livre de Gibbs é a totalidade de energia associada ao sistema, efetivamente disponível para a realização de trabalho útil. A Equação 2.31 apresenta a definição matemática da energia livre de Gibbs.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad 2.31$$

A relação entre a variação de entropia do universo com a energia livre de Gibbs pode ser facilmente obtida multiplicando-se a Equação 2.30 por  $(-T)$ :

$$-T \cdot \Delta S_{\text{universo}} = \Delta H - \Delta S_{\text{sis}} \cdot T \quad 2.32$$

O segundo membro da Equação 2.32 é, obviamente, a definição da energia livre de Gibbs. Então podemos escrever:

$$\Delta G = -T \cdot \Delta S_{\text{universo}} \quad 2.33$$

A Equação 2.33 mostra que o aumento da entropia do universo está associado com a redução da energia livre de Gibbs. Dessa forma, a energia livre de Gibbs relacionada ao estado de equilíbrio de um processo espontâneo é sempre a mínima possível.

No contexto do equilíbrio químico de uma reação química ou interação intermolecular, a energia livre de Gibbs, pode ser fundamentalmente relacionada à constante de equilíbrio que caracteriza a reação/interação. A Figura 8 mostra que a direção do processo espontâneo é a da redução da energia livre de Gibbs, e que o estado de equilíbrio do sistema corresponde ao ponto mais baixo da curva. Outro parâmetro indicado na Figura 8 é a energia livre de Gibbs padrão da reação ( $\Delta G^0$ ). Esse parâmetro é a diferença entre a energia livre de Gibbs dos produtos nos seus estados padrão (produtos puros) e os reagentes nos seus estados padrão (reagentes puros). A energia livre padrão é uma quantidade fixa, portanto não varia enquanto a reação/interação prossegue.

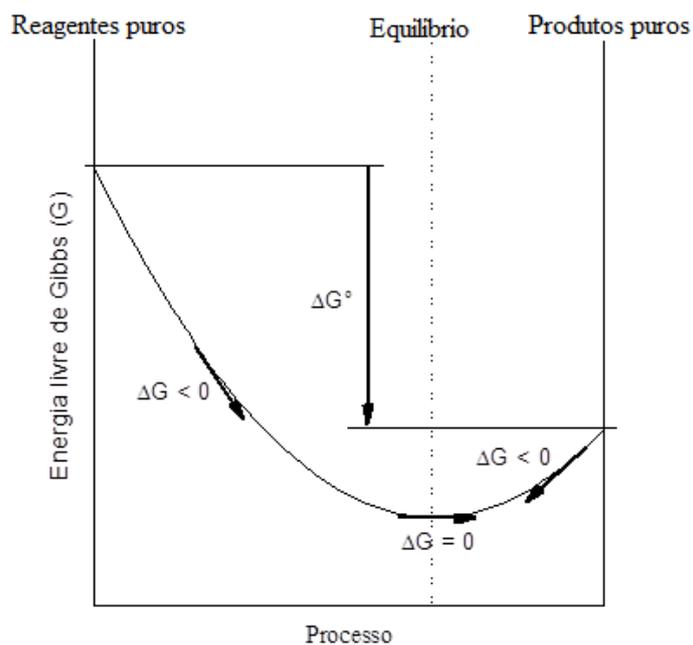


Figura 8: energia livre da Gibbs em função de extensão de um processo. Adaptado de [49].

A definição de energia livre de Gibbs, dada pela Equação 2.31, pode ser reescrita da seguinte forma:

$$G = H - T \cdot S \quad 2.34$$

Derivando a expressão 2.34 e usando as definições de entalpia ( $H = U - P \cdot V$ ), energia interna ( $U = Q - P \cdot V$ ) e entropia (Eq. 2.29) para um processo isotérmico, temos:

$$dG = d(U - P \cdot V) - d(T \cdot S) \quad 2.35$$

$$dG = dQ - P \cdot dV + P \cdot dV + V \cdot dP - S \cdot dT - dQ \quad 2.36$$

$$dG = V \cdot dP \quad 2.37$$

Integrando a Equação 2.37 de  $G^0$  ( $G$  padrão) até  $G$  e de  $P^0$  ( $P$  padrão) até  $P$  temos:

$$\int_{G^0}^G dG = \int_{P^0}^P V \cdot dP \quad 2.38$$

$$G - G^0 = nRT \int_{P^0}^P \frac{dP}{P} \quad 2.39$$

$$G = G^0 + nRT \ln(P) \quad 2.40$$

onde  $n$  é o número de moles,  $R$  a constante universal dos gases e foi usado  $P^0 = 1 \text{ atm}$ .

Aplicando a Equação 2.40 para determinar a variação da energia livre de Gibbs de um sistema modelo formado de dois reagentes gasosos A e B em uma reação do tipo  $A + B \rightleftharpoons C$ , temos:

$$\Delta G = G_{\text{produtos}} - G_{\text{reagentes}} \quad 2.41$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln\left(\frac{P^C}{P^A \cdot P^B}\right) \quad 2.42$$

onde  $P^C$ ,  $P^A$  e  $P^B$  são as pressões parciais (pressão exercida pelo gás caso os compostos estivessem sozinhos ocupando todo o volume, à mesma temperatura da mistura gasosa) dos componentes da reação.

A razão que aparece no argumento do logaritmo na Equação 2.42 é conhecida com quociente da reação. Na situação de equilíbrio químico, além de  $\Delta G = 0$ , conforme mostra o gráfico da Figura 8, o quociente da reação é a própria constante de equilíbrio ( $K$ ) e, dessa forma, podemos reescrever a Equação 2.42 da seguinte forma:

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K). \quad 2.43$$

Além de evidenciar a origem termodinâmica do equilíbrio químico, a Equação 2.43 pode ser substituída na Equação 2.31, escrita em termos de parâmetros padrões ( $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0$ ), para obtermos outra equação que é fundamental na avaliação do perfil termodinâmico das interações intermoleculares:

$$\ln K = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad 2.44$$

A Equação 2.44 é conhecida com equação de van't Hoff e é amplamente utilizada para estimar a entalpia e a entropia de uma reação/interação. A inclinação de um gráfico linear de  $\ln K$  em função de  $1/T$  fornece  $-\Delta H^0/R$  enquanto o intercepto está associado com  $\Delta S^0/R$ . De posse de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  podemos ainda obter  $\Delta G^0$  pela definição 2.31.

A equação linear de van't Hoff (Eq. 2.44) está baseada no pressuposto de que a entalpia e a entropia são independentes da temperatura. No entanto, em diversas situações, esses parâmetros são dramaticamente dependentes da temperatura e nesses casos um gráfico de  $\ln K$  em função de  $1/T$ , obviamente, não apresenta um perfil linear. Quando as mudanças da entalpia e entropia com a temperatura não podem ser negligenciadas, a dependência de  $\ln K$  com  $1/T$  pode ser aproximada pela expressão polinomial [50]:

$$\ln K = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} + \frac{d}{T^3} + \dots \quad 2.45$$

Fazendo a variação da equação 2.43 em relação à temperatura e usando a Equação 2.31 (assumindo que  $\Delta H$  e  $\Delta G$  dependem da temperatura) temos:

$$\frac{\partial}{\partial T}(\ln(K)) = \frac{\partial}{\partial T} \left[ -\frac{1}{RT} (\Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0) \right] \quad 2.46$$

$$\frac{\partial}{\partial T}(\ln(K)) = \frac{\Delta H^0}{RT^2} + \dots \quad 2.47$$

Derivando também a equação 2.45 em relação à temperatura,

$$\frac{\partial}{\partial T}(\ln K) = \frac{\partial \ln K}{\partial(1/T)} \frac{\partial(1/T)}{\partial(T)} = -\frac{1}{T^2} \left[ b + 2c\left(\frac{1}{T}\right) + 3d\left(\frac{1}{T}\right)^2 + \dots \right] \quad 2.48$$

Utilizando as equações 2.47 e 2.48 e preservando termos até a ordem  $\frac{1}{T^2}$ , a dependência da entalpia, e da entropia com a temperatura pode ser escrita da seguinte forma:

$$\Delta H^0 = -R \left( b + \frac{2c}{T} \right) \quad 2.49$$

$$\Delta S^0 = R \left( a - \frac{c}{T^2} \right) \quad 2.50$$

Na prática, a constante de equilíbrio de uma interação intermolecular pode ser obtida, em função da temperatura, por meio da técnica de supressão de fluorescência, conforme apresentado na seção 2.6. De posse dessas constantes, os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  são obtidos a partir de ajustes dos pontos experimentais dos *plots* de van't Hoff pela Equação 2.45 e a entalpia e entropia são calculadas, obviamente, pelas Equações 2.49 e 2.50.

## 2.9. Transferência de energia ressonante de Förster

Förster detalhou a sua teoria sobre transferência de energia ressonante (*Förster resonance energy transfer* – FRET) em três artigos publicados em 1946 [51], 1948 [52], 1949 [53] e outras duas revisões publicadas em 1959 [54] e 1965 [55]. Dentre esses cinco trabalhos destacam-se três: os publicados em 1946 e 1959 que apresentam uma descrição muito clara das idéias

essenciais sobre as quais a teoria se baseia, enquanto que seu artigo de 1948 é um tratamento matemático rigoroso da teoria.

Obviamente, Förster baseou-se em trabalhos de diversos pesquisadores importantes para construir a sua teoria, dentre os quais se destacam J. Perrin e F. Perrin, pai e filho, Cario, Franck, Kallmann, Oppenheimer e Arnold. No entanto, a inovação mais importante de Förster foi incorporar parâmetros obtidos experimentalmente, como espectros de emissão e absorção, rendimento quântico e tempos de vida, em sua teoria, tornando-a irrefutável, acessível e extremamente útil.

A transferência de energia ressonante pode ocorrer entre uma molécula doadora no estado excitado e outra molécula receptora no estado fundamental se as seguintes condições forem atendidas:

- 1) O doador e o receptor devem ter transições eletrônicas fortes no UV, visível ou IV;
- 2) Deve existir sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorbância do receptor;
- 3) Tipicamente, as distâncias entre o doador e o receptor devem estar na faixa 1 – 10 nm.

O fenômeno de FRET pode ser explicado tanto pela Eletrodinâmica Clássica quanto pela Eletrodinâmica Quântica, no entanto, faremos a abordagem clássica dos aspectos principais dessa teoria.

Portanto, de acordo com um modelo clássico, o doador e o receptor podem ser representados por duas esferas de raios  $R_D$  e  $R_R$  respectivamente, contendo cargas positivas e negativas que estabelecem dois pólos com cargas elétricas opostas, conforme a Figura 9a. Neste modelo, estamos assumindo que a distância  $r_{DR}$  entre o doador e o receptor obedece à condição  $r_{DR} \gg R_D, R_R$ . Dessa forma, podemos considerar a interação entre o doador e o receptor com

uma interação dipolo-dipolo, conforme ilustra a Figura 9b. Deve ser ainda enfatizado que os dipolos do doador e receptor são dipolos oscilantes.

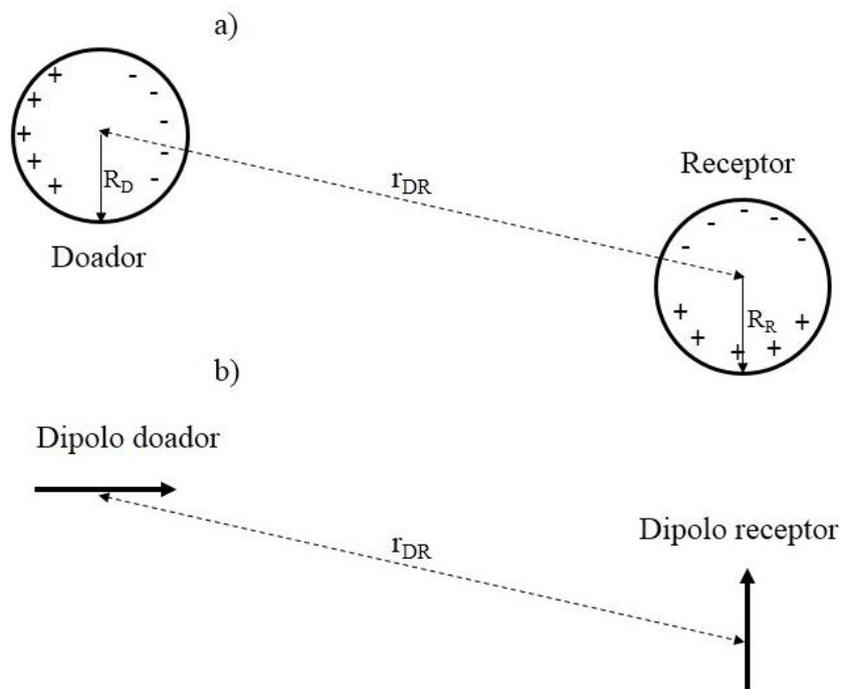


Figura 9: representação esquemática dos dipolos elétricos oscilante doador e receptor. Adaptado de [56]

De forma mais detalhada, tanto a molécula doadora quanto a receptora serão consideradas como um grupo de osciladores elétricos acoplados, sendo que, cada oscilador consiste de um elétron, de massa  $m_e$ , elasticamente ligado um núcleo estacionário.

Podemos escrever o campo elétrico, referente a um oscilador elétrico na molécula doadora da seguinte forma:

$$E_x = E_D \cos(2\pi\nu_D t) \quad 2.51$$

em que, o campo elétrico está arbitrariamente na direção  $x$  e  $\nu_D$  é a frequência natural do doador dada por:

$$v_D = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_e}} \quad 2.52$$

Assumindo que, em resposta ao campo elétrico do doador, o receptor oscile elasticamente em ressonância com doador; podemos escrever a equação de movimento referente ao receptor da seguinte forma:

$$m_e \ddot{x}(t) + kx(t) = q_e E_D \cos(2\pi v_D t) \quad 2.53$$

onde a constante  $k$  é dada por:

$$k = 4\pi^2 v_R^2 m_e \quad 2.54$$

Fazendo as mudanças de variáveis  $u \equiv 2\pi v_R$  e  $w \equiv 2\pi v_D$ , a Equação 2.53 fica da seguinte forma:

$$\ddot{x}(t) + u^2 x(t) = \frac{q_e E_D}{m_e} \cos(wt) \quad 2.55$$

Aplicando as técnicas corriqueiras de soluções de equações diferenciais, é fácil mostrar que a solução dessa equação diferencial é,

$$x(t) = \frac{q_e E_D}{m_e (u^2 - w^2)} [\cos(wt) - \cos(ut)] \quad 2.56$$

Podemos utilizar agora essa solução para obter uma expressão para a energia total  $W_R$  do receptor.

$$W_R = \frac{\overset{u^2 m_e}{\tilde{k}} x^2}{2} + \frac{m_e \dot{x}^2}{2} \quad 2.57$$

$$W_R = \frac{q_e^2 E_D t^2}{8m_e} \left[ \frac{4u^2}{(w^2 - u^2)t^2} \right] \left\{ [\cos(wt) - \cos(ut)]^2 + \left[ \frac{w}{u} \sin(wt) - \sin(ut) \right]^2 \right\} \quad 2.58$$

A Equação 2.58 pode ser reescrita para uma diferença muito pequena entre as frequências do doador e do receptor. Matematicamente, essa ligeira diferença ( $\varepsilon$ ) pode ser dada por  $w = u \pm \varepsilon$  onde  $\varepsilon \ll \pi/t$ . Dessa forma, após algumas manipulações algébricas, o termo entre colchetes na Equação 2.58 fica aproximado por  $1/(\varepsilon)^2$  enquanto que o termo entre chaves resulta em  $(\varepsilon t)^2$ , de tal maneira que a energia total do receptor fica:

$$W_R = \frac{q_e^2 E_D^2 t^2}{8m_e} \quad 2.59$$

Podemos agora usar a expressão para o campo elétrico de um dipolo oscilante, obtida da eletrodinâmica clássica, para escrever o campo elétrico do doador na posição do receptor, conforme a Figura 10.

$$\vec{E} = \frac{q_e D_D [3(\hat{d} \cdot \hat{r})\hat{r} - \hat{d}]}{4\pi\epsilon_0 n^2 r_{DR}^3} \cos(2\pi\nu_D t) \quad 2.60$$

onde  $D_D$  é a separação das cargas no dipolo doador e  $n$  é o índice de refração do meio.

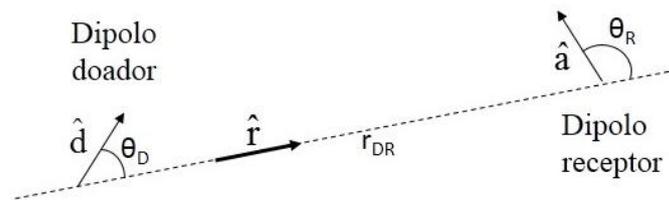


Figura 10: dipolos doador e receptor evidenciando suas orientações.

Projetando o campo elétrico do doador (Eq. 2.60) na direção do receptor e definindo  $\kappa = \hat{d} \cdot \hat{a} - 3(\hat{d} \cdot \hat{r})(\hat{r} \cdot \hat{a})$  como um fator associado à orientação relativa entre os dipolos, temos,

$$\vec{E} \cdot \hat{a} = \frac{q_e D_D \left[ 3(\hat{d} \cdot \hat{r})(\hat{r} \cdot \hat{a}) \hat{d} \cdot \hat{a} - \hat{d} \cdot \hat{a} \right] \cos(2\pi\nu_D)}{4\pi\epsilon_0 n^2 r_{DR}^3} \quad 2.61$$

$$\vec{E} \cdot \hat{a} = -\frac{q_e D_D \kappa \cos(2\pi\nu_D)}{4\pi\epsilon_0 n^2 r_{DR}^3} \quad 2.62$$

Dessa forma, comparando a Equação 2.62 com a Equação 2.51, fica claro que  $E_D = -q_e D_D \kappa / 4\pi\epsilon_0 n^2 r_{DR}^3$ . Substituindo esse resultado na Equação 2.59 temos,

$$W_R = \frac{q_e^2 \cdot t^2}{8m_e} \cdot \left[ \frac{q_e D_D \kappa}{4\pi\epsilon_0 n^2 r_{DR}^3} \right]^2 \quad 2.63$$

Por outro lado, podemos usar a energia de oscilação do doador  $W_D$  para substituir  $D_D$  na Equação 2.63 da seguinte forma,

$$W_D = \frac{kD_D^2}{2} = \frac{4\pi^2 m_e \nu^2 D_D^2}{2}, \nu \equiv \nu_R = \nu_D \quad 2.64$$

$$D_D^2 = \frac{W_D}{2\pi^2 m_e \nu^2} \quad 2.65$$

$$W_R = \frac{q_e^4 \kappa^2 W_D t^2}{16\pi^2 m_e^2 n^4 r_{DR}^6 (4\pi\epsilon_0)^2} \cdot \frac{1}{\nu^2} \quad 2.66$$

Definindo a taxa de transferência de energia com  $k_T = (W_R / W_D) \cdot 1/t$ , a Equação 2.66 resulta em,

$$k_T = \frac{q_e^4 \kappa^2 t}{16\pi^2 m_e^2 n^4 r_{DR}^6} \cdot \frac{1}{(4\pi\epsilon_0)^2} \cdot \frac{1}{\nu^2} \quad 2.67$$

A taxa de transferência de energia ressonante dada pela Equação 2.67 deve ser ajustada para situações mais realistas, pois na prática, a transferência de energia ocorre para um espectro de frequências. Dessa forma, podemos definir as seguintes probabilidades:

- $f_D(\nu_1)$ : probabilidade de oscilação do dipolo na frequência  $\nu_1$  para o doador;
- $\frac{f_R(\nu_1)}{t}$ : probabilidade de oscilação do dipolo na frequência  $\nu_1$  para o receptor por unidade do tempo de vida de estado excitado do doador.

Podemos agora escrever a probabilidade de ocorrência desses dois eventos, simultaneamente, para um intervalo de frequências  $d\nu$ , da seguinte forma:

$$f_D(\nu) \cdot \frac{f_R(\nu)}{t} d\nu \quad 2.68$$

Reescrevendo a Equação 2.67 de acordo com essas considerações temos:

$$k_T = \frac{q_e^4 \kappa^2}{16\pi^2 m_e^2 n^4 r_{DR}^6} \cdot \frac{1}{(4\pi\epsilon_0)^2} \int_0^\infty \frac{f_D(\nu) \cdot f_R(\nu)}{\nu^2} d\nu \quad 2.69$$

Os parâmetros  $f_D(\nu_1)$  e  $f_R(\nu_1)$  podem ser relacionados com as medidas espectroscópicas de emissão fluorescente e absorbância respectivamente através de uma correspondência direta entre a eletrodinâmica clássica e a espectroscopia. A taxa de emissão fluorescente com frequência entre  $\nu$  e  $\nu + d\nu$  pode ser dada por:

$$\frac{\Phi_D W_D I_D(\nu)}{\tau_D} d\nu \quad 2.70$$

onde  $\Phi_D$  é o rendimento quântico de fluorescência do doador,  $I_D(\nu)$  é a intensidade de emissão fluorescente normalizada e  $\tau_D$  é o tempo de vida de fluorescência.

Por outro lado, essa mesma taxa na teoria eletromagnética clássica é dada por:

$$\frac{8\pi^2 n \nu^2 q_e^2 W_D}{3(4\pi\epsilon_0) m_e c^3} f_D(\nu) d\nu \quad 2.71$$

de tal maneira que podemos fazer a seguinte correspondência:

$$f_D(\nu) = \frac{3(4\pi\epsilon_0) m_e c^3 \Phi_D}{8\pi^2 n \nu^2 q_e^2 \tau_D} I_D(\nu) \quad 2.72$$

Podemos agora definir a densidade de energia  $\sigma(\nu)$  incidente numa amostra de concentração  $c_R$  e obter a densidade absorvida após a incidência em uma seção transversal de  $1 \text{ cm}^2$  ao longo de um caminho óptico  $\ell$  da seguinte forma:

$$\sigma(\nu) - \sigma(\nu) \cdot 10^{-\epsilon_R c_R \ell} = \sigma(\nu) \ln(10) \epsilon_R c_R \ell \quad 2.73$$

O comprimento de um feixe de luz que atravessa a amostra durante um intervalo de tempo de 1 s pode ser dado por  $(c/n) \cdot 1 \text{ s} = c/n$ , enquanto que o volume sob o qual ocorre a absorção em uma área de incidência de seção transversal de  $1 \text{ cm}^2$  é  $(c/n) \cdot 1 \text{ cm}^2 = c/n$ . Dessa forma, utilizando a Equação 2.73, a energia absorvida por segundo por receptor com frequência entre  $\nu$  e  $\nu + d\nu$  é dada por,

$$\left(\frac{c}{n}\right) \cdot \frac{\sigma(\nu) \ln(10) \varepsilon_R c_R \ell}{N \ell c_R} d\nu = \frac{\ln(10) \cdot c \cdot \sigma(\nu) \cdot \varepsilon_R}{nN} d\nu \quad 2.74$$

onde  $N$  é o número de Avogadro em *milimol*.

Esse mesmo resultado obtido pela teoria eletromagnética clássica é dado por,

$$\frac{\pi \cdot q_e^2 \cdot \sigma(\nu)}{3n^2 (4\pi\varepsilon_0) m_e} f_R(\nu) d\nu \quad 2.75$$

de tal maneira que podemos fazer a correspondência entre  $f_R(\nu)$  e  $\varepsilon_R(\nu)$  da seguinte forma:

$$f_R(\nu) = \frac{3 \ln(10) (4\pi\varepsilon_0) \cdot n \cdot m_e \cdot c}{\pi \cdot q_e^2 N} \cdot \varepsilon_R(\nu) \quad 2.76$$

Agora, podemos substituir as Equações 2.76 e 2.72 na Equação 2.69 para obtermos uma expressão para a taxa de transferência de energia em termos dos parâmetros espectroscópicos  $I_D(\nu)$  e  $\varepsilon_D(\nu)$ :

$$k_T = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N \tau_D r_{RD}^6} \int_0^\infty \frac{c^4 \cdot I_D(\nu) \cdot \varepsilon_R}{\nu^4} d\nu \quad 2.77$$

Definindo a distância de Förster  $R_0$  como:

$$R_0^6 = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N} \int_0^\infty \frac{c^4 \cdot I_D(\nu) \cdot \varepsilon_R}{\nu^4} d\nu \quad 2.78$$

ou em termos de comprimento de onda,

$$R_0^6 = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 n^4 N} \int_0^\infty \lambda^4 \cdot I_D(\nu) \cdot \varepsilon_R d\nu \quad 2.79$$

a Equação 2.77 resulta em,

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r_{RD}} \right)^6 \quad 2.80$$

Podemos ainda definir a eficiência de transferência de energia ressonante de Förster com  $E = k_T / (k_T + \tau_D^{-1})$ , que também pode ser escrita em termos da distância de Förster:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{RD}^6} \quad 2.81$$

A Equação 2.81 mostra que a distância de Förster  $R_0$  é a distância entre o doador e o receptor para a qual 50% da energia do doador é transferida por FRET. Além disso, essa equação pode ser utilizada para se obter a distância entre o doador e o receptor  $r_{RD}$ , se os valores de eficiência de transferência de energia e distância de Förster forem conhecidos. Tanto a eficiência de transferência de energia quanto a distância de Förster podem ser obtidas experimentalmente por técnicas espectroscópicas [35]. É importante ressaltar também que no cálculo da distância de Förster (Eq. 2.81) geralmente se considera o valor médio de  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  para orientações completamente aleatórias entre os dipolos elétricos [57].

A teoria de transferência de energia de Förster tem sido amplamente empregada em estudos de fluorescência de biomoléculas [58]–[60], pois as distâncias favoráveis para ocorrência de transferência de energia é tipicamente do tamanho de uma proteína. Neste tipo

de aplicação, as distâncias entre o doador e o receptor são calculadas e, assim, são obtidas informações estruturais sobre a macromolécula.

# Capítulo 3 : Interação de porfirinas hidrossolúveis com anticorpos e albumina de soro bovino

## 3.1. Interações com anticorpos e albuminas

Neste capítulo estão apresentados os estudos de interação das porfirinas *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil) (TPPS<sub>4</sub>) e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil) (TMPyP) com duas biomoléculas proteicas que desempenham um vasto conjunto de funções no organismo: os anticorpos e as albuminas.

As proteínas do soro sanguíneo são divididas em albuminas e globulinas. As albuminas são os principais componentes proteicos do soro do sangue. Essas proteínas desempenham, essencialmente, a função de transporte de diversos tipos de moléculas pelo sangue. Uma albumina muito utilizada para mimetizar a albumina de soro humano (*Human serum albumin* - HSA) é a albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* - BSA), que é ~88% homóloga em sequências de aminoácidos à HSA. A versatilidade de ligação da BSA com diversos tipos de moléculas atribui a ela um papel importante no processo de transporte de medicamentos pelo organismo [61]. Dessa forma, os estudos de ligação de fármacos à BSA tem se tornado um importante campo de pesquisa em Física, Química e Ciências da Vida.

Os conjugados de albuminas séricas tem sido utilizados para administrar medicamentos antineoplásicos. A eficácia de fármacos anticancerígenos acoplados a albumina foi estabelecida clinicamente por dois fármacos: doxorubicina (Rubidox®) [62] e paclitaxel (Abraxane®) [63]. O fármaco paclitaxel é composto de nanopartículas encapsuladas com HSA. Recentemente outros compostos metálicos (por exemplo Pt, Ru, Os) funcionalizados por HSA foram desenvolvidos para a terapia contra o câncer, mostrando que a HSA desempenha um papel fundamental no aumento da atividade anticancerígena [64]–[67]. Tem sido relatado também,

em artigos recentes, um aumento na eficácia da PDT anticâncer devido a uma melhor seletividade de moléculas fotossensibilizadoras acopladas a nanopartículas recobertas com albumina [68], [69].

Os anticorpos são encontrados no grupo das globulinas juntamente com as lipoproteínas (proteínas responsáveis pelo transporte de lipídeos). Os anticorpos também são denominados Imunoglobulinas (Ig), ressaltando a função que eles desempenham no sistema imunológico [70]. Os anticorpos atuam no organismo, principalmente, como sinalizadores de agentes estranhos às células do sistema imune. O reconhecimento desses agentes ocorre de forma muito eficaz, pois os anticorpos são capazes de aderir a alvos específicos com elevada precisão. Essa especificidade tem sido empregada em muitos sistemas onde os anticorpos atuam com carreadores de fármacos. Alguns trabalhos têm investigado, por exemplo, a viabilidade do acoplamento de fotossensibilizadores a anticorpos ou fragmentos de anticorpos específicos contra receptores de células tumorais [6], [71]. Esse acoplamento pode ajudar a resolver o problema da inespecificidade de algumas moléculas fotossensibilizadoras para alvos desejados, de forma que, ao serem transportados, os fotossensibilizadores, ficam aderidos apenas ao alvo, o que pode reduzir ou impedir os danos as células vizinhas, diminuindo assim seus efeitos colaterais. Existem também muitos estudos *in vivo* que vêm comprovando o aumento da seletividade da ação fotodinâmica de moléculas fotossensíveis, na PDT anticâncer, quando acopladas com anticorpos [72]–[74].

### 3.2. *Meso*-porfirinas

A Figura 11 apresenta a estrutura molecular das porfirinas *meso*-tetrakis(*p*-sulfonatofenil) e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil) que foram utilizadas nos estudos apresentados neste capítulo.

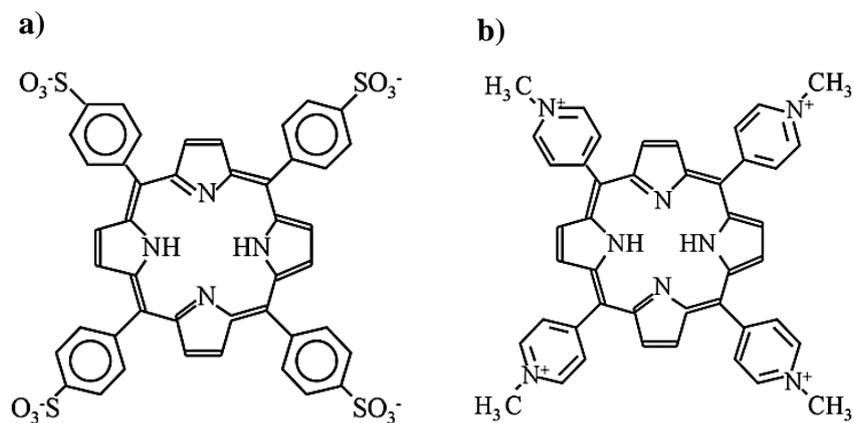


Figura 11: estruturas das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b).

A porfirina TPPS<sub>4</sub> (Figura 11a) é um composto aniônico, de origem sintética, com boa solubilidade em meio aquoso e que tem sido empregada com sucesso em terapia fotodinâmica contra o câncer e microrganismos [75], [76]. A TPPS<sub>4</sub> apresenta altos rendimentos quânticos de formação de estado tripleto ( $\varphi_T = 0,78$ ) [77] e de produção de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta} = 0,62$ ) [78], características importantes para os objetivos desse trabalho.

A porfirina TMPyP (Figura 11b) é catiônica e também apresenta boa solubilidade em meio fisiológico e ainda possui baixa tendência de agregação tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos [79]. Essa porfirina também apresenta alto rendimento quântico de formação de estados tripletos  $\varphi_T = 0,77$  [80] e de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta} = 0,74$ ) [81]. O potencial fotodinâmico da TMPyP tem sido aplicado com sucesso na inativação de fungos e outros micro-organismos, como bactérias Gram-negativas, onde a sua natureza catiônica é decisiva nesse processo [82], [83].

### 3.3. Materiais e Métodos

As porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP foram adquiridas da empresa *Porphyrin Products Inc.* A albumina de soro bovino (BSA) foi obtida da Sigma-Aldrich e utilizada como comprada. Os anticorpos foram selecionados e purificados pelo grupo do Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. As soluções

experimentais foram inicialmente preparadas em tampão fosfato (pH 7,4). As concentrações dos compostos foram determinadas espectroscopicamente utilizando os seguintes coeficientes de absorção molar:  $\epsilon_{422nm}^{TMPyP} = 2,3 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$  [84],  $\epsilon_{515nm}^{TPPS_4} = 1,3 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [85],  $\epsilon_{289nm}^{BSA} = 4,38 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [86] e  $\epsilon_{280nm}^{Ig} = 2,1 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$  [86].

Foi utilizada a técnica de supressão de fluorescência para avaliar as interações entre as proteínas e porfirinas em diferentes temperaturas e, dessa forma, obter as características termodinâmicas da ligação. Nas experiências de supressão de fluorescência, alíquotas de soluções estoques das porfirinas foram adicionadas a soluções de anticorpos e BSA com concentrações fixas. Os todos os espectros de fluorescência foram monitorados na faixa de 290 a 480 nm, com comprimento de onda de excitação  $\lambda_{exc} = 280$  nm. Todos os valores apresentados são médias, obtidas a partir de três experimentos independentes e todas as medidas de fluorescência foram corrigidas devido ao efeito de filtro interno. As medidas de absorção UV/Vis foram realizadas com um espectrofotômetro Hitachi U-2900 e as medidas de fluorescência em um Fluorímetro Hitachi F-7000. Foram empregadas cubetas de quartzo com quatro faces polidas e caminho óptico de 1 cm.

### 3.3.1 O efeito de filtro interno

A intensidade de fluorescência observada em uma amostra depende não somente da absorção no comprimento de onda de excitação, mas também da geometria de iluminação da amostra e dos caminhos ópticos percorridos pela luz na excitação e na emissão. A geometria comumente utilizada é a incidência de luz na face da cubeta sob um ângulo reto, geometria também empregada neste trabalho.

Considerando que a luz que excita a amostra é direcionada ao centro da cubeta, parte dessa luz é absorvida pela amostra ao longo do caminho óptico percorrido da face até o centro da cubeta. Da mesma forma, parte da luz que é emitida a partir do centro da amostra pode sofrer

absorção ao longo do caminho óptico do feixe de emissão (Figura 12). Essas atenuações que ocorrem na excitação e na emissão são conhecidas como efeito de filtro interno.

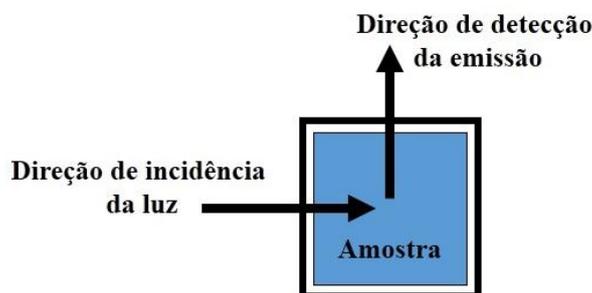


Figura 12: representação da luz incidindo sob um ângulo de  $90^\circ$  com a face da cubeta.

Sabendo disso, a intensidade de fluorescência pode ser corrigida ( $F_{corr}$ ) em termos da intensidade de fluorescência observada ( $F_{obs}$ ) através da relação [35], [87]:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{\left(\frac{A_{ex} \cdot l_{ex} + A_{em} \cdot l_{em}}{2}\right)} \quad 3.1$$

Nessa equação,  $A_{ex}$  é a absorvância no comprimento de onda de excitação,  $l_{ex}$  é o caminho óptico ao longo da direção de excitação enquanto que  $A_{em}$  e  $l_{em}$  são os respectivos parâmetros para a emissão. A Equação 3.1 não é adequada para amostras muito concentradas, porém ela é apropriada para os valores de concentrações utilizados neste trabalho. Existem alternativas mais sofisticadas de correções de filtro interno quando não é possível trabalhar nos limites de validade da Equação 3.1, isto é, baixa concentração ou caminho óptico curto [88].

### 3.4. Resultados e discussões

#### 3.4.1 Supressão da fluorescência intrínseca da BSA pelas porfirinas TMPyP e TPPS<sub>4</sub>

As características de absorção e emissão intrínseca das proteínas são devidas a três tipos de resíduos de aminoácidos aromáticos: tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe).

Quando excitamos as proteínas em  $\lambda_{exc}=280$  nm, que foi o comprimento de onda de excitação utilizado neste trabalho, a emissão observada é devida principalmente aos resíduos de triptofano, pois além de possuir maior absorção em 280 nm, o seu rendimento quântico de fluorescência também é muito maior que os rendimentos quânticos de fluorescência dos resíduos Tyr e Phe [35]. A Figura 13 apresenta as supressões da fluorescência intrínseca da proteína BSA pelas porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP à temperatura ambiente.

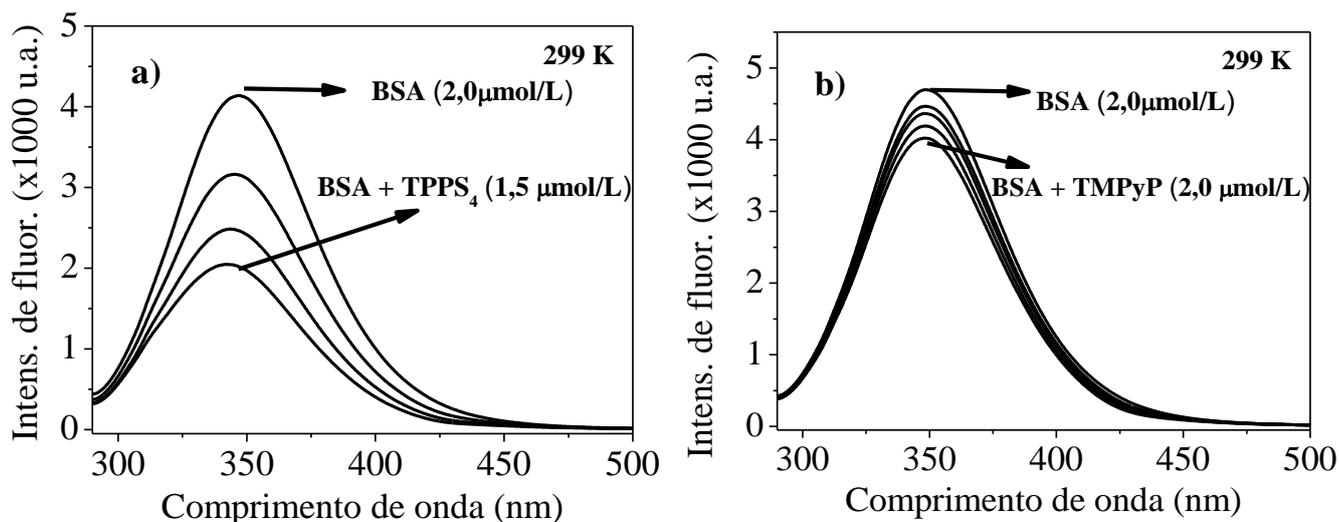


Figura 13: supressão da fluorescência ( $\lambda_{exc}=280$  nm) da BSA com o aumento das concentrações das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b) em temperatura ambiente.

As emissões decrescem continuamente com a adição das porfirinas sem qualquer alteração significativa no perfil espectral. Foram realizadas, adicionalmente, as supressões de fluorescência da proteína BSA nas temperaturas de 293 K, 304 K, 309 K e 313 K (não mostrado) e também não foram observadas mudanças nos perfis dos espectros. Isso sugere que não há alterações na conformação da macromoléculas protéica; o ambiente (polaridade) nas proximidades dos resíduos fluorescentes permanece praticamente inalterado na presença de várias concentrações de TMPyP e TPPS<sub>4</sub> [89].

Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da proteína BSA pelas porfirinas, em diferentes temperaturas, apresentados na Figura 14, mostram um perfil linear.

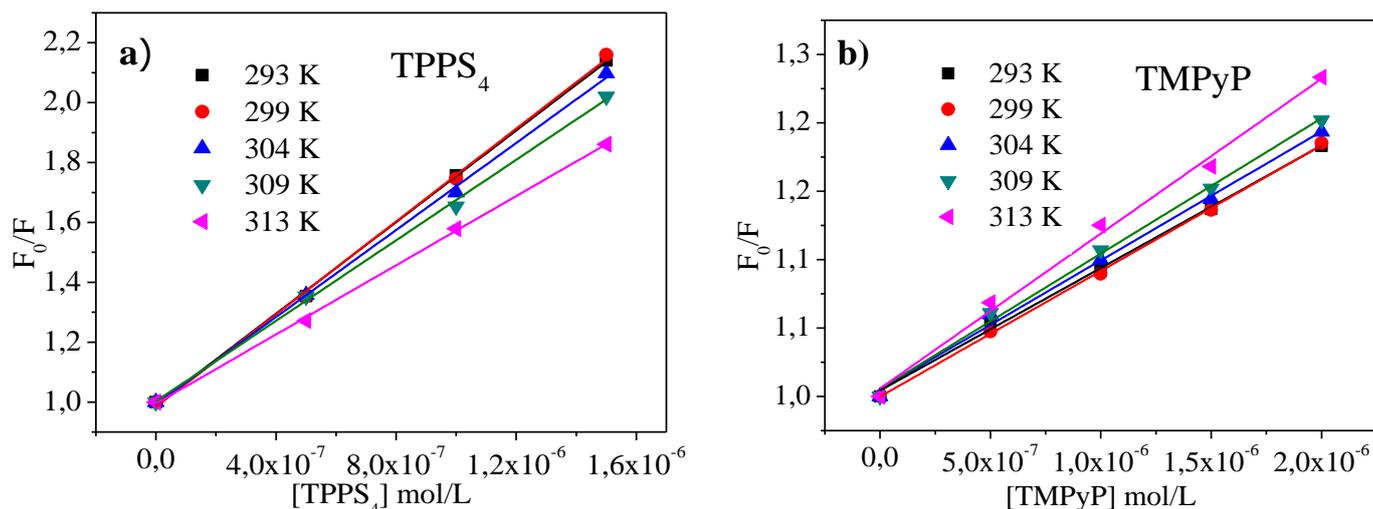


Figura 14: gráficos de Stern-Volmer para as supressões de fluorescência da albumina por TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b).

Os gráficos de Stern-Volmer para a albumina, apresentados na Figura 14a e 14b, foram ajustados pela Equação 2.18, e os valores da constante de supressão estão apresentados na Tabela 1. Como foi discutido na Seção 2.6, o comportamento da constante de supressão com a temperatura indica o tipo de mecanismo de supressão que pode estar ocorrendo (estática ou dinâmica). Na Tabela 1, os valores de  $K$  para a TMPyP crescem com o aumento da temperatura enquanto que para a TPPS<sub>4</sub> diminuem, indicando, dessa forma, que o mecanismo de supressão é dinâmico para a TMPyP e estático para a TPPS<sub>4</sub>.

Apesar da incrível versatilidade de ligação da albumina com diversos tipos de estruturas, essa biomolécula carreadora não adsorve moléculas aleatoriamente à sua superfície. Ao invés disso, existem sítios de ligação altamente específicos para uma variedade de tipos moleculares [90]. A estrutura da BSA apresentada na Figura 15 mostra três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados como A e B. A albumina bovina possui dois fragmentos de triptofano denominados Trp-134 e Trp-212, localizados nos subdomínios IA e IIA, respectivamente, como mostrado na Figura 15. A maioria dos compostos transportados pela BSA se liga em sítios

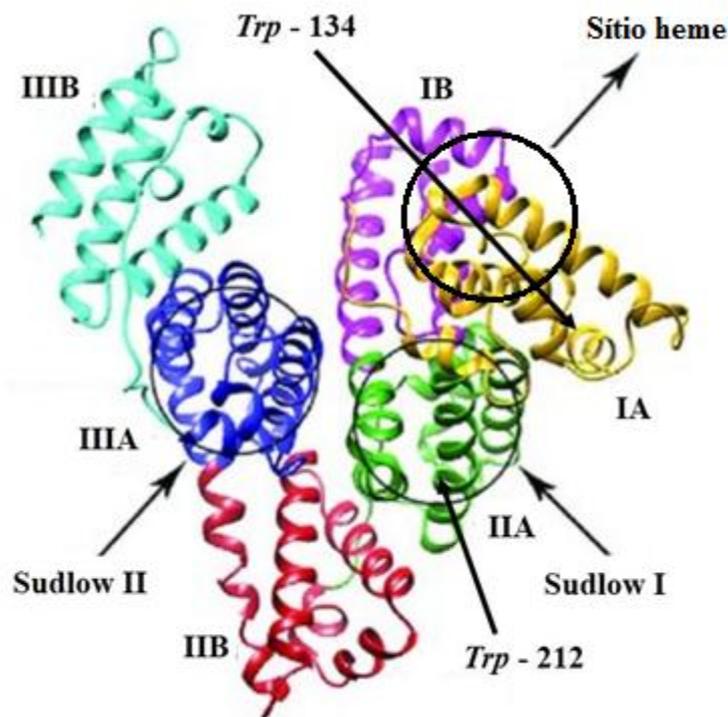
dentro dos subdomínios IB, IIA e IIIA, conhecidos como sítio heme, sítios I e II de Sudlow respectivamente [91].

*Tabela 1: parâmetros da interação entre TMPyP e TPPS<sub>4</sub> com BSA: constante de supressão K, variação da energia livre de Gibbs  $\Delta G$ , variação da entalpia  $\Delta H$ , variação da entropia e distância doador-receptor  $r_{RD}$ .*

<i>T (K)</i>					
TMPyP					
	$K/10^4$ (L/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol.K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol.K)	$r_{RD}$ (Å)
293	8,96	-27,8	-1,54	0,089	11,2
298	9,19	-28,3	3,28	0,105	11,2
303	9,42	-28,9	7,94	0,121	11,3
308	9,89	-29,5	12,45	0,136	10,8
313	11,1	-30,2	16,82	0,150	11,1
<i>T (K)</i>					
TPPS <sub>4</sub>					
	$K/10^5$ (L/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol.K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol.K)	$r_{RD}$ (Å)
293	7,61	-33,0	7,13	0,136	7,9
298	7,70	-33,6	-2,01	0,106	8,2
303	7,33	-34,1	-10,8	0,076	8,3
308	6,82	-34,4	-19,4	0,048	8,4
313	5,76	-34,6	-27,7	0,022	8,0

O sítio heme é o local de ligação para o grupo heme (protoporfirina IX), um composto envolvido no transporte de oxigênio pelo organismo. Por outro lado, o sítio I é identificado como o local de ligação de compostos heterocíclicos grandes, enquanto que o sítio II mostra preferência por ácidos carboxílicos aromáticos pequenos [90]. O sítio heme é uma cavidade hidrofóbica localizada próxima ao Trp-134 e o sítio I é uma arcabouço onde a distribuição dos resíduos de aminoácidos conduz a uma superfície hidrofóbica de um lado e a uma superfície carregada positivamente no outro [90]. Dessa forma, acreditamos que o sítio I de Sudlow pode ser o principal local de ligação para porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub>, pois este é um composto com carga compatível para esse sítio e, além disso, a supressão de fluorescência promovida por essa porfirina pode estar diretamente relacionada ao Trp-212, localizado no sítio I de Sudlow. Em

um estudo detalhado, utilizando técnicas espectroscópicas, Andrade e colaboradores apresentaram resultados que indicam que o sítio I é o local de ligação da porfirina TPPS<sub>4</sub> à proteína HSA [93]. Além disso, outros trabalhos recentes também sugerem a interação de porfirinas aniônicas com a BSA através do sítio I [94], [95].



*Figura 15: representação da albumina de soro bovino (BSA), destacando a localização dos resíduos de triptofano.*

*Adaptado de [92].*

Quanto à porfirina catiônica TMPyP, acreditamos que o seu local de ligação na BSA não pode ser o sítio I, devido à sua carga positiva. Além disso, se essa porfirina também ocupasse o sítio I, não seria observada a evidente discrepância entre seus valores de constantes de supressão e os valores de  $K$  para a porfirina TPPS<sub>4</sub> (Tabela 1). Em um trabalho sobre a interação de uma porfirina catiônica com a proteína BSA, Chang-Qing e colaboradores mostraram que, de fato, existe um local de ligação para essa porfirina próximo ao Trp-134 [96]. Outros trabalhos recentes, também sugerem a ligação de porfirinas catiônicas em sítios mas próximos ao Trp-134, inclusive no sítio heme [20], [97], [98]. Dessa forma, acreditamos que a porfirina TMPyP

provavelmente ocupe o sítio heme no subdomínio IA, de tal maneira que, a sua distância ao Trp-134 seja maior que a distância entre a TPPS<sub>4</sub> e o Trp-212, resultando em uma menor eficiência de supressão, quando comparada com a TPPS<sub>4</sub>. No entanto, o evidente aumento da taxa de supressão com o aumento da temperatura (Tabela 1) para a porfirina TMPyP, ressalta a importância do mecanismo dinâmico na supressão, o que pode estar associado com as colisões entre as porfirinas livres na solução e a proteína, um vez que o Trp-134 se localiza na superfície da BSA e, dessa forma, pode ter a sua fluorescência suprimida também pelo mecanismo dinâmico.

Os gráficos de van't Hoff, que mostram a variação da constante de ligação com a temperatura para as interações das porfirinas com a BSA estão apresentados na Figura 16, e os parâmetros termodinâmicos obtidos através dos ajustes dos dados experimentais e das Equações 2.31, 2.45, 2.49 e 2.50, são mostrados na Tabela 1.

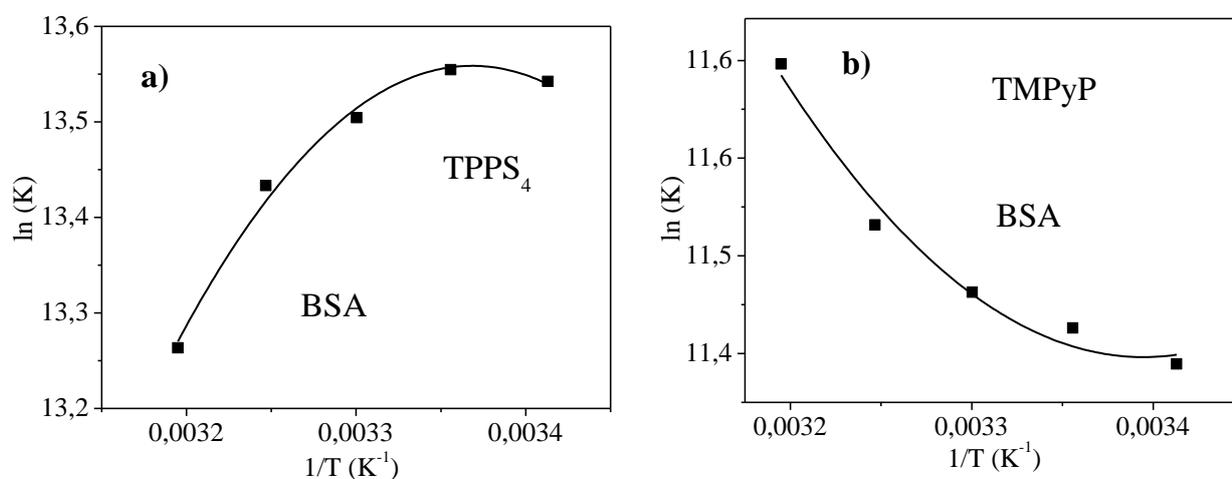


Figura 16: gráficos de van't Hoff para a ligação das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b) com a BSA.

Valores negativos para a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) indicam um processo de ligação espontâneo de ambas as porfirinas com a macromolécula protéica. Por outro lado, valores de  $\Delta S$  e  $\Delta H$ , ambos positivos, correspondem a um mecanismo hidrofóbico na interação proteína-ligante [47], enquanto que as interações eletrostáticas são caracterizadas por  $\Delta S$  positivo, juntamente com valores negativos de  $\Delta H$ .

Os parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 1 sugerem que a interação eletrostática desempenha um papel principal na ligação da TPPS<sub>4</sub> com a BSA, enquanto que a interação hidrofóbica parece ser a força predominante na ligação da TMPyP com a albumina. A interação eletrostática da porfirina TPPS<sub>4</sub> pode estar associada com a distribuição de carga dentro sítio I de Sudlow, onde uma das paredes internas desta cavidade possui carga predominantemente positiva. Interações eletrostática, tem sido observada em estudos de interação porfirinas aniônicas, inclusive a TPPS<sub>4</sub> [93], [94], [99]. Por outro lado, a interação hidrofóbica entre a porfirina TMPyP e a albumina deve ser investigada melhor por outras vias. Andrade e Costa relataram interações eletrostáticas e hidrofóbicas para as porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP respectivamente, em um trabalho sobre a interação dessas porfirinas com duas proteínas carreadoras do sangue (BSA e  $\beta$ LG) [99], no entanto, existem também relatos de interações eletrostáticas entre a porfirina catiônica e a BSA, o que parece ser mais intuitivo [97], [100].

De forma esquemática, a Figura 17 ilustra o processo de transferência de energia (FRET) e seu respectivo diagrama de Jablonski entre uma proteína e uma molécula receptora, decorrente da excitação dos resíduos de triptofanos da proteína.

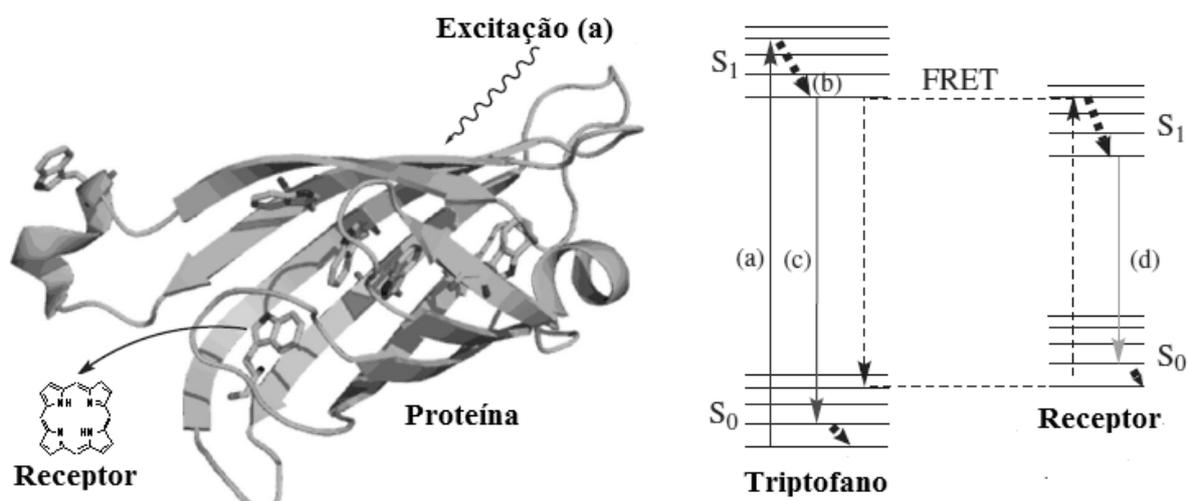


Figura 17: representação esquemática da excitação dos resíduos de triptofano (a), as relaxações vibracionais (b), emissão fluorescente do triptofano (c) e a emissão do receptor (d). Adaptado de [101].

No diagrama de níveis de energia da Figura 17 estão ilustrados os processos de absorção da luz pelo triptofano (a), as suas relaxações vibracionais (b) e emissão fluorescente (c). O diagrama evidencia também a necessária sobreposição entre os níveis de energia do doador e do receptor para que FRET ocorra e a emissão do receptor (d).

Como existe uma importante sobreposição entre o espectro de emissão da proteína e o espectro de absorção das porfirinas, a supressão pode estar associada ao mecanismo de FRET. A sobreposição entre os espectros de emissão do doador (BSA) e o espectro de absorção em termos de coeficiente de absorção molar do receptor (porfirinas), em temperatura ambiente, estão apresentadas na Figura 19. Os valores para a distância entre o doador e o receptor, calculados pela Equação 2.81, estão apresentados na Tabela 1.

De forma pictórica, a visão frontal da BSA pode ser representada por um triângulo equilátero de 8 nm de lado e 6,9 nm de altura enquanto que a sua espessura é de 3 nm conforme ilustrado na Figura 18 [102].

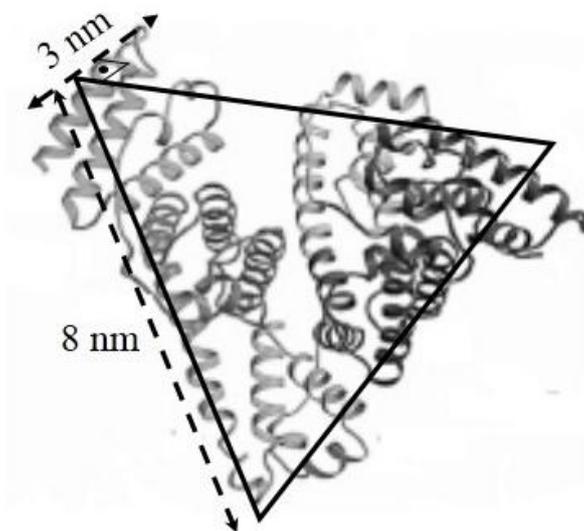


Figura 18: dimensões da BSA. Adaptado de [103]

Os valores de  $r_{RD}$  apresentados na Tabela 1 são compatíveis com as dimensões da BSA mostradas na Figura 18. Além disso, as distâncias  $r_{RD}$  para a porfirina TMPyP são ligeiramente maiores que os valores de  $r_{RD}$  para TPPS<sub>4</sub>. Este fato pode estar associado ao provável local de

ligação da TMPyP na BSA; onde a sua distância ao Trp-134 é maior que a distância entre a TPPS<sub>4</sub> e o Trp-212, conforme foi discutido previamente.

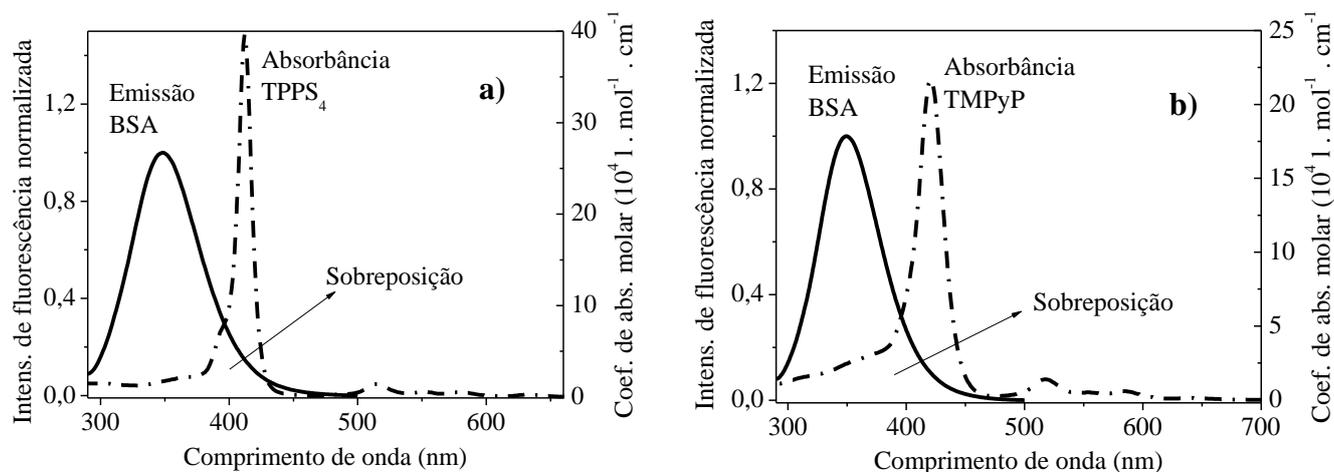


Figura 19: sobreposições espectrais entre a emissão da BSA e o espectro de absorção molar das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b).

### 3.4.2 Supressão da fluorescência intrínseca dos anticorpos pelas porfirinas TMPyP e TPPS<sub>4</sub>

A Figura 20 apresenta as supressões da fluorescência intrínseca dos anticorpos pelas porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP à temperatura ambiente.

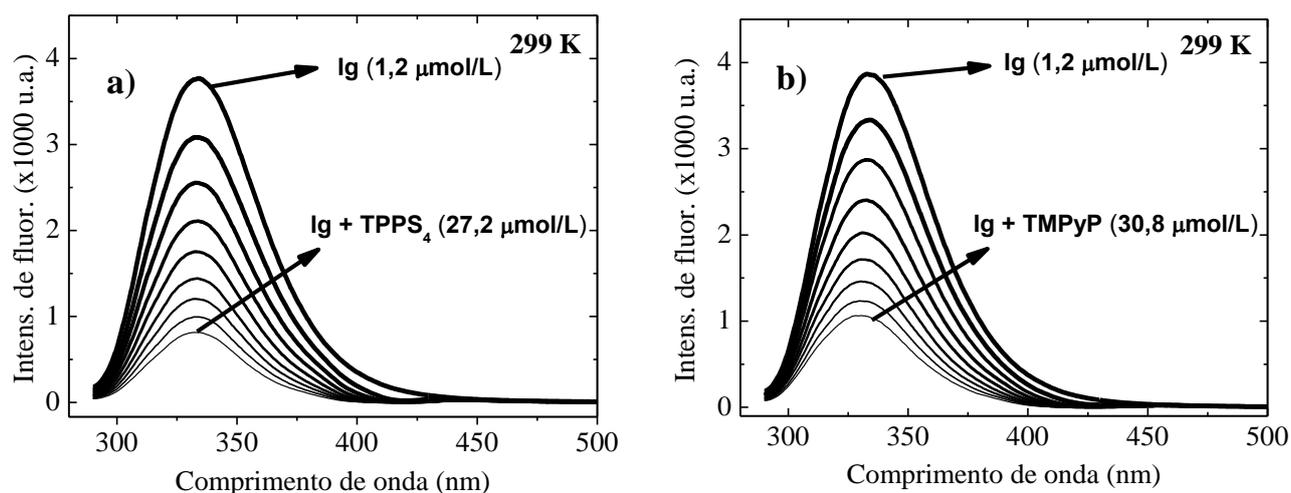


Figura 20: efeito do acréscimo das concentrações das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b) sobre a emissão ( $\lambda_{exc}=280$  nm) fluorescente da proteína Ig em temperatura ambiente.

As supressões de fluorescência não apresentam qualquer alteração no perfil espectral, sugerindo que também não há alterações na conformação dessa proteína na presença das porfirinas. Foram realizadas, adicionalmente, as supressões de fluorescência dessa proteína nas temperaturas de 293 K e 313 K (não mostrado) e também não foram observadas mudanças nos perfis dos espectros [89].

Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da proteína Ig, em diferentes temperaturas, apresentados na Figura 21, mostram um desvio de linearidade positivo.

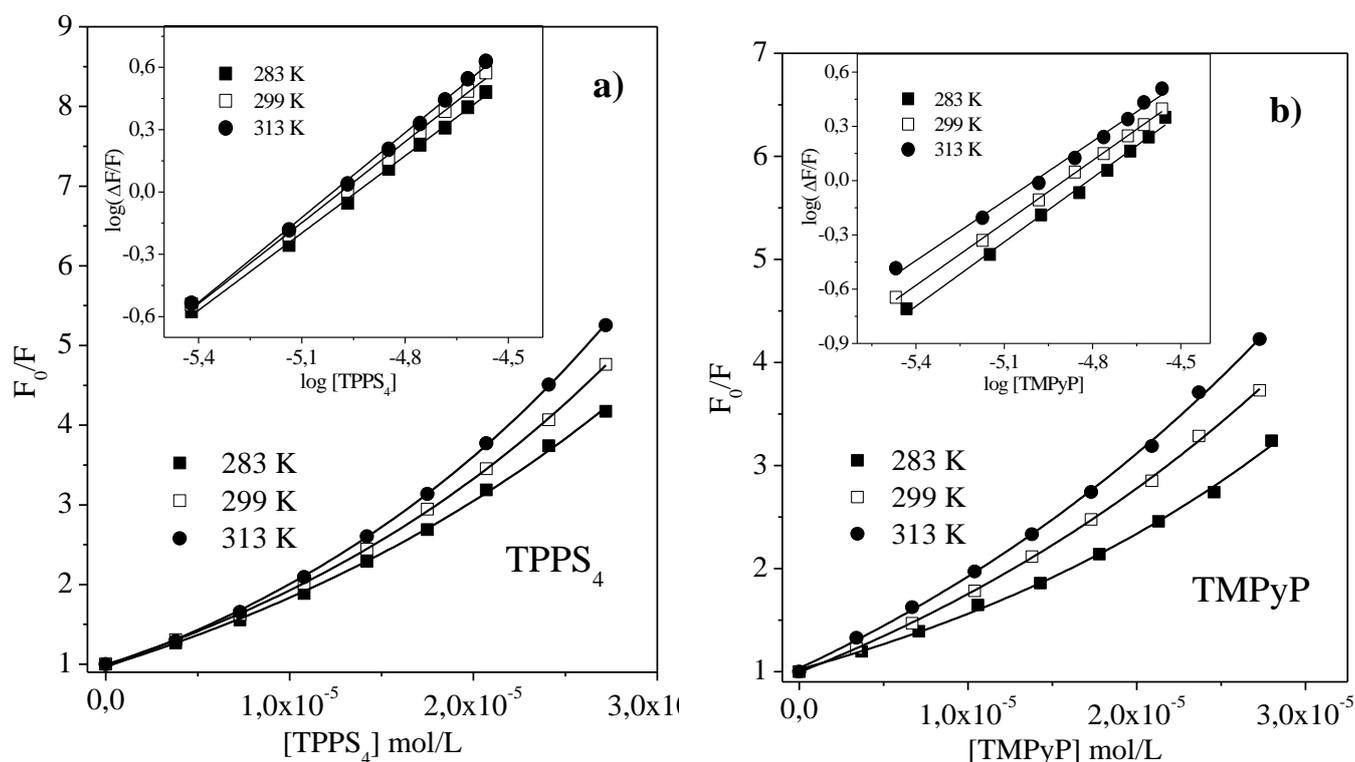


Figura 21: gráficos de Stern-Volmer para as supressões de fluorescência de Ig por TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b) com os respectivos gráficos de Hill-Langmuir (inset).

Em geral, para interpretar os dados de supressão de fluorescência, utiliza-se as equações 2.12 ou 2.18. Um gráfico linear de  $F_0/F$  versus  $[Q]$ , geralmente sugere que todas as moléculas fluorescentes são acessíveis aos supressores e apenas um mecanismo de supressão (estático ou dinâmico) ocorre, enquanto que, desvios de linearidade, como os mostrados na Figura 21, sugerem interações mais complexas. Esses desvios podem estar associados à ocorrência de ambos os mecanismos de supressão (estático e dinâmico) ou ainda indicar que a supressão é

devida a interações com estequiometria diferente de 1:1 [104], [105]. Se ambos os mecanismos são responsáveis pela supressão, é esperada uma curva de tendência polinomial quadrática para o gráfico de Stern-Volmer. De fato, não foi possível ajustar os dados experimentais referentes aos anticorpos, apresentados nas Figuras 21a e 21b, por um modelo quadrático, excluindo dessa forma, a possibilidade de ocorrência dos dois mecanismos simultaneamente. Por outro lado, os *insets* das Figuras 21a e 21b mostra que os dados de supressão de fluorescência foram ajustados pelo modelo de Hill-Langmuir (Eq. 2.25) sugerindo, dessa forma, que há mais de um sítio de ligação para as porfirinas nos anticorpos.

Os valores de  $K$  referentes à supressão da fluorescência das Ig pelas porfirinas, obtidos a partir ajuste dos gráficos de  $\log[(F_0 - F)/F]$  versus  $\log[Q]$  (*insets* das Figuras 21a e 21b) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: parâmetros da interação entre TMPyP e TPPS<sub>4</sub> com Ig.

T (K)					
TMPyP					
	$K/10^5$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ/mol.K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol.K)	$r_{RD}$ (Å)
283	4,90	-30,8	1,01	0,112	6,8
299	4,24	-32,2	-13,1	0,064	6,8
313	3,01	-32,8	-24,2	0,027	7,3
T (K)					
TPPS <sub>4</sub>					
	$K/10^6$ (M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ/mol.K)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol.K)	$r_{RD}$ (Å)
283	1,32	-33,1	32,6	0,23	5,8
299	3,04	-37,0	40,0	0,26	6,4
313	6,62	-40,8	45,9	0,28	6,0

Os valores de constante de ligação para as interações proteína-ligante são fortemente dependentes das concentrações e de fatores ambientais [1], por isso, a supressão de fluorescência da proteína Ig pelas duas porfirinas foram mantidas, praticamente, sob as mesmas

condições para viabilizar o confronto entre as afinidades. Os valores de  $K$  apresentados na Tabela 2 mostram que a porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> possui maior afinidade pelos anticorpos em comparação com a porfirina catiônica TMPyP. Além disso, a dependência dos valores de constante de ligação com a temperatura, apresentados na Tabela 2, mostra que o mecanismo de supressão da fluorescência de Ig pela porfirina TMPyP é estático, enquanto que para a porfirina TPPS<sub>4</sub> é dinâmico.

Os gráficos de van't Hoff para a ligação das porfirinas com Ig estão apresentados na Figura 22 e os parâmetros termodinâmicos obtidos dos ajustes, são mostrados na Tabela 2.

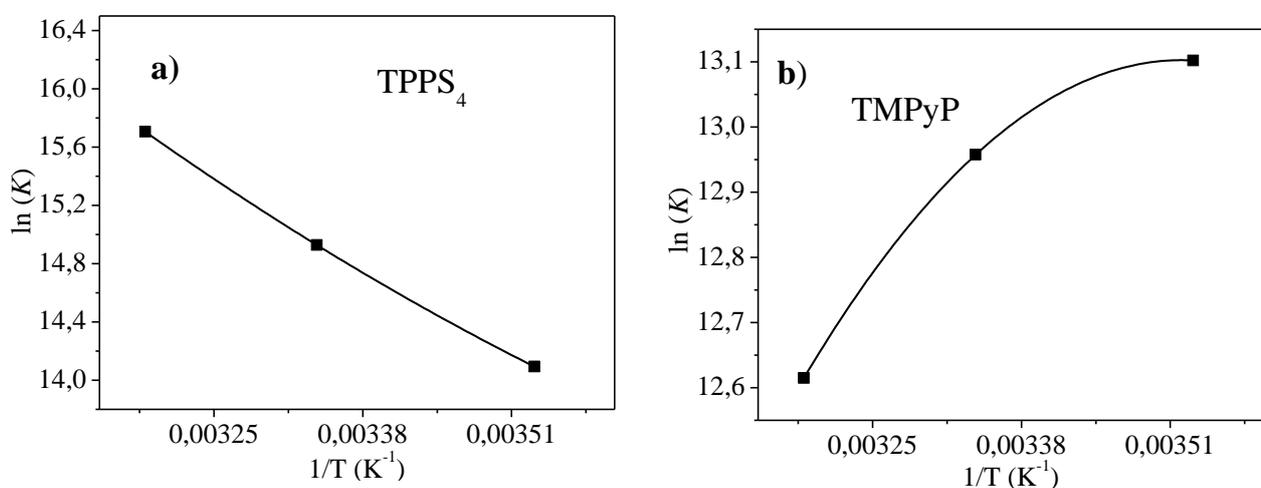


Figura 22: gráficos de van't Hoff para a ligação das porfirinas com Ig.

Não temos elementos suficientes para precisar o possível local de ligação das porfirinas nos anticorpos. Porém, as discrepâncias entre os valores de constante de ligação para as porfirinas TMPyP e TPPS<sub>4</sub>, apresentados na Tabela 2, indicam que essas moléculas ocupam locais distintos na proteína Ig. A porfirina TMPyP provavelmente, ocupa algum local com carga predominantemente negativa devido as interações eletrostáticas entre essa porfirina e os anticorpos. Tanto o perfil energético como os mecanismos de supressão (estático/dinâmico), para as interações Ig-porfirinas, apresentado na Tabela 2, é o oposto do observado para as interações BSA-porfirinas, apresentado na Tabela 1. Por outro lado, a porfirina TPPS<sub>4</sub> possui maior afinidade tanto pela BSA quanto pela Ig, apesar do perfil energético da interação TPPS<sub>4</sub>-

Ig sugerir que as forças hidrofóbicas são responsáveis por estabilizar esse complexo, o que necessita de um melhor investigação por outras vias.

A sobreposição entre os espectros de emissão do doador (Ig) e o espectro de absorção em termos de coeficiente de absorção molar das porfirinas, em temperatura ambiente, utilizada nos cálculos de FRET, estão apresentadas na Figura 23 e os valores de  $r_{RD}$  estão apresentados na Tabela 2.

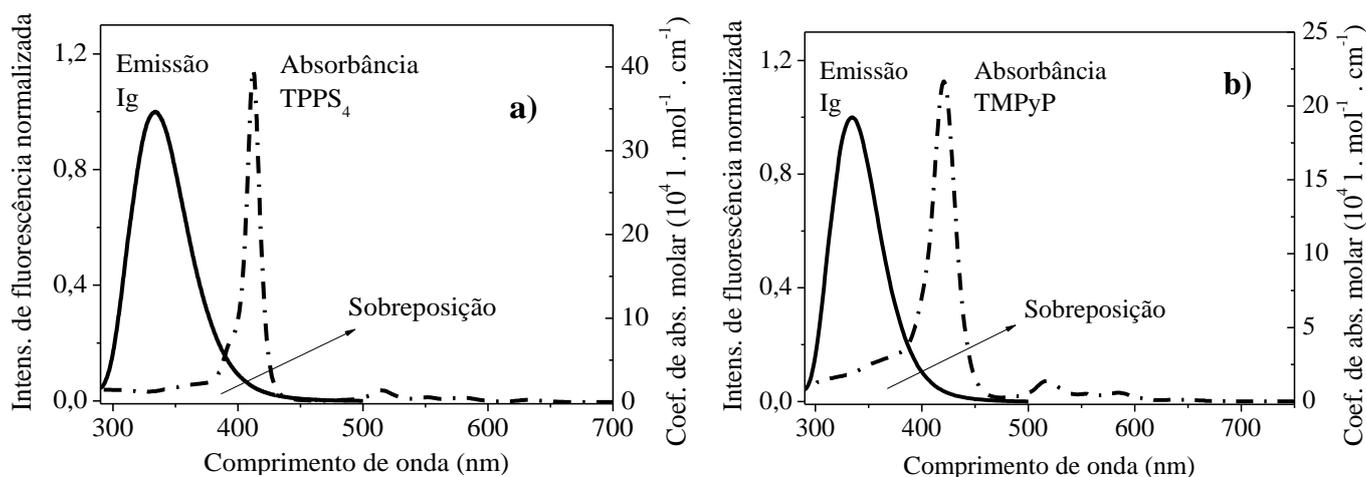
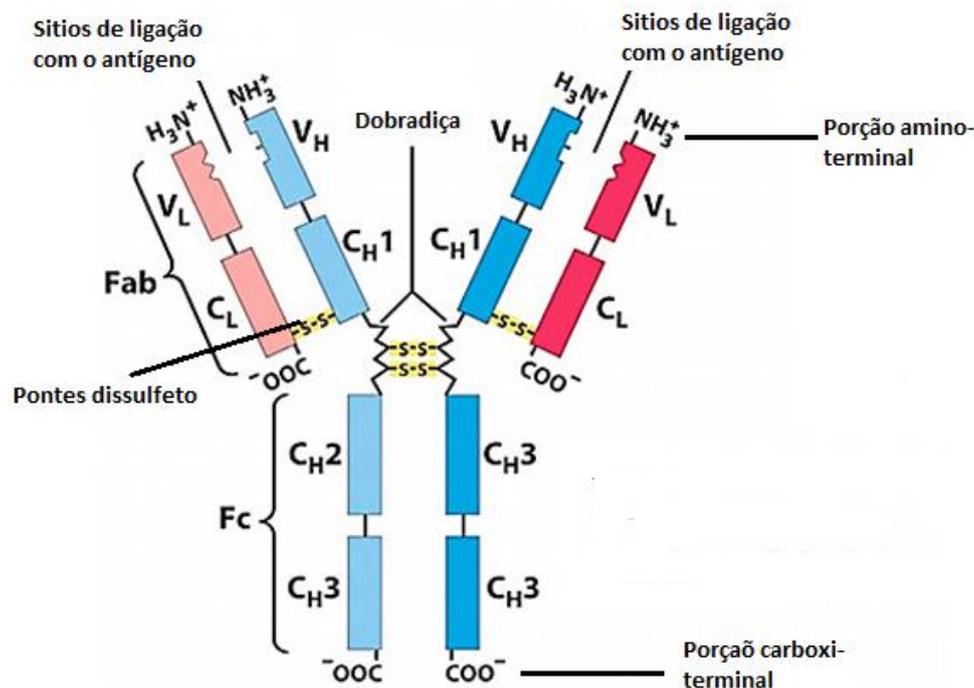


Figura 23: sobreposições espectrais entre a emissão da Ig e o espectro de absorção molar das porfirinas TPPS<sub>4</sub> a) e TMPyP b).

A Tabela 2 mostra que as distâncias  $r_{RD}$  entre os resíduos fluorescentes da proteína Ig e as duas porfirinas não possuem diferenças significativas. Por outro lado, o confronto dos valores de  $r_{RD}$  para a proteína Ig (Tabela 2) com os valores desse mesmo parâmetro para a BSA (Tabela 1) mostra que, de forma geral, a supressão dos resíduos fluorescentes dos anticorpos ocorre a uma distância menor, indicando que esses resíduos estão mais expostos às porfirinas. É importante ressaltar também que os valores de  $r_{RD}$  para os anticorpos são compatíveis com as dimensões típicas de uma Ig ( $\approx 10$  nm) [106].

A Figura 24 representa esquematicamente uma IgG que é o isótipo de anticorpo utilizado neste trabalho. Essa molécula é constituída por uma estrutura básica simétrica formada por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas também idênticas, onde, ao longo de toda a sua

estrutura existem unidades homólogas repetidas denominadas domínios do anticorpo. Tanto a cadeia leve quanto a pesada possuem uma região aminoterminal, que participa do reconhecimento antigênico, e uma região carboxiterminal que está associada principalmente ao reconhecimento do anticorpo pelas células do sistema imune [70].



*Figura 24: estrutura esquemática de um anticorpo. Nessa figura estão representados os domínios variáveis das cadeias leves (light -  $V_L$ ) e pesados (heavy -  $V_H$ ) bem como os domínios constantes das cadeias leves (light -  $C_L$ ) e pesadas (heavy -  $C_H$ ). Estão representados também as porções Fab (região de reconhecimento da IgG pelas células do sistema imune) e Fc (região de reconhecimento do antígeno). Adaptado de [107].*

É possível observar poucas alterações na estrutura molecular fora das regiões de reconhecimento antigênico (domínios constantes  $C_H$  e  $C_L$ ). Por outro lado, existe uma enorme variabilidade na conformação molecular dos locais de ligação ao antígeno (domínios variáveis  $V_H$  e  $V_L$ ). A hipervariabilidade dessas regiões, também denominadas “*Complementarity Determining Regions – (CDRs)*” confere aos anticorpos o poder de reconhecer qualquer corpo estranho ao organismo [70].

A maior parte dos trabalhos que exploram o potencial de entrega dirigida de fármacos pelos anticorpos visam a obtenção de imunocombinados (fármaco-anticorpo) através de ligações covalentes [73], [74], [108], [109]. No entanto, a possibilidade de construção desses imunocombinados por meio das interações intermoleculares ainda é pouco investigada. Apenas alguns trabalhos relatam estudos de interações de fármacos potencialmente anticancerígenos com anticorpos através de técnicas de supressão de fluorescência e *docking* molecular, onde foi demonstrado a ligação dos fármacos principalmente nas regiões Fab dos anticorpos [110]–[112]. Dessa forma, é clara a necessidade de investir esforços nos estudos de interações fármacos-anticorpos.

### 3.5. Conclusões

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que, de fato, as porfirinas catiônica TMPyP e aniônica TPPS<sub>4</sub> interagem de forma efetiva com as duas biomoléculas (Ig e BSA). Os estudos de supressão de fluorescência indicaram que a estequiometria da interação Ig-porfirinas é diferente de 1:1 enquanto que para a interação BSA-porfirinas a estequiometria é de 1:1. Além disso, os parâmetros obtidos dos estudos de transferência de energia ressonante de Förster, indicaram que os resíduos fluorescentes das proteínas não são diretamente acessíveis às porfirinas e, de fato, a supressão ocorre por um mecanismo de longo alcance. Tem sido relatado a ocorrência de supressão de fluorescência intrínseca de proteínas via mecanismo de transferência de energia de longo alcance (FRET) [113]–[115]. O perfil energético das interações Ig-porfirinas mostrou que a estabilidade do complexo Ig-TMPyP é mantida principalmente por interações eletrostáticas enquanto que para Ig-TPPS<sub>4</sub> as interações hidrofóbicas são predominantes.

As constantes de ligação mostraram que a porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> possui maior afinidade, tanto pelos anticorpos quanto pelas albuminas, em comparação com a catiônica

TMPyP. Os parâmetros termodinâmicos mostraram que a porfirina TPPS<sub>4</sub> interage principalmente por forças eletrostáticas com a BSA, enquanto que as interações hidrofóbicas são predominantes na formação do complexo BSA-TMPyP. Este cenário de forças intermoleculares indicou, portanto, que a porfirina TPPS<sub>4</sub> pode estar interagindo com a BSA através do sítio I de Sudlow que é um local de ligação conhecido para moléculas heterocíclicas aniônicas grandes [90], enquanto que a porfirina catiônica TMPyP pode estar interagindo através do sítio heme.

Por fim, acreditamos que os resultados apresentados neste capítulo podem contribuir com eventuais aplicações das porfirinas TMPyP e TPPS<sub>4</sub> em terapia fotodinâmica, pois uma melhor compreensão das interações dessas porfirinas com BSA é parte obrigatória dos estudos da farmacocinética dessas moléculas. Além disso, as investigações sobre as interações com anticorpos lança as bases para construção de um potencial sistema carreador dessas porfirinas, contribuindo, dessa forma, para uma maior efetividade na PDT, com menos efeitos colaterais.

## Capítulo 4 : Estudo das interações de porfirinas com nanopartículas magnéticas biocompatíveis

### 4.1. Introdução

Com o objetivo de melhorar a eficácia e segurança dos sistemas de entrega e liberação de medicamentos, diferentes nanomateriais, visando aplicações biomédicas, têm surgido. Entre eles, as nanopartículas magnéticas (*magnetic nanoparticles* - MNPs) vêm recebendo muita atenção [116]–[118]. As MNPs obtidas a partir de óxidos, como magnetita e maghemita, exibem características particulares, como tamanho ultrafino, biocompatibilidade e propriedades magnéticas interessantes para uso em aplicações de entrega de fármacos [117], [118]. Essas nanopartículas magnéticas constituem fluidos magnéticos biocompatíveis, que formam um colóide magnético que também pode ser usado em um modalidade terapêutica conhecida com hipertermia magnética local (HPT) [10], [11]. Na HPT, um campo magnético externo alternado é utilizado para promover um aumento na temperatura local (~ 42 - 44°C) e causar a destruição seletiva de células e tecidos [10], [11].

Recentemente, tem surgido diversos sistemas que combinam porfirinas com nanocompósitos com o fim de utilizá-los como potenciais sistemas de diagnóstico e/ou terapêuticos contra tumores e outras doenças [8], [9]. Nowostawska e colaboradores [119] sintetizaram um novo nanoconjugado porfirina-magnetita multimodal (magnético e fluorescente) para produzir imagens de sistemas biológicos. Zao e colaboradores [120] usaram um novo nanocompósito de porfirina TPPS<sub>4</sub> com nanocomponentes de TiO<sub>2</sub> como um sistema de bio-imagem, além de agente terapêutico fotodinâmico para tratar artrite reumatoide. Além disso, foi demonstrado em trabalhos anteriores, que a porfirina TPPS<sub>4</sub> encapsulada em nanomateriais de ZnO aumentou a geração de oxigênio singlete [121] e a atividade fotobactericida dos nanobastões de ZnO [122].

A ação combinada de HPT e PDT tem sido proposta nos últimos anos [123]–[125]. Já foi demonstrado, utilizando-se uma nanoemulsão magnética contendo nanopartículas de maghemita e um fármaco fotossensibilizador, que as propriedades fotofísicas tais como rendimento quântico de formação de estados tripletos do fotossensibilizador não se alteraram, sendo excelentes para aplicações em terapia fotodinâmica e hipertermia local [126]. As nanopartículas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) também têm despertado um interesse particular, pois podem ser potenciais agentes para tratamento de câncer por meio de hipertermia magnética [127]. Além disso, Kyoung e colaboradores [128] demonstraram o sucesso do uso de conjugados de nanopartículas de magnetita e fotossensibilizadores em uma combinação de terapia fotodinâmica e hipertermia com eficácia aumentada contra o câncer.

Dessa forma, neste capítulo, propomos um sistema que combina as ações de entrega dirigida de fármacos, fotodiagnóstico e terapia numa mesma plataforma. Especificamente, estudamos a interação da porfirina TPPS<sub>4</sub> com a nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  utilizando espectroscopia de absorção UV/vis e fluorescência. Conseguimos descrever a dinâmica de incorporação dessa porfirina na nanopartícula e obter os parâmetros de ligação. Os resultados mostraram a efetiva ligação entre a porfirina e a nanopartícula, de forma que, esse sistema pode ser um potencial nanoconjugado para uso em entrega dirigida de fármacos e/ou em aplicações que combine as terapias PDT e HPT. Além disso, as propriedades fluorescentes da porfirina TPPS<sub>4</sub> pode ser empregada como uma sonda fluorescente para fotodiagnóstico. Essa combinação pode funcionar de maneira sinérgica, o que pode levar a um aumento do dano no tecido alvo após doses mínimas de dissipação de calor e fotossensibilização à luz visível.

## 4.2. Materiais e métodos

Foi utilizada a porfirina aniônica de base livre TPPS<sub>4</sub> cuja estrutura e origem foram apresentadas previamente. É bem conhecido que o anel central da porfirina TPPS<sub>4</sub> pode ser

protonado em um ambiente ácido [129]–[131]. Em particular, essa porfirina possui um valor de pK próximo de 5,0, isto é, se encontra na sua forma não protonada para valores de  $\text{pH} > 6,0$  e na forma diprotonada a  $\text{pH} < 4,5$ . Os valores de pH e o estado de protonação podem ser ajustados pela adição de quantidades apropriadas de HCl ou NaOH à solução estoque.

Os fluidos magnéticos contendo nanopartículas de maghemita dispersas em água foram preparados a partir da oxidação de magnetita, as quais foram sintetizadas pela equipe do professor Dr. Andris Figueiroa Bakuzis do Instituto de Física de UFG pelo modo de coprecipitação como descrito na referência [132]. As nanopartículas magnéticas de maghemita (MNPs) constituem um fluido magnético iônico, cuja carga superficial é definida pelo pH da solução. Nos estudos deste capítulo, o pH ácido (próximo de 4,0) foi escolhido, pois as MNPs iônicas são altamente estáveis neste valor de pH [133] e além disso, o estado protonado da porfirina TPPS<sub>4</sub> foi explorado.

A interação entre a porfirina TPPS<sub>4</sub> e as MNPs biocompatíveis foi monitorada através das técnicas de absorção UV/vis e espectroscopia de fluorescência em função de suas concentrações relativas. Os espectros de absorção UV/vis foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Beckmann DU640 UV-Vis, e os espectros de emissão foram medidos utilizando um espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon Inc). Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente ( $\sim 27^\circ\text{C}$ ). Além disso, todas as medidas de fluorescência foram corrigidas devido ao efeito de filtro interno (Seção 3.3.1).

### **4.3. Resultados e discussões**

#### **4.3.1. Caracterização fotofísica da porfirina TPPS<sub>4</sub>**

Como já foi mencionado os nitrogênios dos anéis pirrólicos central da porfirina podem ser diprotonados, o que causa mudanças em suas propriedades fotofísicas [129]. A Figura 25

apresenta os espectros de absorção e emissão da porfirina TPPS<sub>4</sub> em ambas as formas, não-protonada e diprotonada.

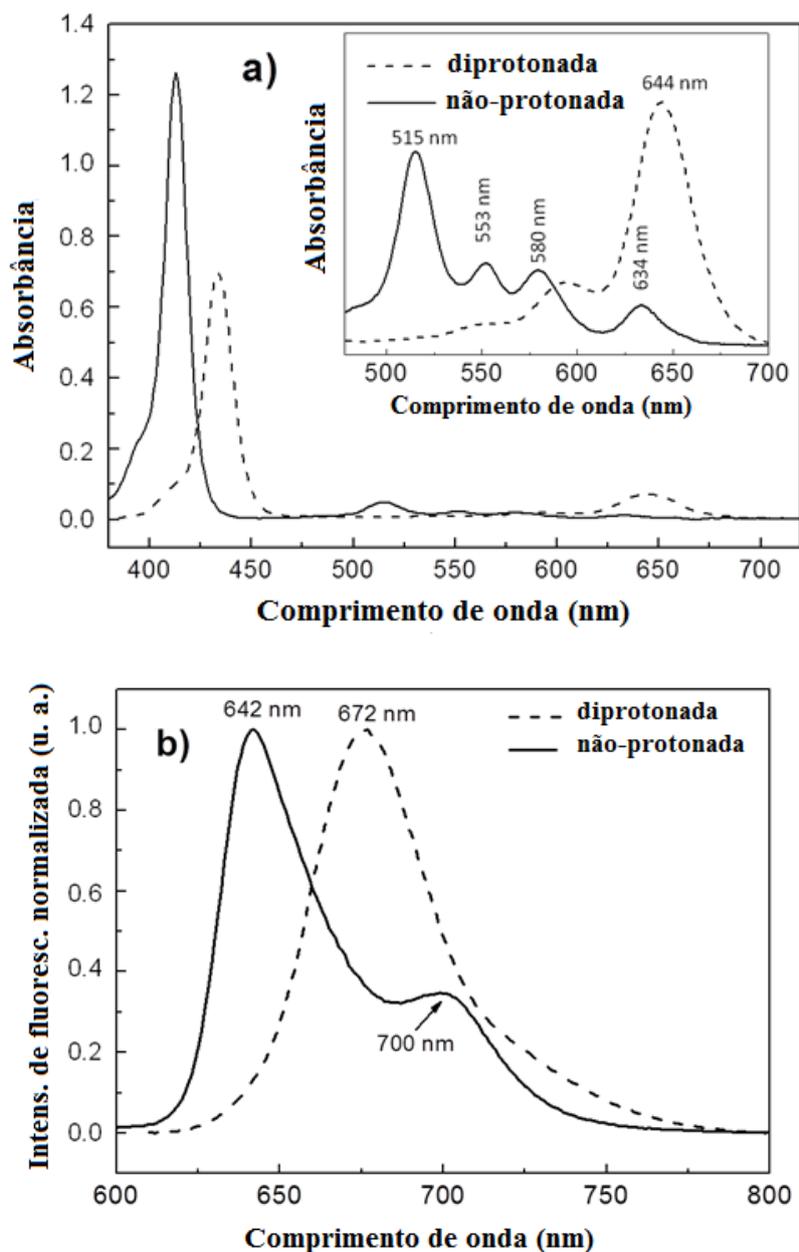


Figura 25: espectros de absorção a) e espectros de emissão de fluorescência b) da porfirina TPPS<sub>4</sub> na forma diprotonada (pontilhado) e não-protonada (linha sólida). O inset em a) mostra as bandas Q de ambas as formas com mais detalhes.

É bem conhecido que o espectro de absorção da TPPS<sub>4</sub> apresenta suas principais bandas em duas regiões: a banda B (banda Soret) localizada entre 380 e 450 nm, e as bandas Q entre 500 e 650 nm. A protonação do anel central da TPPS<sub>4</sub> provoca um desvio para o vermelho na

banda Soret e as bandas Q são drasticamente modificadas. Além disso, os dois picos observados no espectro de emissão de fluorescência para a espécie não-protonadas (642 e 700 nm) são reduzidos a apenas uma única banda larga sem estrutura (672 nm) e um pequeno ombro localizado na região do vermelho. Esses resultados estão de acordo com a literatura [129], onde as modificações nas estruturas das bandas Q é um indicativo do aumento da simetria do anel porfirínico [134].

#### 4.3.2. Estudo da interação TPPS<sub>4</sub>-MNPs

A Figura 26 apresenta o efeito das nanopartículas de maghemita nos espectros de fluorescência da porfirina TPPS<sub>4</sub> diprotonada excitada em dois comprimentos de onda diferentes. A Fig. 26a mostra o espectro de fluorescência após excitação no comprimento de onda correspondente à principal banda Q da forma diprotonada (640 nm), enquanto que a Fig. 26b, mostra a excitação na principal banda Q da forma não-protonada (515 nm). Os *insets* mostram a intensidade da fluorescência em função da concentração de nanopartículas.

Os resultados mostram que a adição de nanopartículas provoca uma redução significativa na fluorescência da porfirina TPPS<sub>4</sub> protonada até sua completa extinção (*inset* da Fig. 26a). Por outro lado, uma nova banda de emissão é formada quando a amostra é excitada a 515 nm, o que pode ser atribuído à desprotonação da TPPS<sub>4</sub> (Fig. 26b).

A Figura 27 mostra as alterações nos espectros de absorção durante a titulação de MNPs (de 0 à 0,59  $\mu\text{mol/L}$ ) na presença e na ausência da porfirina TPPS<sub>4</sub> (10  $\mu\text{mol/L}$ ), Figura 27a e o *inset* da 27a, respectivamente. A Figura 27a mostra que a adição de MNPs causa um aumento na absorção na faixa de 480 - 750 nm, exceto por uma ligeira redução da banda Q (perto de 650 nm). No entanto, não há alterações espectrais evidentes nos perfis do espectro UV/vis da TPPS<sub>4</sub> que indiquem a formação de agregados moleculares, o que mostra que a interação entre as MNPs e as porfirinas não causa a formação desses agregados [135].

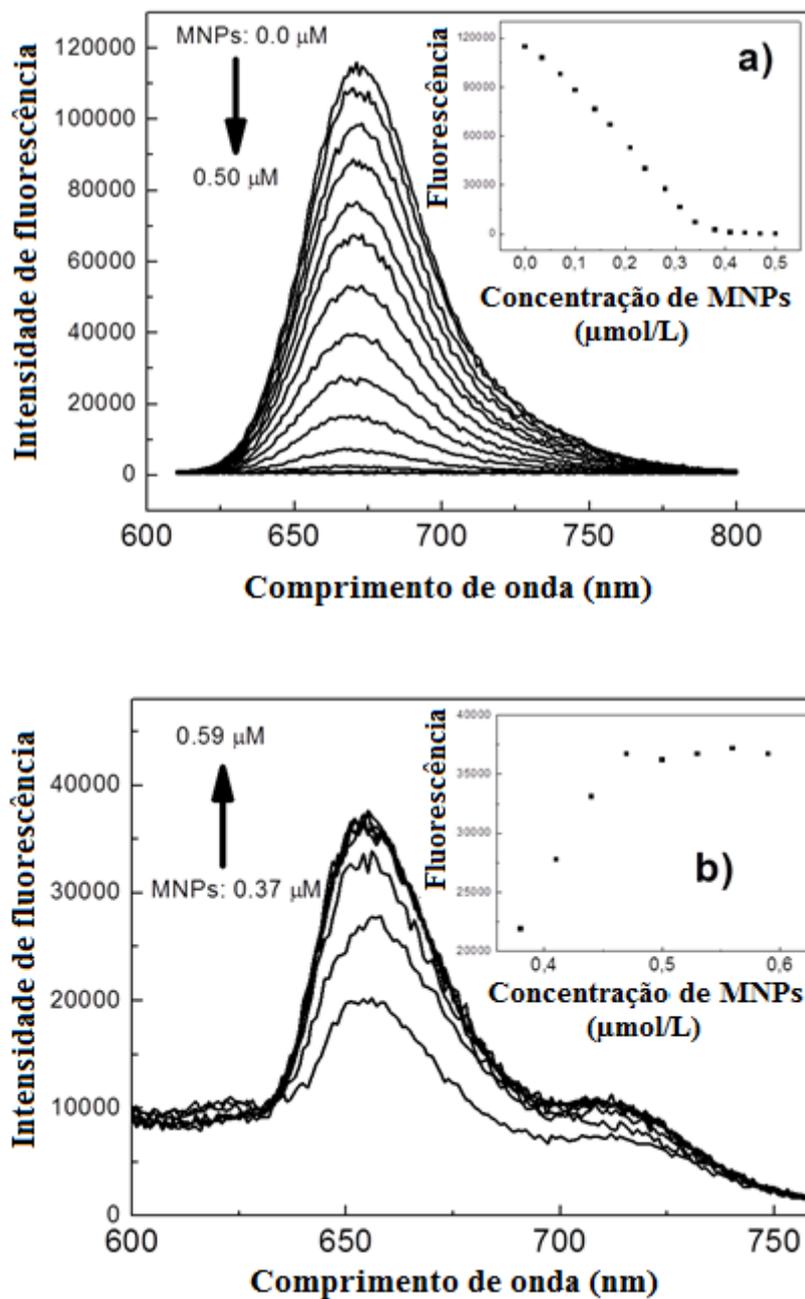


Figura 26: espectros de emissão da porfirina TPPS<sub>4</sub> na presença de nanopartículas de magnetita em dois diferentes comprimentos de onda de excitação: 640 nm a) e 515 nm b). O inset mostra a intensidade de fluorescência em função da concentração de nanopartículas.

A auto-agregação induz novos modos de vibração, comparados com as espécies monoméricas, que estão associadas aos movimentos relativos de monômeros na estrutura agregada [136]. Este efeito aumenta a probabilidade de dissipação de energia não radiativa

reduzindo a geração de estados de tripletos, oxigênio singleto, a eficiência da ação fotodinâmica e, conseqüentemente, é indesejável para aplicações fotodinâmicas [41], [85], [135]–[137].

A Figura 27b mostra a subtração dos espectros de absorção das MNPs (*inset* da Figura 27a) do espectro da solução contendo TPPS<sub>4</sub> + MNPs (Figura 27a). Este conjunto de dados foi chamado de [(MNP + TPPS) - MNP]. Os espectros [(MNP + TPPS) - MNP] mostram uma forte redução da banda Q (centrada em 644 nm) e quatro novas bandas centradas em 520, 557, 593, 650 nm. É importante observar que o perfil dessas novas bandas é semelhante à forma não protonada da TPPS<sub>4</sub> (Fig. 25a). Este resultados obtidos dos espectros de absorção estão em acordo com as medidas de fluorescência, confirmando a desprotonação da porfirina TPPS<sub>4</sub> na presença de MNPs.

A Figura 27c resume as alterações observadas nos espectros de absorção da TPPS<sub>4</sub> na interação com as MNPs. A Figura 27c mostra os espectros da TPPS<sub>4</sub> na presença de MNPs (TPPS + MNP) e na ausência de MNPs (TPPS), apenas as MNP (MNP) e a subtração [(MNP + TPPS) - MNP] mostrada na Figura 27b.

A combinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) com o rendimento de formação de estados tripletos ( $\Phi_T$ ) indicam o potencial de uma molécula para aplicações teranósticas (propriedades fotodiagnósticas e fototerapêuticas combinadas) [138]. Já foi relatado anteriormente que a TPPS<sub>4</sub> não protonada apresenta um rendimento quântico de fluorescência menor (0,16) do que sua forma diprotonada (0,37) [41]. Embora esta redução ocorra, o sinal de fluorescência ainda é considerável para aplicações de fotodiagnóstico. Por outro lado, a TPPS<sub>4</sub> não protonada apresenta uma maior formação de tripletos (0,77) em comparação com a protonada (0,37), mostrando que é mais eficiente para aplicações em PDT. A TPPS<sub>4</sub> não protonada e diprotonada apresentam valores da soma  $\Phi_F + \Phi_T$  iguais a 0,93 e 0,74, respectivamente, mostrando que, para TPPS não protonada, praticamente todos os fótons absorvidos levam à fluorescência ou ao cruzamento intersistemas [138]. Assim, TPPS<sub>4</sub> não

protonada apresenta maior potencial para aplicações teranósticas quando comparada com a diprotonada.

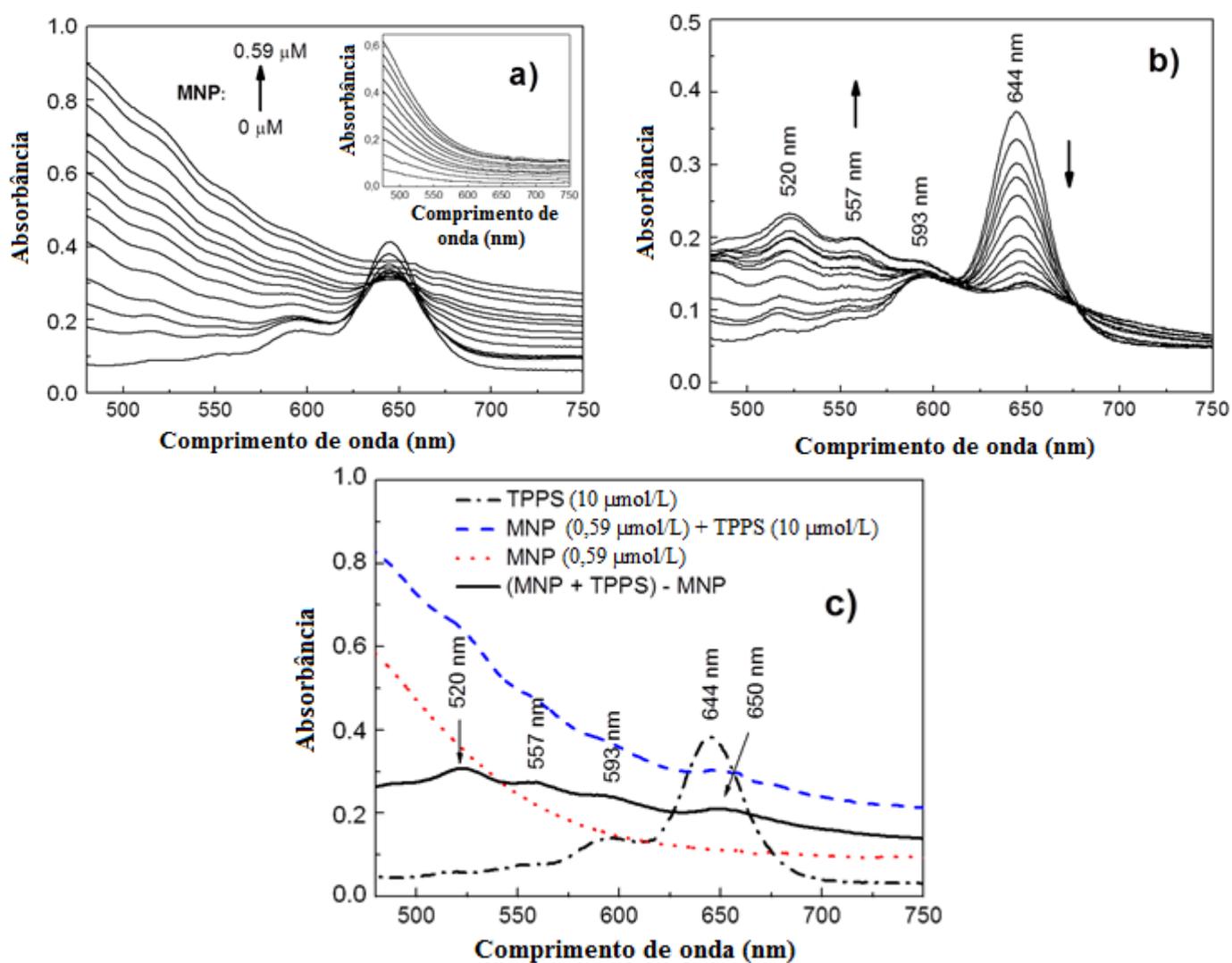


Figura 27: espectro da TPPS<sub>4</sub> diprotonada (10 μmol/L) na presença a) e na ausência de MNPs (inset de a)); subtração do espectro de absorção de MNPs do espectro da solução de porfirina TPPS<sub>4</sub> + MNPs b) e espectros comparativos da porfirina TPPS<sub>4</sub>, MNPs e a interação entre eles c).

#### 4.3.3. Parâmetros de ligação

Como já foi mencionado (Seção 2.7), os mecanismos de supressão geralmente são classificados em estáticos e dinâmicos, onde o processo de supressão dinâmica resulta de

colisões entre o fluoróforo e o supressor, enquanto que, o processo de supressão estática é causado pela formação de um complexo no estado fundamental. A avaliação da afinidade entre as moléculas de TPPS<sub>4</sub> e as MNPs pode ser realizada pela constante de supressão de Stern-Volmer ( $K$ ) obtida de uma modificação da equação de Stern-Volmer (Equação 4.1) que pode ser facilmente obtida introduzindo um termo que representa a fração da fluorescência do fluoróforo que não pode ser suprimida ( $f_a$ ) [35], [139],

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a K} \frac{1}{[Q]} \quad 4.1$$

onde  $F_0$  e  $F$  e  $[Q]$  são os mesmos parâmetros definidos anteriormente. Se o  $K$  for conhecido, também podemos determinar a constante supressão bimolecular por  $k_q = K/\tau_0$ , onde  $\tau_0$  é o tempo de vida de fluorescência do fluoróforo na ausência do inibidor. Como já foi discutido na introdução desta tese, um gráfico de  $\tau_0/\tau$  em função de  $[Q]$  é um método padrão para avaliar se a supressão é estática ou dinâmica. No entanto tem sido relatado que em sistemas onde a supressão estática ocorre,  $k_q$  geralmente exibe valores muito maiores do que  $1 \times 10^{10}$  L/mol.s, que é um valor característico para supressões controladas por difusão [35], [139]–[143].

Os valores de  $K$ ,  $f_a$  e  $k_q$  foram obtidos a partir do ajuste do gráfico  $F_0/\Delta F$  em função de  $1/[Q]$  (Figura 28), resultando em  $K = 8,89 \times 10^5$  L/mol,  $f_a = 4,35$  e  $k_q = 2,54 \times 10^{14}$  L/mol.s. Valores de  $K$  para a interação de porfirinas com nanopartículas comparáveis a este já foram relatados na literatura [139], [142]–[144]. O valor de  $k_q$  obtido é obviamente muito maior que  $k_q \cong 10^{10}$  L/mol.s, sugerindo que o mecanismo de supressão observado é devido ao processo estático. O tempo de vida de fluorescência da TPPS<sub>4</sub> utilizada foi  $\tau_0 = 3,5$  ns, de acordo com a Ref. [145]. Borissevitch e colaboradores [139] afirmaram que um valor de  $f_a > 1$  sugere que uma única molécula de supressor é capaz de se ligar a mais de uma molécula de fluoróforo. De fato, isto está de acordo com os resultados que serão apresentados na próxima seção.

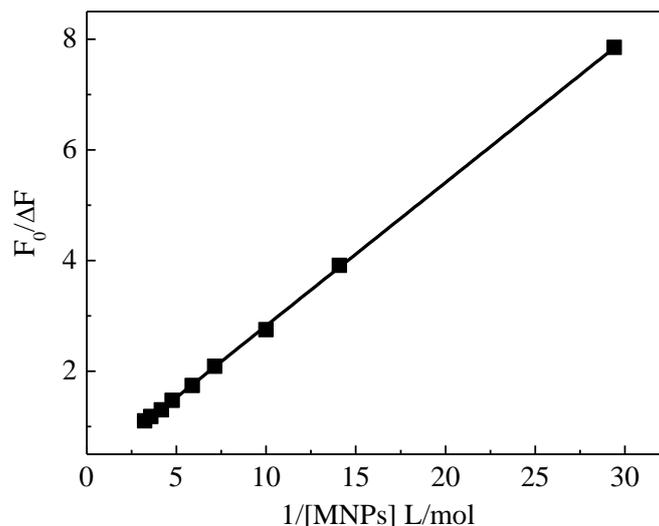
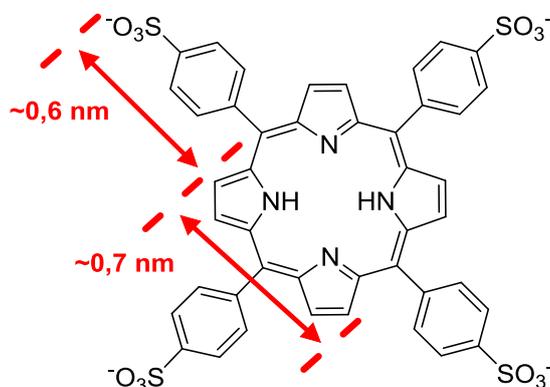


Figura 28: gráfico da equação Stern-Volmer modificada para a supressão da fluorescência TPPS<sub>4</sub> por MNPs.

#### 4.3.4. Estimativa do número de porfirinas por nanopartículas

A Figura 26b mostra que a banda de emissão gerada pela excitação a 515 nm aumentou linearmente com a concentração das nanopartículas até atingir uma saturação, na concentração de 0,47  $\mu\text{mol/L}$ . A partir desse ponto, todas as porfirinas diprotonadas que estavam livres na solução foram ligadas às nanopartículas. Como a concentração molar da porfirina TPPS<sub>4</sub> é conhecida (10  $\mu\text{mol/L}$ ), é possível estimar um valor de aproximadamente 21 porfirinas por MNPs. Este valor parece razoável, considerando as características do MNP e da TPPS<sub>4</sub>. As nanopartículas de maghemita têm um diâmetro de cerca de 4,8 nm, como descrito na ref. [132], o que fornece uma área superficial de aproximadamente  $7,24 \times 10^{-17}$  m<sup>2</sup>. Com base nas dimensões da TPPS<sub>4</sub> apresentadas na Figura 29, a TPPS<sub>4</sub> pode ser vista como um quadrado com diagonal próxima a 1,9 nm, que fornece uma área em torno de  $1,8 \times 10^{-18}$  m<sup>2</sup>. Dessa forma, conseguimos obter um máximo de 40 porfirinas/MNPs, considerando que toda a área da MNPs é coberta pelas porfirinas. No entanto, um número menor de porfirinas por MNP é esperado devido à repulsão eletrostática entre as porfirinas que são aniônicas. A estratégia adotada para

estimar o número de porfirinas ligadas em cada nanopartícula parece bastante razoável quando comparados com os resultados encontrados na literatura, por exemplo, Shaikh e colaboradores [142] encontraram uma razão de 4 moléculas de porfirina por Au-NPs.



*Figura 29: estrutura molecular da TPPS<sub>4</sub> apresentado as suas dimensões. Adaptado de [146].*

#### 4.4. Conclusões

Neste capítulo, descrevemos a interação da porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> com nanopartículas de maghemita. Através de medidas de absorção UV/vis e fluorescência, foram obtidas as constantes de ligação, constante de supressão bimolecular e o número máximo de 21 moléculas de porfirina por cada MNP. Além disso, as medidas de absorção e fluorescência revelaram que a ligação entre elas pode estar associada a um processo estático. O estudo desse sistema fornece elementos importantes para sua aplicação em bionanotecnologia e nanomedicina como um sistema multifuncional que combine funções de diagnósticos com funções terapêuticas (sistema teranóstico) e ainda como um sistema de entrega de fármacos em PDT.

# Capítulo 5 : Estudo das interações de porfirinas com DNA e sua foto-degradação

## 5.1. Interações com DNA

O estudo das interações de fármacos com o DNA é uma área de pesquisa extremamente importante, tanto nos aspectos fundamentais quanto práticos, já que a molécula de DNA é de fundamental importância para a vida [147], [148]. A molécula de DNA é um alvo para diversos tipos de fármacos, em particular os utilizados no tratamento do câncer, onde são utilizados muitos compostos que se ligam ou danificam completamente o DNA induzindo, dessa forma, à morte celular [148]–[150]. A cisplatina, por exemplo, atua através de ligações covalentes às bases nitrogenadas do DNA que induzem alterações estruturais promovendo a apoptose (morte celular programada). No entanto, a diversidade estrutural do DNA viabiliza também a sua interação com fármacos por diferentes tipos de interações intermoleculares que também podem promover a morte celular.

Estudos de interações de porfirinas e metaloporfirinas com DNA tem despertado o interesse da comunidade científica devido a suas potenciais aplicações médicas. Muitos trabalhos que investigam as interações de porfirinas catiônicas, por exemplo, com DNA tem sido publicados [151]–[153]. A formação de complexos porfirina-DNA muitas vezes é viabilizada pelas atrações eletrostáticas entre as regiões catiônicas periféricas das porfirinas e o esqueleto de fosfato aniônico do DNA.

A atividade fotodinâmica das porfirinas e metaloporfirinas faz dessas moléculas promissores agentes antitumorais e o fato de possuírem mecanismo de ação diferente da cisplatina faz com sejam uma alternativa interessante para o problema da resistência celular. As interações porfirina-DNA podem ser estudadas por diversas técnicas, dentre as quais, ensaio de

mudança da mobilidade eletroforética do DNA e espectroscopia de absorção UV/Vis e fluorescência se destacam. Neste capítulo investigamos as interações das porfirinas TMPyP, TPPS<sub>4</sub> e seus complexos com zinco através de técnicas e espectroscopia de absorção UV/Vis e eletroforese.

## 5.2. Metaloporfirinas

Neste capítulo foram utilizadas, além das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP, os seus complexos com zinco, zinco(II)-*meso*-tetrakis(p-sulfonatofenil)porfirina (ZnTPPS<sub>4</sub>) e zinco(II)-*meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina (ZnTMPyP).

A inserção de átomos metálicos no anel central das porfirinas influencia diretamente nas suas propriedades eletrônicas e de estados excitados, favorecendo o acoplamento spin-órbita e aumentando a formação de estados tripletos, a produção de oxigênio singlete e conseqüentemente a eficácia fotodinâmica [154]. Além disso, tem sido relatado que a presença do zinco no anel central aumenta também a afinidade dessas porfirina por membranas biológicas [155].

Os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete para ambas as porfirinas complexadas com zinco, aumentam quando comparados com os mesmos parâmetros associados às formas bases livres. A inserção do átomo de zinco no anel central da porfirina TPPS<sub>4</sub> aumenta a seu rendimento quântico de oxigênio singlete de  $\Phi_{\Delta}^{TPPS_4} = 0,62$  para  $\Phi_{\Delta}^{ZnTPPS_4} = 0,74$  [156], enquanto que este parâmetro para a porfirina TMPyP aumenta de  $\Phi_{\Delta}^{TMPyP} = 0,74$  para  $\Phi_{\Delta}^{ZnTMPyP} = 0,78$  [156].

Essas metaloporfirinas, além de exibirem alto potencial de ataque fotoquímico, também possuem solubilidade em água e estabilidade térmica e fotoquímica. Em um trabalho publicado recentemente [157], nosso grupo mostrou a eficácia dessas duas metaloporfirinas contra o

Hepes vírus bovino tipo I que é um patógeno de interesse na medicina veterinária que está associado a uma variedade de manifestações clínicas em bovinos.

### 5.3. Materiais e Métodos

#### 5.3.1 Modelo de ligação porfirinas-DNA

O rendimento quântico de fluorescência intrínseca do DNA é muito baixo [158], o que inviabiliza os estudos de interações por meio das técnicas de supressão de fluorescência discutidas previamente no Capítulo 2. Alternativamente, as constantes de ligação para as interações porfirinas-DNA podem ser determinadas monitorando as mudanças nos espectros de absorção das porfirinas devidas à presença do DNA.

Um modelo muito utilizado nos estudos de interações com DNA foi proposto inicialmente por Schmechel e Crothers em um artigo que investiga a interação de DNA com a Proflavina, um desinfetante que age contra diversas bactérias [159]. Faremos uma abordagem dos principais aspectos desse modelo a seguir.

Considere a reação de equilíbrio para a interação porfirina-DNA da seguinte forma:



A constante de equilíbrio para essa interação é dada por:

$$K = \frac{[P]_b}{[DNA]_F \cdot [P]_F} \quad 5.2$$

onde  $[P]_b$  é a concentração das porfirinas ligadas ao DNA, que é igual a concentração dos complexos porfirinas-DNA,  $[P]_F$  é a concentração de porfirinas livres e  $[DNA]_F$  é a concentração de moléculas de DNA livres. Podemos ainda escrever a concentração inicial de

porfirina em termos das concentrações de porfirinas livres  $[P]_F$  e ligadas  $[P]_b$  da seguinte maneira:

$$[P] = [P]_F + [P]_b \quad 5.3$$

A absorvância das porfirinas na presença do DNA pode ser escrita em termos de um coeficiente de absorção molar aparente  $\varepsilon_{ap}$  da seguinte forma:

$$A = A_F + A_b \quad 5.4$$

$$\varepsilon_{ap}[P]\ell = \varepsilon_F[P]_F\ell + \varepsilon_b[P]_b\ell \quad 5.5$$

Substituindo a Equação 5.3 na Equação 5.5 e rearranjando os termos obtemos:

$$[P]_b = [P] \frac{(\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)}{(\varepsilon_b - \varepsilon_F)} \quad 5.6$$

Agora, substituindo as Equações 5.6 e 5.3 na Equação 5.2 e usando a expressão  $[DNA]_F = [DNA]_0 - [P]_b$ , obtemos:

$$\frac{[DNA]_0 - [P]_b}{(\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)} = \frac{[DNA]_0 - [P]_b}{(\varepsilon_b - \varepsilon_F)} + \frac{1}{(\varepsilon_b - \varepsilon_F) \cdot K} \quad 5.7$$

Na prática, se for possível garantir que a concentração total de DNA é muito maior que a concentração de porfirinas ligadas ( $[DNA]_0 \gg [P]_b$ ), a Equação 5.7 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{[DNA]_0}{(\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)} = \frac{[DNA]_0}{(\varepsilon_b - \varepsilon_F)} + \frac{1}{(\varepsilon_b - \varepsilon_F) \cdot K} \quad 5.8$$

A Equação 5.8 mostra que o coeficiente linear de um gráfico de  $[DNA]_0 / (\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)$  em função de  $[DNA]_0$ , fornece a constante de ligação  $K$ . Diversos trabalhos tem utilizado este modelo para avaliar a interação de fármacos com DNA [159]–[161] devido à sua estreita relação com a espectroscopia de absorção e irrefutável praticidade.

### 5.3.2 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel consiste em uma técnica de separação de moléculas com base em sua migração em um gel, devida a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são segregadas de acordo com o seu tamanho, pois as que possuem menor massa serão mais rápidas em relação as mais pesadas, quando submetidas à diferença de potencial.

Um gel bastante utilizado em eletroforese é a agarose, que é um polissacarídeo que forma uma rede capaz de reter moléculas durante sua migração. A concentração de agarose determina o tamanho dos poros da rede, de forma que, quanto maior a concentração de agarose, menor será o tamanho dos poros e maior será a dificuldade de migração de moléculas, como o DNA, por exemplo.

No preparo do gel, a agarose em pó é diluída e adicionada à cuba de migração, conforme mostrado na Figura 30a. Em seguida, coloca-se o pente no gel para que, durante a solidificação do mesmo, sejam criados poços que serão utilizados para adicionar as amostras. Ao gel deve ser adicionado brometo de etídio, um marcador de ácidos nucléicos que possibilita a visualização dessas moléculas sob iluminação com luz UV. Após a solidificação do gel, retira-se cuidadosamente o pente, adiciona-se o tampão de corrida e em seguida coloca-se as amostras nos poços deixados pelo pente. Finalmente, ajusta-se a tensão da fonte e o tempo de corrida adequados ao experimento avaliado.

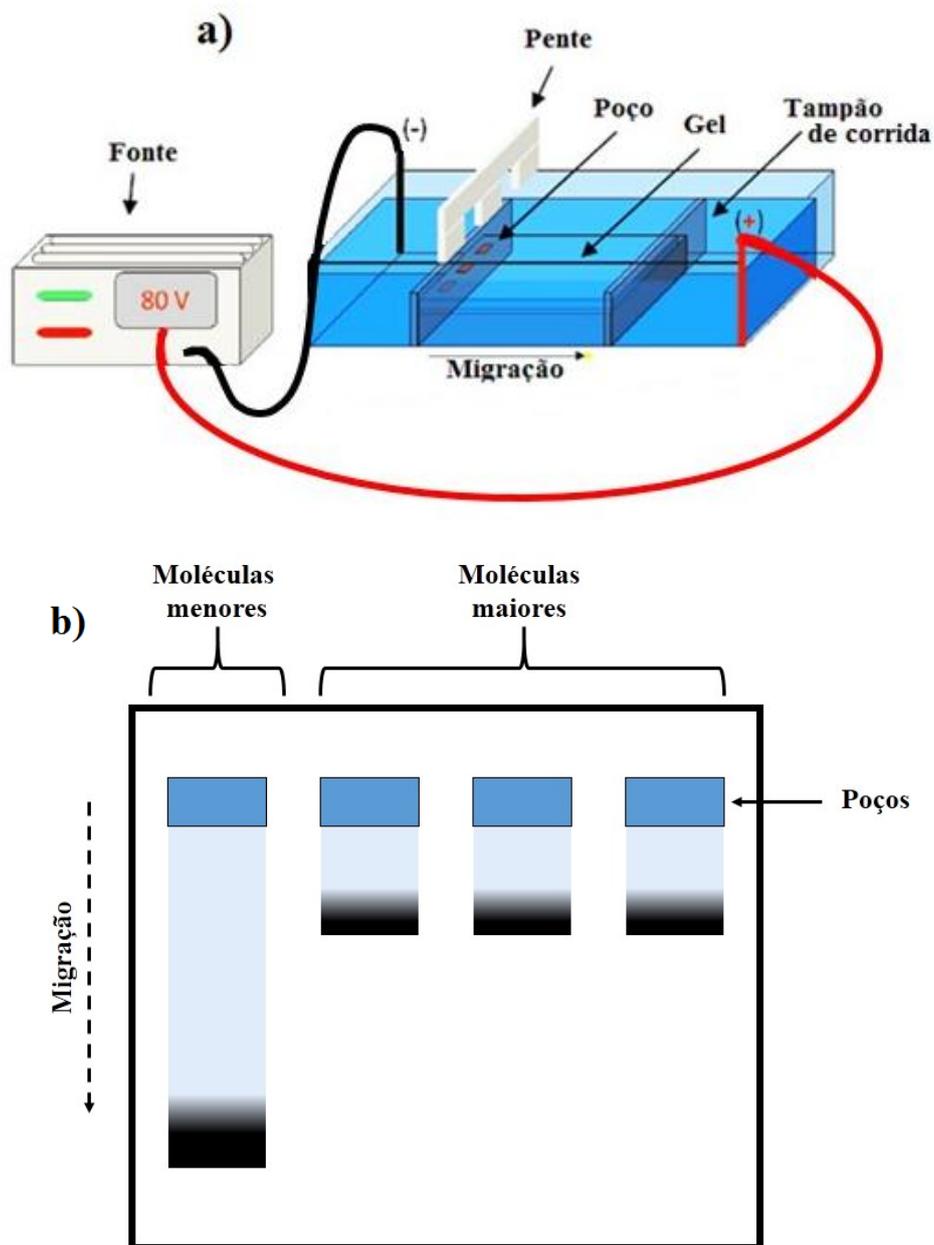


Figura 30: a) representação esquemática da técnica de eletroforese em gel de agarose e b) padrão das bandas no gel. Adaptado de [162].

Este processo assemelha-se a uma corrida, onde cada elemento é colocado numa pista e na presença de uma diferença de potencial vai deixando o seu rastro semelhante ao apresentado no esquema da Figura 30b. Estes rastros possibilitam a classificação das moléculas quanto ao seu tamanho.

### 5.3.3 Determinação do potencial de ataque fotoquímico de um fotossensibilizador: o fluxo de moléculas de oxigênio singleto produzidas

Todo processo fotoquímico se inicia com a absorção de luz por um fotossensibilizador. Dessa forma, um parâmetro fundamental na avaliação do fluxo de moléculas de oxigênio singleto produzidas é o número de fótons absorvidos. Para obter esse parâmetro, devemos considerar inicialmente o número de fótons emitidos por uma fonte de luz ( $N_{em}$ ), que é dado pela energia total emitida por essa fonte ( $P \cdot \Delta t$ ), dividido pela energia de cada fóton ( $hc/\lambda$ ), onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação emitida,  $c$  a velocidade da luz e  $h$  a constante de Planck:

$$N_{em} = \frac{P \cdot \Delta t \cdot \lambda}{hc} \quad 5.9$$

Quando se utiliza fontes de radiação policromáticas, como lâmpadas halógenas empregada neste trabalho, é necessário considerar a potência como uma função do comprimento de onda, pois a radiação é emitida num espectro amplo de comprimentos de onda e a Equação 5.9 pode ser reescrita como:

$$N_{em} = \frac{\Delta t}{hc} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) d\lambda \quad 5.10$$

Podemos ainda escrever a potência em termos da intensidade da radiação incidente numa amostra ( $I_0(\lambda)$ ) e da área ( $S$ ) do feixe de luz como  $P(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot S$ , e sabendo que a intensidade absorvida pela amostra ( $I_a(\lambda)$ ) pode ser relacionada com a intensidade incidente por  $I_a(\lambda)/I_0(\lambda) = (1 - 10^{-A(\lambda)})$ , onde  $A$  é absorvância. Assim, podemos calcular o número de fótons absorvidos por segundo (fluxo de fótons) por:

$$n_{abs} = \frac{N_{abs}}{\Delta t} = \frac{1}{hc} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} (1 - 10^{-A(\lambda)}) P(\lambda) d\lambda \quad 5.11$$

Podemos ainda definir o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto pela razão entre o número de moléculas de oxigênio singleto produzidas ( $N_{1O_2}$ ) e a quantidade de fótons absorvidas por uma molécula fotossensível ( $N_{abs}$ ).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{N_{1O_2}}{N_{abs}} \quad 5.12$$

De acordo com a Equação 5.12, se o número de fótons absorvidos e o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto forem conhecidos, podemos obter o número de moléculas de oxigênio singleto produzidas, por unidade de tempo, por um fotossensibilizador através da expressão  $n_{1O_2} = \Phi_{\Delta} \times n_{abs}$ . Este parâmetro é, evidentemente, uma quantidade que reflete o potencial de ataque fotoquímico de um fotossensibilizador devido sua relevância no processo fotodinâmico. Tanto o número de fótons absorvidos (Eq. 5.11) quanto o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto podem ser obtidos por técnicas espectroscópicas. Este último, pode ser obtido por métodos diretos ou indiretos, conforme foi discutido na Seção 2.4.

#### 5.3.4 Determinação da constante de ligação

As porfirinas *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina (TPPS<sub>4</sub>), *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina (TMPyP) e seus complexos de zinco (ZnTPPS<sub>4</sub> e ZnTMPyP) foram adquiridos de *Porphyrin Products Inc.* As moléculas de DNA foram selecionados e purificados pelo grupo do Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. As soluções experimentais foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,4). As concentrações dos compostos foram determinadas espectroscopicamente utilizando os seguintes coeficientes de absorção molar:  $\epsilon_{422nm}^{TMPyP} = 2,3 \cdot 10^5 M^{-1} cm^{-1}$  [84],

$\varepsilon_{563nm}^{ZnTMPyP} = 1,7 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [157],  $\varepsilon_{515nm}^{TPPS_4} = 1,4 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [85],  $\varepsilon_{556nm}^{ZnTPPS_4} = 1,7 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [157] e  $\varepsilon_{260nm}^{DNA} = 1,32 \cdot 10^4 M^{-1}cm^{-1}$  [163].

Para a obtenção das constantes de ligação, alíquotas de soluções estoques de DNA foram adicionadas às soluções de porfirinas com concentrações fixas. Os espectros de absorção foram monitorados após a adição de cada alíquota de solução de DNA às soluções de porfirinas. Todos os valores apresentados são médias, obtidas a partir de três experimentos independentes. As medidas de absorção UV/Vis foram realizadas com um espectrofotômetro Hitachi U-2900 e foram empregadas cubetas de quartzo com quatro faces polidas e caminho óptico de 1 cm.

### 5.3.5 Fotodegradação do DNA

O ensaio de fotodegradação do DNA foi realizado utilizando um DNA plasmidial. Alíquotas com 200 ng de DNA foram misturadas com soluções de porfirinas diluídas em PBS (pH 7,4) a uma concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$  e depois incubadas a 37 °C por 1 h. Depois disso, as amostras foram irradiadas com uma lâmpada halógena ( $I = 130 \text{ mW/cm}^2$ ) por 180 minutos. Durante a irradiação, alíquotas da solução irradiada foram retiradas a cada 30 min e os efeitos da irradiação para a integridade do DNA foram avaliados. As amostras de DNA plasmidial, tratadas com luz, foram monitoradas por eletroforese em gel de agarose a 1% durante 2 h a 100 V. O gel foi corado usando brometo de etídio (1 mg/mL) e qualquer fotodegradação de DNA foi avaliada pela perda de intensidade de banda no gel após visualização sob luz UV.

## 5.4. Resultados e discussões

### 5.4.1 Avaliação da afinidade nas interações porfirinas-DNA

. Os efeitos da presença do DNA nos espectros de absorção das quatro porfirinas estudadas são mostrados na Figura 31. A banda em 260 nm é atribuída ao DNA e o aumento

observado nessa banda é, obviamente, devido ao acréscimo da concentração de DNA na solução.

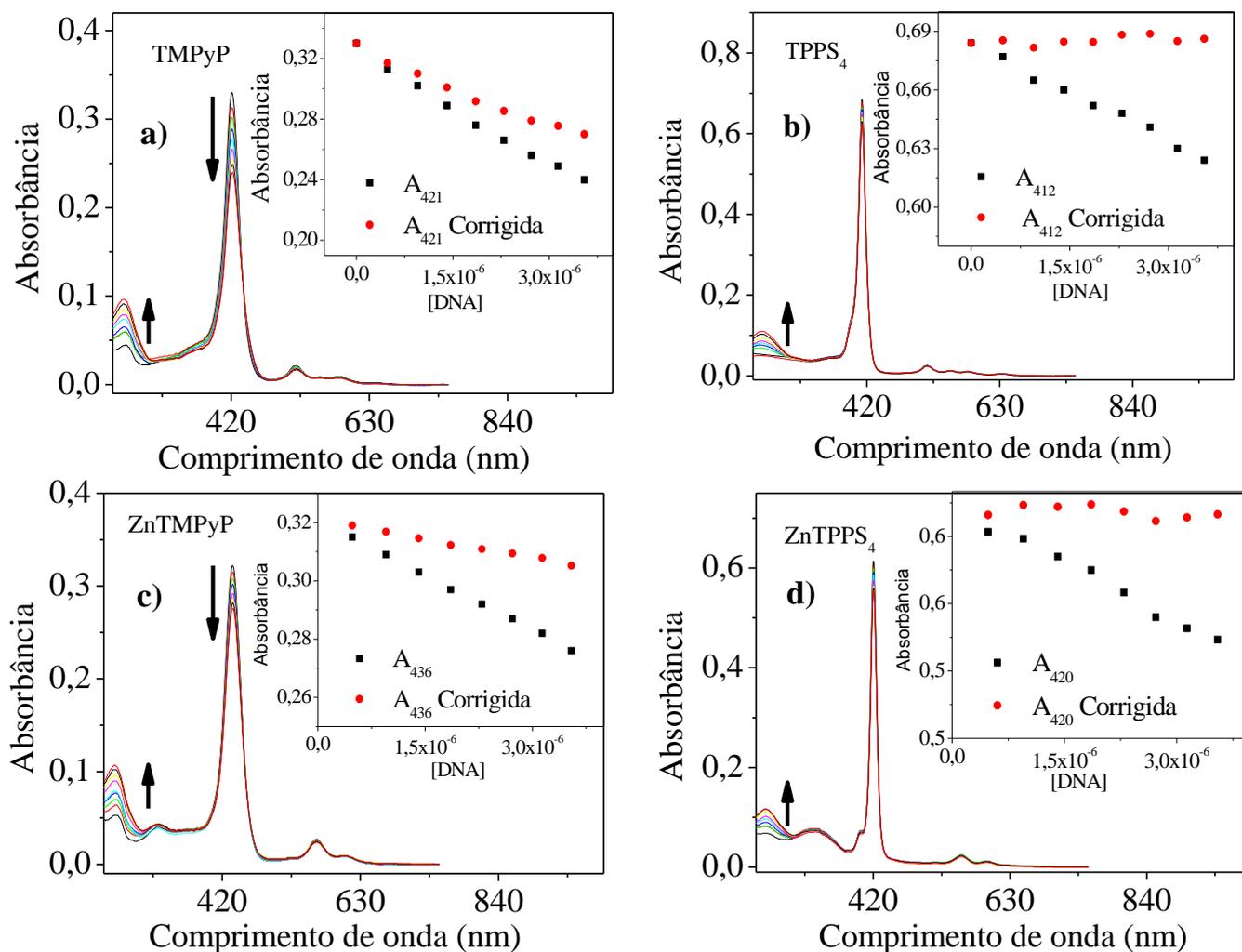


Figura 31: alterações nos espectros de absorção das porfirinas TMPyP a), TPPS<sub>4</sub> b), ZnTMPyP c) ZnTPPS<sub>4</sub> devido à presença do DNA. Nos insets estão as absorções (medidas e corrigidas devido à diluição) nas bandas de Soret em função da concentração de DNA. As concentrações das porfirinas foram mantidas à 1,4  $\mu\text{mol/L}$  e a concentração do DNA variou de 3  $\mu\text{mol/L}$  até 10  $\mu\text{mol/L}$ .

O que de fato nos interessa é a evidente redução nas bandas de Soret das porfirinas devido ao acréscimo da concentração de DNA. Nos *insets*, estão apresentadas as absorbâncias nas bandas da Soret (medidas e corrigidas) em função da concentração de DNA. As correções foram feitas para eliminar a contribuição da diluição na redução das bandas de Soret ao adicionar alíquotas de DNA na solução.

Os *insets* dos gráficos das porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP mostram que, mesmo após as correções, existe uma redução clara na banda de Soret devida à interação com as moléculas de DNA. Por outro lado, os *insets* dos gráficos referentes às porfirinas aniônicas TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> mostram que as reduções observadas nas absorções das bandas de Soret são devidas apenas às diluições. A simples análise das alterações nos espectros de absorção já apresentam indícios de que as porfirinas aniônicas não interagem com o DNA. No entanto, os outros parâmetros e experimentos apresentados subsequentemente deixarão isso muito mais evidente.

Foram utilizadas as absorções nas bandas de Soret para construir os gráficos de  $[DNA]_0 / (\varepsilon_{ap} - \varepsilon_F)$  em função de  $[DNA]_0$  apresentados na Figura 33. Os gráficos referentes às porfirinas catiônicas, apresentados nas Figuras 33a e 33c, apresentam perfil linear, o que era esperado, enquanto que os gráficos para as porfirinas aniônicas (Fig. 33b e 33d), de fato, não apresentam nenhum perfil definido. As constantes de ligação para as porfirinas catiônicas, apresentadas na Tabela 3, foram obtidas dos coeficientes lineares referentes aos ajustes dos dados experimentais pela Equação 5.8.

*Tabela 3: constantes de ligação para as porfirinas TMPyP e ZnTMPyP.*

	$K$ ( $10^5$ L/mol)
TMPyP	2,0
ZnTMPyP	4,4

A estrutura esquemática do DNA apresentada na Figura 32 mostra que as interações com as porfirinas catiônicas TMPyP e ZnTMPyP, assim como sugerem os estudos de afinidade, podem ocorrer devido às atrações eletrostáticas entre o esqueleto de fosfato aniônico e as cargas positivas das porfirinas. Por outro lado, essa mesma estrutura aniônica do DNA pode ser responsável por evitar a ligação com as porfirinas aniônicas. Diversos estudos sobre interações

de porfirinas catiônicas (base livre e metaloporfirinas) com DNA, relatam essa atração eletrostática entre a porfirina catiônica e o esqueleto aniônico do DNA [160], [164]–[166].

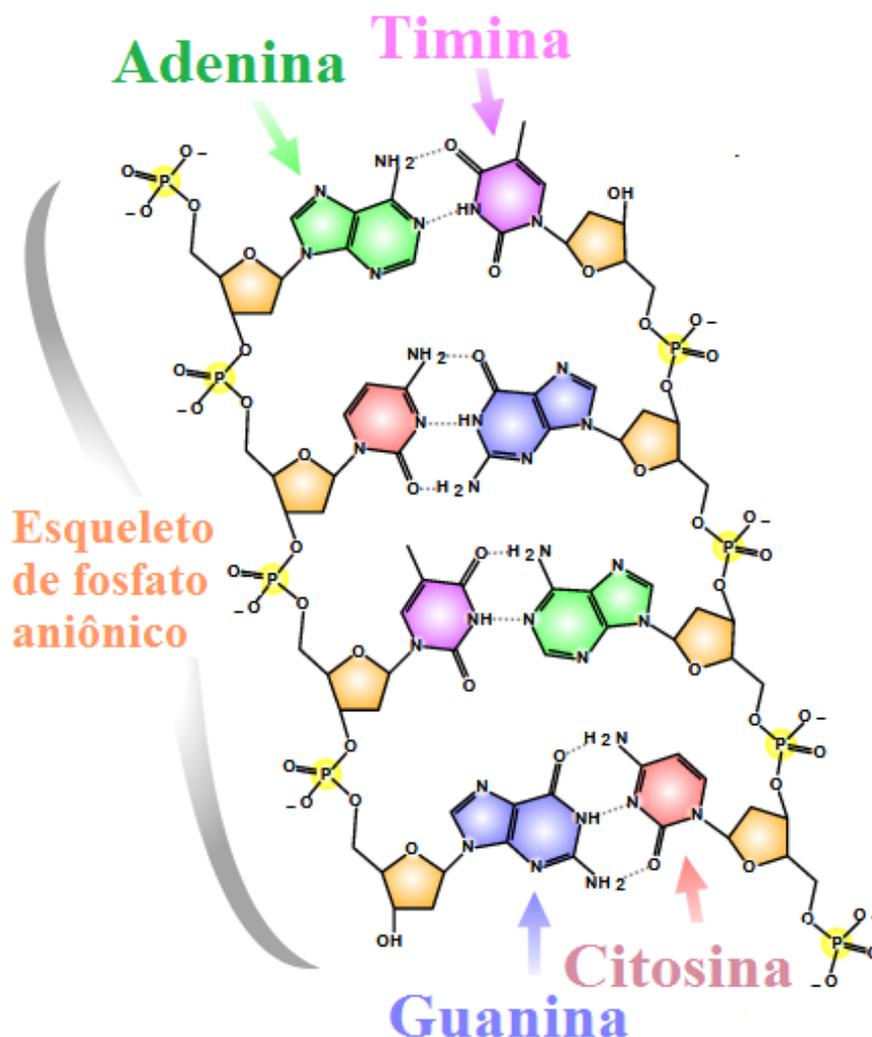


Figura 32: estrutura esquemática do DNA mostrando as interações entre as bases nitrogenadas bem com o esqueleto de fosfato aniônico [167].

Conforme apresentado na Tabela 3, a constante de ligação para a interação da metaloporfirina ZnTMPyP com o DNA é aproximadamente o dobro da constante de ligação associada com a interação da porfirina de base livre TMPyP com o ácido nucléico. Estudos anteriores, mostram que a porfirina ZnTMPyP é capaz de se ligar em regiões mais interiores da dupla hélice devido ao seu caráter catiônico mais evidente que o da forma base livre. Por outro lado, a porfirina TMPyP interage preferencialmente em regiões mais superficiais do DNA

[168]. Recentemente, foi publicado por Tingxiao e colaboradores [169], um trabalho que investiga a interação da porfirina ZnTMPyP com DNA por técnicas de espectroscopia de absorção UV/Vis e de fluorescência em conjunto com dicroísmo circular. Neste artigo, foi demonstrado que, além das interações eletrostáticas com o esqueleto aniônico, a porfirina ZnTMPyP pode se ligar através de coordenação com a base nitrogenada guanina. Dessa forma, acreditamos que a maior facilidade de penetração da porfirina ZnTMPyP na estrutura de dupla hélice pode explicar a maior afinidade dessa porfirina pelo DNA, conforme mostram as constantes de ligação na Tabela 3.

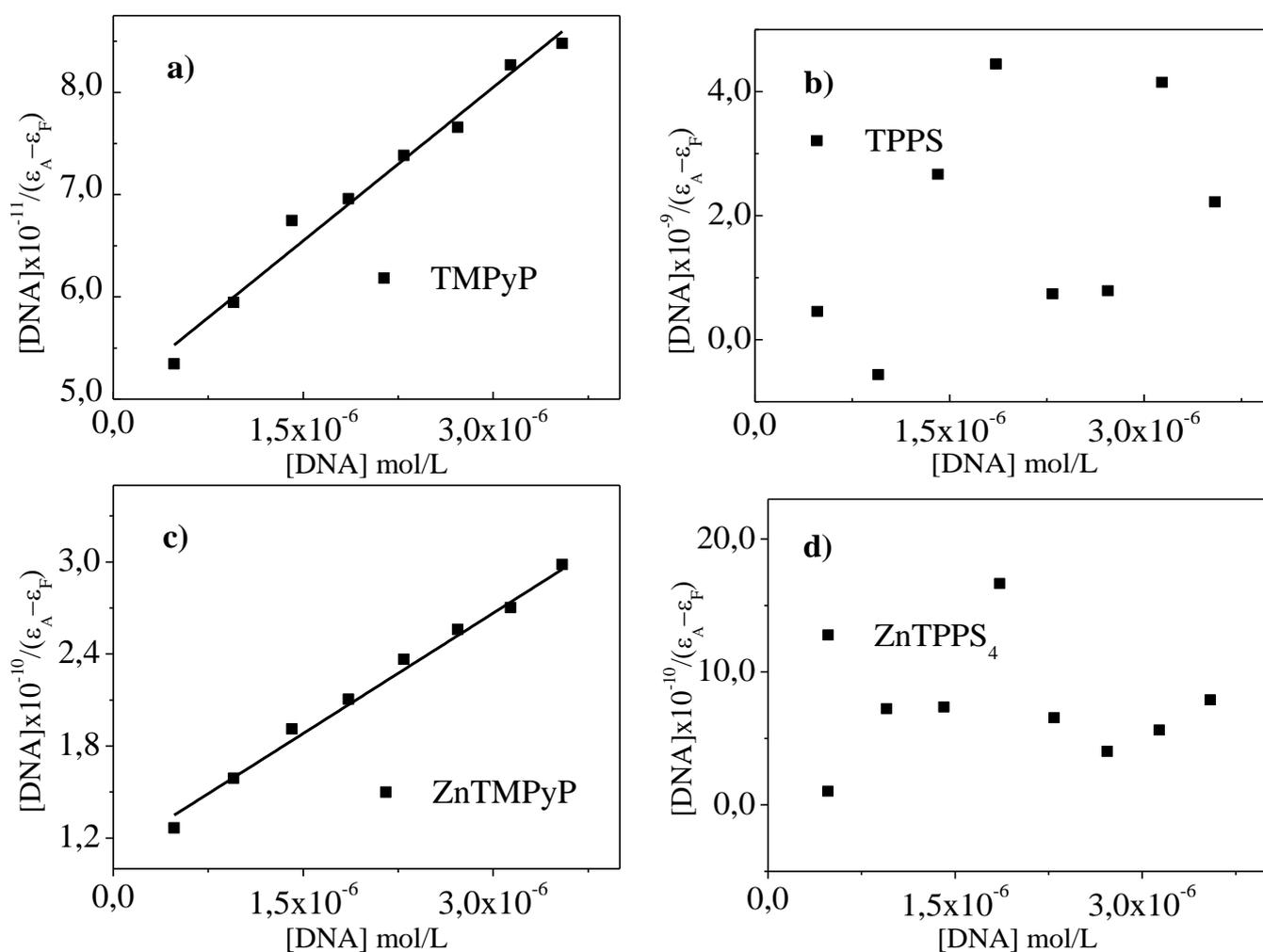


Figura 33: gráficos de  $[DNA]_0 / (\epsilon_{ap} - \epsilon_F)$  em função de  $[DNA]_0$  para as porfirinas TMPyP a), TPPS<sub>4</sub>, ZnTMPyP c) e ZnTPPS<sub>4</sub> d).

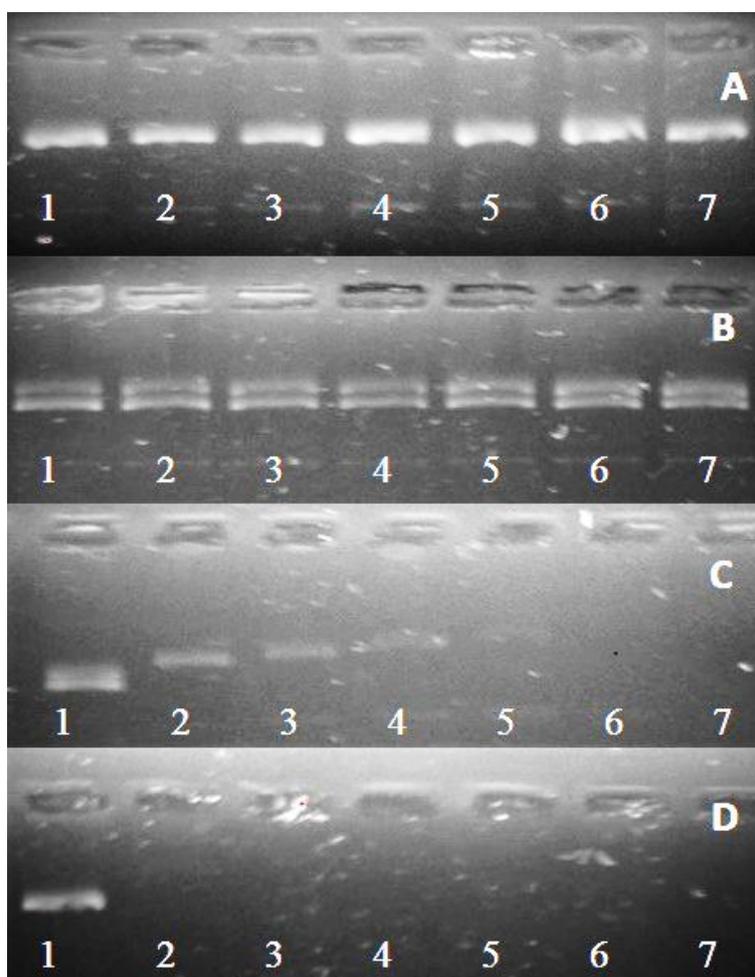
### 5.4.2 Avaliação da fotodegradação do DNA por eletroforese em gel de agarose

A Figura 34 mostra os resultados dos ensaios de fotodegradação do DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Nenhum fotodano ao DNA foi observado nas amostras incubadas com as porfirinas aniônicas TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> (Fig. 34, painéis A e B). O padrão eletroforético das amostras controles (porfirinas-DNA no escuro), apresentados na pista 1 da Figura 34, foi o mesmo para as quatro porfirinas, não mostrando degradação perceptível da molécula alvo. Por outro lado, podemos ver uma fotodegradação completa do DNA após 90 min para as amostras tratadas com TMPyP e até 30 minutos quando tratadas com ZnTMPyP, (painéis C e D). Um padrão eletroforético inesperado do DNA para as amostras tratadas com TMPyP foi observado, onde alíquotas irradiadas por mais tempo demonstraram uma clara redução na intensidade da banda e na taxa de migração do DNA em comparação com o controle não irradiado (painel C, pistas 1-5).

Estes resultados estão em completo acordo com os estudos de afinidade mostrados na Seção 5.4.1. Assim com os espectros de absorção, o padrão eletroforético, sugere que nenhuma interação ocorre entre as porfirinas aniônicas e o DNA. Além disso, os experimentos de eletroforese também mostraram que, a metaloporfirina catiônica possui maior potencial de ataque fotoquímico ao DNA, quando comparada com a TMPyP. Isso ficou evidente devido à fotodegradação completa do DNA tratado com a porfirina ZnTMPyP após 30 min de irradiação, enquanto que a porfirina TMPyP levou 90 min para degradar completamente o DNA.

Consistente com os resultados de afinidade, o maior potencial de fotodegradação do DNA pela metaloporfirina catiônica pode estar relacionado à interação desta molécula com regiões mais interiores da dupla hélice do DNA, conforme indicam também os valores de constantes de ligação apresentados na Tabela 3. Vários estudos tem sugerido uma gama de possíveis tipos de interações porfirina-DNA [160], [164]–[166], onde, as interações eletrostáticas sempre estão no campo da presunção. Neste estudo, mostramos um novo e singular padrão eletroforético de

DNA em gel de agarose (Fig. 34, painel C) que pode explicar tal evidência. A migração do DNA através do gel foi atrasada proporcionalmente ao aumento do tempo de irradiação. O aumento do tempo de irradiação também pode permitir um incremento na taxa de aproximação entre o fotossensibilizador e as moléculas alvo. Como consequência, mais cargas negativas presentes no DNA podem ser neutralizadas por sua interação com grupos catiônicos da porfirina TMPyP, promovendo um carga líquida dependente do tempo de irradiação e causando o padrão eletroforético demonstrado na Figura 34 (painel C, pista 1 a 5).



*Figura 34: ensaio eletroforético de DNA plasmidial em gel de agarose irradiado por diferentes tempos. Nos painéis (A a D) estão as amostras de DNA incubadas com TPPS<sub>4</sub>, ZnTPPS<sub>4</sub>, TMPyP e ZnTMPyP respectivamente. Na pista 1, estão os controles de DNA sem irradiação. Nas pistas de 2 a 7, estão as amostras irradiadas durante 30, 60, 90, 120, 150, 180 min respectivamente.*

Outro parâmetro que reflete com maior clareza o potencial de ataque fotoquímico de um fotossensibilizador é o fluxo de moléculas de oxigênio singleto produzidas. Para obtermos  $n_{1O_2}$ , foi calculado o fluxo fótons absorvidos  $n_{abs}$  pelas porfirinas catiônicas através da Equação 5.11. A Figura 35 apresenta as sobreposições entre os espectros de intensidade de luz absorvida pelas porfirinas catiônicas, com a emissão da lâmpada halógena utilizada para irradiar o sistema.

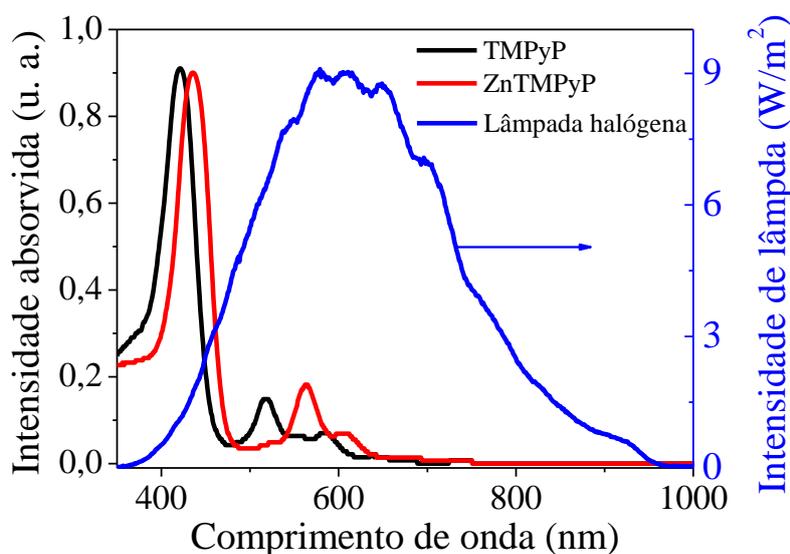


Figura 35: sobreposições entre os espectros das porfirinas catiônicas à  $5\mu\text{mol/L}$  com a emissão da lâmpada halógena ( $130\text{ W/m}^2$ ).

Tabela 4: rendimento quântico de formação de oxigênio singleto, fluxo de fótons absorvidos e número de moléculas de  $^1O_2$  produzidas por segundo pelas porfirinas ZnTMPyP e TMPyP.

	$\Phi_A$	$n_{abs} (\times 10^{14}\text{ s}^{-1})$	$n_{1O_2} (\times 10^{14}\text{ s}^{-1})$
TMPyP	0,74	3,0	2,2
ZnTMPyP	0,78	4,0	3,1

Os valores de rendimentos quânticos de formação de oxigênio singleto, do fluxo de fótons absorvidos e do fluxo de moléculas de oxigênio singleto produzidas estão apresentados na

Tabela 4. O rendimento quântico de formação de oxigênio singleto para a porfirina ZnTMPyP é 5% maior que o rendimento quântico associado à porfirina TMPyP. Esse acréscimo provocado pela inserção do átomo de zinco no anel porfirínico é bastante conhecido na literatura com efeito do átomo pesado. Como já foi mencionado, o zinco no anel central favorece o acoplamento spin-órbita, promovendo um aumento na taxa de cruzamento intersistemas e conseqüentemente um maior rendimento de formação de estados tripleto e de oxigênio singleto. Por outro lado, o valor de  $n_{1O_2}$  para a ZnTMPyP é 41% maior que o mesmo parâmetro para a TMPyP. Os valores dos fluxos  $n_{1O_2}$  também estão em concordância com os resultados dos experimentos de eletroforese, onde ficou evidente que a metaloporfirina catiônica é mais efetiva no ataque fotoquímico ao DNA. Dessa forma, acreditamos que a sinergia dos dois efeitos, afinidade e potencial de ataque fotoquímico, faz com que a porfirina ZnTMPyP seja mais efetiva na degradação das moléculas de DNA.

## 5.5. Conclusões

Os estudos de afinidade de porfirinas com DNA plasmidial e sua fotodegradação, com um padrão eletroforético singular, evidenciaram de forma simples e elegante, a interação eletrostática entre as porfirinas catiônicas (ZnTMPyP e TMPyP) e o DNA. Por outro lado, confirmamos também que as porfirinas aniônicas TPPS<sub>4</sub> e ZnTPPS<sub>4</sub> não se ligam com a biomolécula devido a carga negativa do esqueleto de fosfato aniônico. Além disso, foi demonstrado que a metaloporfirina catiônica ZnTMPyP é a que possui maior potencial de fotodegradação do DNA quando comparada à sua forma base livre TMPyP. A maior efetividade da ZnTMPyP foi atribuída à sinergia entre uma maior afinidade pelo DNA e um maior poder de ataque fotoquímico ao ácido nucléico devido ao maior número de moléculas de oxigênio singleto produzidas.

Como o DNA é, e sempre será um dos alvos mais importantes para as moléculas fotossensibilizadoras utilizadas na PDT, acreditamos que os nossos resultados obtidos neste capítulo contribuem efetivamente para um melhor entendimento dos mecanismos de ação desses fotossensibilizadores no DNA e também em outras macrobiomoléculas.

## Considerações finais

Neste trabalho mostramos através de técnicas espectroscópicas de absorção UV/vis e fluorescência a afinidade das porfirinas *meso*-tetrakis(p-sulfonatofenil) - TPPS<sub>4</sub> e *meso*-tetrakis(4-metilpiridil) – TMPyP pelas proteínas albumina de soro bovino e anticorpos. Conseguimos explicar uma gama de detalhes acerca dessas interações confrontando os resultados obtidos com as características iônicas das duas porfirinas. Além disso, a técnica de supressão de fluorescência em função da temperatura viabilizou a obtenção dos parâmetros termodinâmicos, que são informações valiosas para esclarecer melhor as naturezas das interações estudadas.

Apresentamos também a viabilidade de construção de um potencial sistema (TPPS<sub>4</sub>-MNP) para aplicações em bionanotecnologia e nanomedicina, onde a nanopartícula magnética de maghemita pode ser usada como um carreador da porfirina TPPS<sub>4</sub>. Além disso, as propriedades fluorescentes da porfirina podem ser usadas como sonda fluorescente das nanopartículas para aplicações de fotodiagnósticos. O fotodiagnóstico baseado em imagens de fluorescência tem se tornado um método importante de investigação na prática clínica, particularmente em oncologia, identificando e localizando lesões cancerígenas com precisão [120], [138], [170], [171]. Adicionalmente, a presença do sistema porfirina-MNP em tecidos-alvo permite que as terapias HPT e PDT sejam usadas simultaneamente com efeitos sinérgicos aumentando o dano tumoral com menos efeitos colaterais.

Mostramos ainda, a efetiva ligação entre o DNA plamidal e a porfirina catiônica TMPyP e ZnTMPyP, utilizando técnicas de absorção UV/vis. Através da mesma técnica, mostramos também, que o DNA não se liga a porfirina aniônica TPPS<sub>4</sub> e nem ao seu complexo com zinco ZnTPPS<sub>4</sub>. Os ensaio de eletroforese em gel de agarose, além de corroborarem com os resultados

de afinidades obtidos por espectroscopia de absorção, mostraram que a porfirina ZnTMPyP possui um maior potencial de ataque fotoquímico ao DNA. Além disso, obtivemos um padrão eletroforético singular para a porfirina TMPyP que é, de fato, uma evidência experimental clara do papel das interações eletrostáticas na ligação de moléculas catiônicas ao DNA.

Dessa forma, acreditamos que os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações valiosas que podem contribuir efetivamente no desenvolvimento de novas metodologias com aplicações em terapia fotodinâmica, fotodiagnóstico, inativação fotodinâmica de micro-organismos bem como em sistemas de entrega dirigida de fármacos (*drug delivery systems*).

Este trabalho marca o início uma nova linha de pesquisa no Instituto de Física da UFG, onde se visa avaliar a interação entre moléculas orgânicas fotoativas com biomacromoléculas. É importante ressaltar que a implantação da técnica de supressão de fluorescência em função da temperatura no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física da UFG foi feita por mim, obviamente, sob a orientação do professor Dr. Pablo José Gonçalves, durante o período do meu doutoramento. Além disso, contribuí também com a implantação da técnica de medida química indireta do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete no mesmo laboratório. Dessa forma, acredito que, além da imensa experiência e riquezas de conhecimentos que adquiri durante esta etapa da minha formação pessoal, deixo um legado importante que contribuirá para a formação de outros estudantes que trabalharão no Laboratório de Biofotônica.

Os estudos apresentados neste trabalho é parte de um conjunto mais abrangente de resultados obtidos durante os últimos quatro anos, que foram importantes em diversas colaborações do grupo mas que não foram incluídos nessa tese. Apresentaremos a seguir dois apêndices: no Apêndice A, uma estudo de terapia fotodinâmica antimicrobiana *in vitro* e no Apêndice B um quadro com um breve resumo das atividades desenvolvidas durante este período.

## Apêndice A

### Avaliação do potencial fotodinâmico de porfirinas tetra-rutenadas

#### A.1. Introdução

Neste apêndice foram estudadas algumas propriedades fotofísicas e o potencial fotodinâmico antimicrobiano de dois complexos supramoleculares de porfirinas tetra-rutenadas contendo grupos periféricos de piridina. Foram avaliadas amostras das porfirinas catiônicas *meso*-tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirina (RuTPyP) e *meso*-tetra(4-piridil{bis(2,2'-bipiridina)clororutênio(II)})porfirinatozínco(III) (ZnRuTPyP), conforme ilustrado na Figura 36.

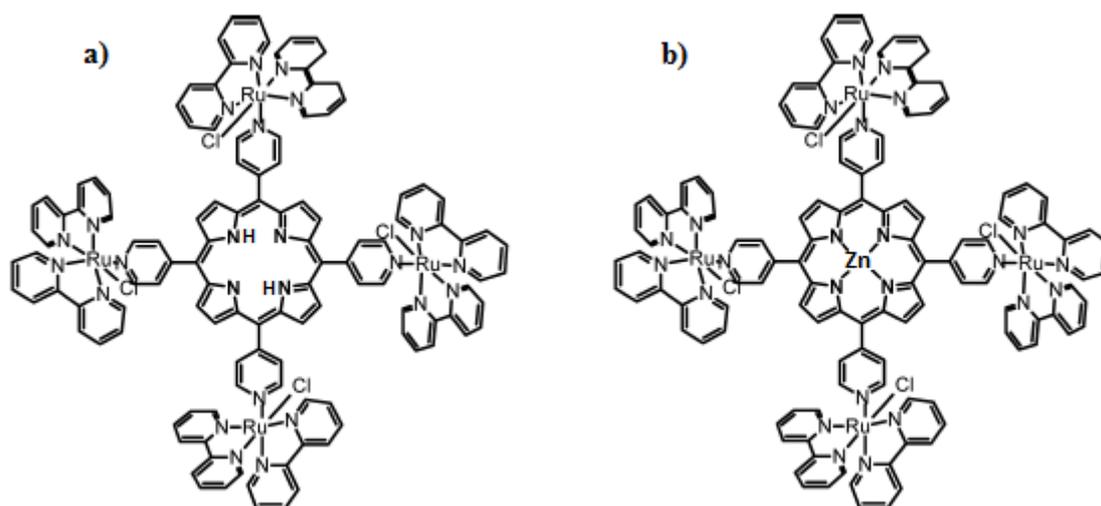


Figura 36: estrutura molecular das porfirina de rutênio em bipiridina RuTPyP a) e ZnRuTPyP b).

Já é bem estabelecido que o anel porfirínico quando irradiado pode gerar espécies reativas de oxigênio capazes de provocar estresse oxidativo suficiente para destruir alvos específicos via PDT. Por outro lado, compostos que contém átomos de rutênio podem possuir características antiangiogênicas e anticancerígenas [172], [173]. Além disso, o interesse pelos

complexos de rutênio também está relacionado a sua versatilidade química de coordenação e afinidade a diversas estruturas biológicas [174]. Dessa forma, a incorporação de átomos de rutênio nas porfirinas pode ser uma valiosa estratégia para aumentar a efetividade terapêutica de ambos compostos em comparação com suas formas isoladas.

A inserção de átomos metálicos no anel central das porfirinas influencia diretamente nas suas propriedades eletrônicas e de estados excitados. A inserção de átomos metálicos de camada *d* incompleta (como ferro e manganês) pode favorecer seu uso como agentes de contraste, pois tais átomos aceleram a desativação eletrônica do seu estado excitado suprimindo tanto a fluorescência como a formação de estados tripletos. Por outro lado, a inserção de átomos com a camada *d* completa (átomos de zinco) favorecem o acoplamento spin-órbita e aumentam a formação de estados tripletos, a produção de oxigênio singleto e conseqüentemente a eficácia fotodinâmica [154].

Dessa forma, o efeito da presença de zinco nas características fotofísicas e fotoquímicas das porfirinas tetrarutenadas RuTPyP e ZnRuTPyP foram obtidos através dos coeficientes de absorção molar, rendimento quântico de fluorescência e formação de oxigênio singleto. Além disso, foi avaliado o potencial de ataque fotoquímico dessas duas porfirinas no tratamento fotodinâmico antimicrobiano *in vitro* contra *Salmonella*, que é uma bactéria de interesse médico mundial associada com diversas manifestações clínicas.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é dividido em duas espécies, *Salmonella bongori* com 23 sorovares conhecidos e *Salmonella enterica*, subdividida em seis subespécies: *S. entérica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizone*, *S. houtenae* e *S. indica*. São bacilos Gram negativos, não produtores de esporos e anaeróbios facultativos. Em humanos, as doenças causadas por *Salmonella* costumam ser divididas em grupos: febre tifóide, causada por *Salmonella Typhi*, febres entéricas, causada por *Salmonella Paratyphi* (A, B, e C) e salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Os sintomas da febre tifóide geralmente são

septicemia, febre alta, diarreia e vômitos. As características clínicas das febres entéricas são semelhantes às da febre tifóide, mas geralmente, são mais brandas com um menor período de incubação [175].

Além da eficácia no tratamento contra microrganismos, a PDT antimicrobiana tem surgido como uma alternativa promissora para o recente problema da resistência bacteriana à antibióticos. Já existem algumas bactérias que são capazes de resistir a praticamente todos tipos de antibióticos, com a KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*), uma bactéria super-resistente, que na maioria dos casos, só é destruída com combinações dos mais poderosos antibióticos atuais [176]. Além da KPC, tem sido observado o surgimento de outras linhagens de bactérias menos agressivas que já adquiriram resistência a qualquer tipo de antibiótico [177], [178]. Dessa forma, existe a preocupação de que essas bactérias transfiram sua resistência para espécies mais letais [179]. Diante desse cenário, a PDT antimicrobiana surge com uma alternativa viável no combate a esses microrganismos super-resistentes, pois o intenso estresse oxidativo em uma diversidade de alvos dentro da célula, faz da PDT um arma poderosa contra a resistência celular.

## **A.2. Experimentos e amostras**

As porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP foram sintetizadas pelo Prof. Dr. Bernardo A. Iglesias, da Universidade Federal de Santa Maria. Para obtermos os coeficientes de absorção molar das porfirinas, foram feitas diluições seriadas a partir de uma solução estoque preparada em DMSO, e os espectros de absorção adquiridos após cada diluição. Para a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete, foram misturadas soluções de porfirinas, com soluções de ácido úrico, previamente preparadas, em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, seguido de irradiação com um módulo laser adquirido da *LaserLine* emitindo 532 nm a 50 mW, sob agitação. A degradação do ácido úrico foi monitorada através dos espectros de

absorção que foram feitos em intervalos de tempos iguais. Esse mesmo protocolo foi realizado para a molécula padrão tetrafenilporfirina (TPP) que possui rendimento quântico de oxigênio singlete conhecido. As medidas de absorção UV/Vis foram realizadas com um espectrofotômetro Hitachi U-2900 descritos previamente na Seção 2.5.

As porfirinas utilizadas nos estudos de potencial fotodinâmico contra *Salmonella*, foram preparadas a uma concentração de 25  $\mu\text{M}$ . O sorovar utilizado apresentou inicialmente  $1.10^6$  UFC/mL e foi incubado, separadamente, com as porfirinas a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$  durante duas horas. Posteriormente, foram irradiados durante 90 minutos por uma lâmpada halógena, emitindo em toda a região do visível, de 470 a 750 nm, com uma intensidade de  $180 \text{ W/cm}^2$ . Para evitar o aquecimento das amostras, foi utilizado um filtro de água acoplado à saída da fonte e a temperatura foi monitorada durante todo o processo.

Durante os 90 minutos de irradiação, foram retiradas amostras em 0, 15, 30, 60 e 90 minutos e plaqueadas em ágar verde brilhante para verificar a contagem bacteriana final. Os experimentos foram realizados em duplicata em duas ocasiões distintas. Foram feitos controles de fototoxicidade no escuro e de irradiação sem qualquer fotossensibilizador para avaliar se ocorreu a inativação do patógeno pela luz.

### **A.3. Resultados e discussões**

#### **A.3.1. Coeficiente de absorção molar $\varepsilon(\lambda)$ e rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ )**

O coeficiente de absorção molar foi obtido através do monitoramento das bandas de absorção do composto em função de sua concentração. De acordo com a lei de Lambert-Beer (Eq. 2.4), em um gráfico da absorção versus concentração da amostra, a inclinação da reta é o produto  $\varepsilon \cdot \ell$  e, uma vez conhecido  $\ell$ , temos o valor de  $\varepsilon$ . A Figura 37 mostra os espectros de absorção da amostras em estudo e no *inset* a curva  $A \times c$ .

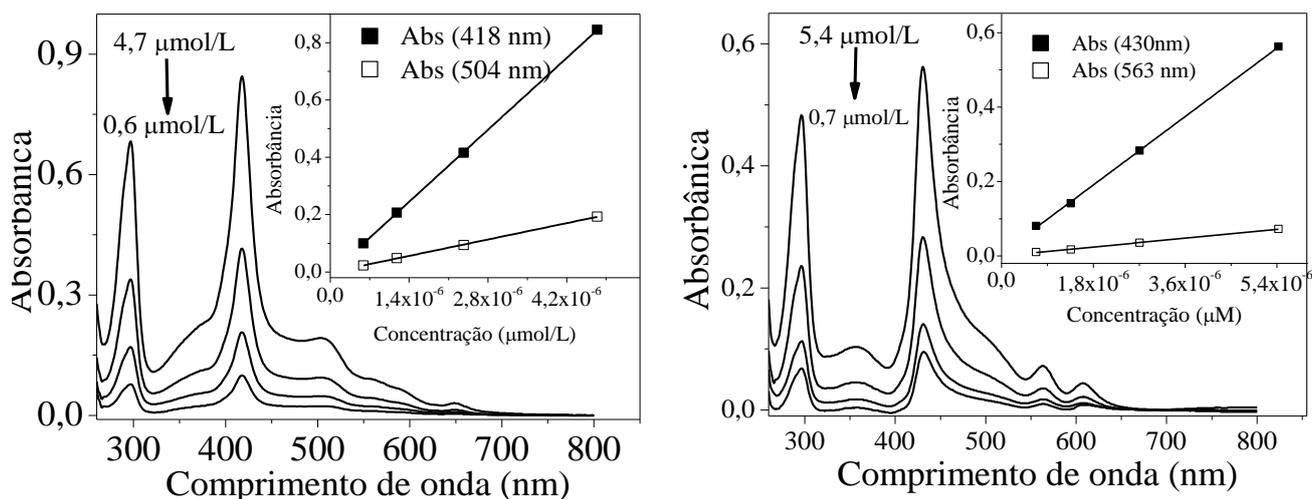


Figura 37: espectros de absorção UV/Vis das porfirinas RuTPyP a) e ZnRuTPyP b) em função da concentração. No inset, os gráficos  $A \times c$  para obtenção do coeficiente de absorção molar.

Este método também permite conhecer a faixa de concentrações em que lei de Lambert-Beer é válida, e ainda observar e evitar possível formação de agregados moleculares ou outros artefatos [180]. Os valores de  $\epsilon$  obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Como já foi mencionado, as principais bandas de absorção nos espectros de porfirinas ocorrem entre 380 - 450 nm (banda B ou banda de Soret) e um outro conjunto de duas (metaloportirinas) ou quatro bandas (porfirinas de base livre) entre 500 - 650 nm (bandas Q). Os espectros apresentados na Figura 37 demonstram que as porfirinas de rutênio possuem essa estrutura com algumas alterações na posições dos pico e intensidades relativas. A banda com absorção próxima à 296 nm observada nos espectros RuTPyP e ZnRuTPyP e é atribuída às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  nos ligantes bipyridil do complexo de rutênio (II).

Tabela 5: coeficiente de absorção das porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP

RuTPyP			ZnRuTPyP		
$\epsilon_{418}/10^5$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\epsilon_{504}/10^4$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\Phi_F$	$\epsilon_{430}/10^5$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\epsilon_{563}/10^4$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	$\Phi_F$
1,79	4,08	0,0003	1,02	1,32	0,0008

O cálculo do rendimento quântico de fluorescência foi feito através da Equação 2.8 apresentada no Capítulo 2. Utilizamos como padrão a porfirina TPP, cujo rendimento quântico

de fluorescência em DMSO é conhecido ( $\Phi_R = 0,13$ ) [181]. Os espectros de fluorescência para as porfirinas RuTPyP, ZnRuTPyP e TPP utilizados nos cálculos de rendimento quântico de fluorescência são apresentados na Figura 38 e os respectivos valores de rendimentos quânticos estão na Tabela 5.

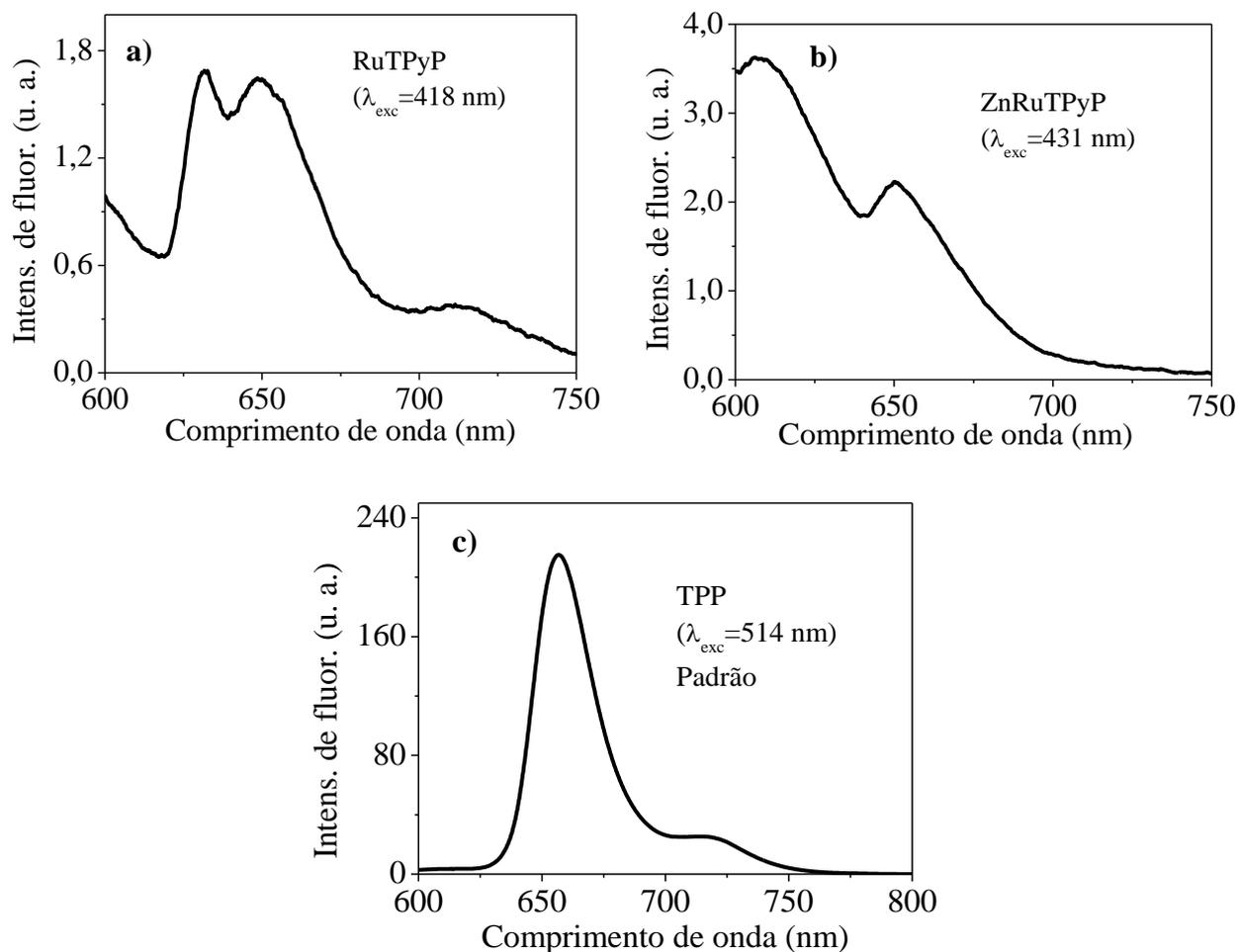


Figura 38: espectros de emissão fluorescente para as porfirinas RuTPyP a), ZnRuTPyP b) e TPP c) utilizados nos cálculos de rendimento quântico de fluorescência.

A coordenação com complexos bipyridílicos de Ru (II) induz uma redução dramática dos rendimentos quânticos de fluorescência (Tabela 5). Este efeito pode estar associado ao aumento da flexibilidade da molécula, o que também aumenta a probabilidade de desativação não-radiativa do estado de  $S_1$  do composto e/ou a extinção do estado de  $S_1$  devido ao efeito do átomo pesado de rutênio [182].

### A.3.2. Cálculo do rendimento quântico de formação de oxigênio singleto ( $\Phi_A$ )

Como já foi mencionado na introdução desse trabalho, o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto pode ser determinado por métodos diretos, que se baseiam na detecção da emissão do oxigênio singleto devido ao seu retorno ao estado fundamental, ou ainda, por métodos químicos indiretos, que utilizam moléculas orgânicas antioxidantes como sensores químicos. Um método indireto, bastante prático, de determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto está descrito em [27] e também em [28]. Este método consiste em misturar soluções de moléculas orgânicas, que agem como sensores químicos de  $^1\text{O}_2$ , em soluções de fotossensibilizadores, seguido de irradiação luminosa, sob agitação magnética. A fotodegradação do sensor é monitorada através das alterações espectros de absorção do sensor que são realizados em intervalos de tempos regulares de irradiação. Esse mesmo experimento também é realizado para um fotossensibilizador padrão que possui rendimento quântico de oxigênio singleto conhecido.

Assumindo que a cinética de fotodegradação dos sensores pelo oxigênio singleto é de primeira ordem, devido à natureza estacionária do processo e à grande quantidade de oxigênio molecular dissolvido nos solventes, podemos obter a constante de degradação do sensor ( $k$ ) pela Equação A.1.

$$\ln[S] = \ln[S_0] - k \cdot t \quad \text{A.1}$$

onde  $[S_0]$  e  $[S]$  são as concentrações do sensor antes e após irradiação respectivamente. Essas concentrações podem ser, obviamente, racionadas com a absorção através da lei de Lambert-Beer de forma que a Equação A.1 pode ser reescrita como:

$$\ln(A(S)) = \ln(A(S_0)) - k \cdot t \quad \text{A.2}$$

e, dessa forma, o coeficiente angular de um gráfico de  $\ln(A(S))$  em função do tempo de reação ( $t$ ) fornece o valor da constante de degradação do sensor.

Outro parâmetro que é diretamente proporcional ao rendimento quântico de formação de oxigênio singlete é a eficiência de formação de oxigênio singlete definida por:

$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k}{N_{abs}} \quad \text{A.3}$$

De acordo com essa equação, em um gráfico de  $k$  versus  $N_{abs}$  a inclinação corresponde a eficiência  $\gamma_{\Delta}$ , e de posse dessa eficiência podemos obter o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete por:

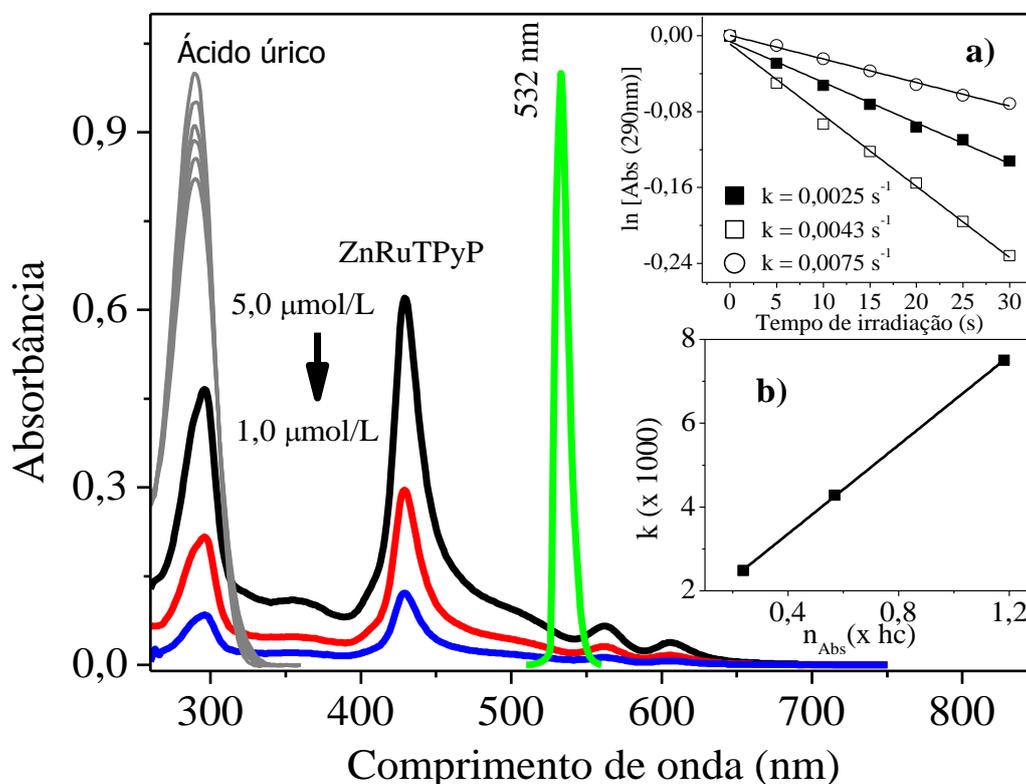
$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^0 \frac{\gamma_{\Delta}}{\gamma_{\Delta}^0} \quad \text{A.4}$$

onde o sobrescrito zero rotula os parâmetros referentes ao fotossensibilizador padrão.

Para o cálculo do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete das porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP utilizamos a molécula orgânica ácido úrico (AU) como sensor de  $^1\text{O}_2$ . O ácido úrico é um excelente antioxidante e, por isso, tem sido amplamente utilizado como reagente para a determinação química do rendimento de  $^1\text{O}_2$  [29], [183], [184]. Uma das vantagens de utilizar AU é que a sua absorção ocorre próximo a 290 nm, no ultravioleta, ou seja, não é diretamente afetado pela luz de fotoexcitação da maioria das porfirinas.

A Figura 39 apresenta os espectros de absorção da porfirina ZnRuTPyP, em três concentrações diferentes, sobrepostos ao espectro normalizado de emissão do laser verde ( $\lambda = 532$  nm) utilizado para irradiar a amostra e também são apresentadas as alterações nos espectros de absorção do AU na presença da porfirina ZnRuTPyP, sob irradiação. No *inset* a) são apresentadas as constantes de degradação, obtidas de acordo com a Equação A.2, para as três concentrações de ZnRuTPyP. De posse dos valores das taxas de degradação, foi obtida a

eficiência de formação de  $^1\text{O}_2$  através da inclinação da reta apresentada no gráfico do *inset b*). Este mesmo tratamento (não apresentado) foi realizado para a RuTPyP e para a porfirina TPP ( $\Phi_A = 0,52$  [181]), utilizada como padrão.



*b*Figura 39: espectro de emissão do laser verde sobreposto aos espectros de absorção de ZnRuTPyP para três concentrações (5,0  $\mu\text{mol/L}$ , 2,5  $\mu\text{mol/L}$  e 1,0  $\mu\text{mol/L}$ ), e a banda de AU mostrando as degradações promovidas pela ZnRuTPyP à 5,0  $\mu\text{mol/L}$ . No inset a) estão as constantes de degradação do AU e em c) o gráfico para a obtenção da eficiência de formação de  $^1\text{O}_2$ .

Os valores da eficiência  $\gamma_A$  e do rendimento quântico de formação de  $^1\text{O}_2$  para as porfirinas RuTPyP, ZnRuTPyP e TPP estão apresentados na Tabela 6. O rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  associado à porfirina com zinco em seu anel central é muito maior que o da porfirina de base livre. Esse resultado pode ser justificado pelo efeito do átomo pesado. O átomo de zinco no anel central favorece o acoplamento spin-orbita, e essa condição aumenta a taxa de cruzamento intersistemas (CIS) e, conseqüentemente, o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto também aumenta.

Tabela 6: eficiência e rendimento quântico de formação de oxigênio singleto para as porfirinas TPP, RuTPyP e ZnRuTPyP.

FS	$\gamma_{\Delta}$	$\Phi_{\Delta}$
TPP	0,0076	0,52 [181]
RuTPyP	0,00029	0,02
ZnRuTPyP	0,0053	0,36

### A.3.3. Atividade fotodinâmica contra *Salmonella*

A partir da Equação 5.12, podemos calcular o número de moléculas de oxigênio singleto produzidas por um fotossensibilizador por segundo. Para obtermos  $n_{1O_2}$ , foi calculado o fluxo fótons absorvidos pelas porfirinas através da Equação 5.11. A Figura 40 apresenta as sobreposições entre os espectros de intensidade luz absorvida pelas porfirinas investigadas (25  $\mu\text{mol/L}$ ), com a emissão da lâmpada halógena (180  $\text{W/cm}^2$ ) utilizada para irradiar o sistema.

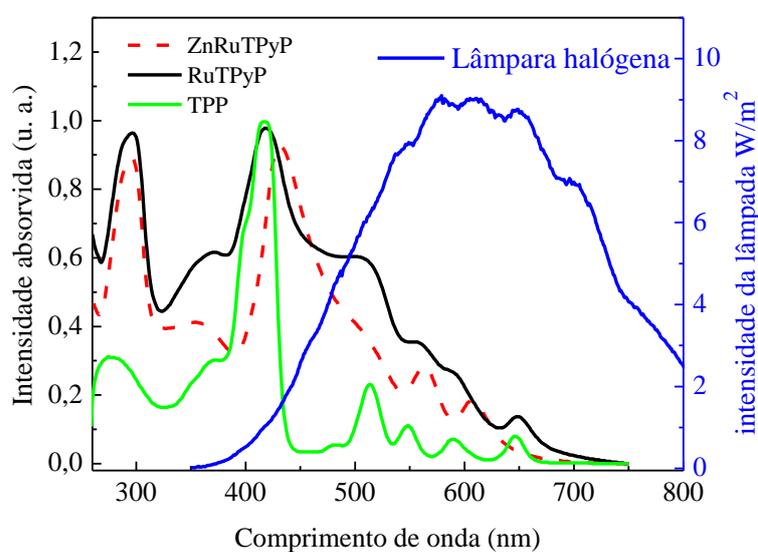


Figura 40: sobreposições espectrais para o cálculo do número de fótons absorvidos.

Os valores do fluxo fótons absorvidos e o número de moléculas de oxigênio singleto produzidas por segundo pelas porfirinas TPP, RuTPyP e ZnRuTpyP estão apresentados na Tabela 7. Podemos ver que, dentre as porfirinas de rutênio, a porfirina ZnRuTPyP produz 14

vezes mais moléculas de oxigênio singleto em comparação com a porfirina RuTPyP e, por isso, apresenta maior potencial fotodinâmico.

Tabela 7: fluxo de fótons absorvidos e número de moléculas de  $^1O_2$  produzidas por segundo pelas porfirinas TPP, ZnRuTPyP e RuTPyP.

FS	$n_{abs} (10^{14} s^{-1})$	$n_{^1O_2} (\times 10^{14} s^{-1})$
TPP	8,3	4,3
RuTPyP	22	0,44
ZnRuTPyP	17	6,1

A Figura 41 mostra a efetividade do tratamento fotodinâmico contra *Salmonella* pelas porfirinas, à 25  $\mu\text{mol/L}$ . Pode-se observar que a porfirina de rutênio RuTPyP produz menos moléculas de oxigênio singleto e, de fato, ela também é menos efetiva no tratamento fotodinâmico quando comparada com a ZnRuTPyP. No entanto, a porfirina TPP produz 10 vezes mais moléculas de oxigênio singleto que a RuTPyP e, por outro lado, praticamente não apresenta efetividade no tratamento fotodinâmico. Este resultado evidencia que a efetividade no tratamento fotodinâmico depende de outros fatores, além do potencial de ataque fotoquímico representado pelo número de moléculas de oxigênio singleto produzidas.

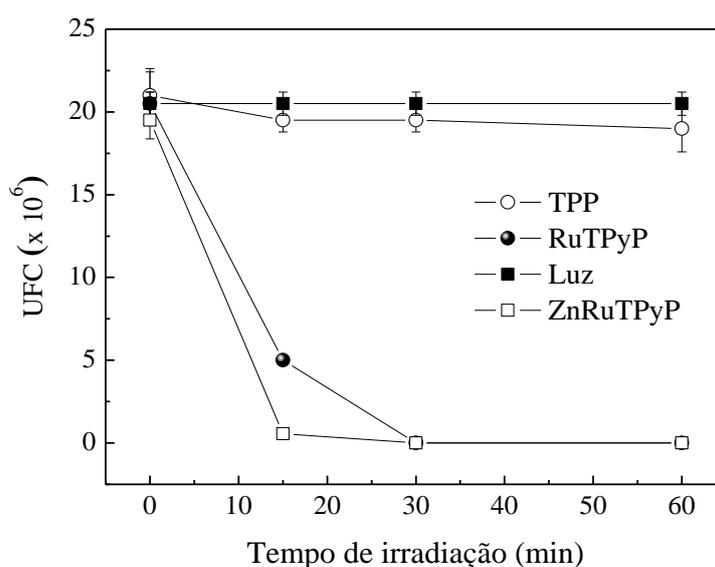


Figura 41: unidades formadoras de colônia (UFC) em função do tempo de irradiação.

Os resultados mostram que as cargas das porfirinas tem um papel importante na efetividade do tratamento fotodinâmico contra *Salmonella*. Compostos hidrofílicos com um baixo peso molecular podem difundir-se através dos poros na membrana da bactéria [185], [186]. Embora a TPP apresente menor peso molecular em comparação com as porfirinas rutenadas, sua hidrofobicidade pode ter impedido sua difusão através dos poros, tornando-se ineficaz na eliminação desse patógeno em comparação com os outros fotossensibilizadores utilizados. Além disso, devido à sua estrutura química não carregada, a TPP apresenta uma clara desvantagem na interação com biomoléculas alvo expostas na membrana bacteriana externa, onde são encontrados, principalmente, grupos carregados negativamente. Dessa forma, comparativamente, uma melhor eficiência das rutenadas catiônicas foi observada durante os ensaios de efetividade fotodinâmica.

#### **A.4. Conclusões**

Através do uso da técnica de absorção UV-vis medimos o coeficiente de absorção molar, o número de fótons absorvido, rendimento quântico de formação de oxigênio singleto e o número de moléculas de oxigênio singleto formadas pelas porfirinas tetra-rutenadas RuTPyP e ZnRuTPyP. Os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singleto para as porfirias RuTPyP e ZnRuTPyP foram 2% e 35% respectivamente, onde atribuímos essa acentuada diferença ao efeito do átomo pesado. O efeito do átomo pesado tem sido, de fato, associado ao aumento do rendimento quântico de formação de oxigênio singleto de diversas moléculas fotossensíveis [187]–[189]. A porfirina RuTPyP é a que produz a menor quantidade de moléculas de oxigênio singleto, dentre as três avaliadas. Os ensaios de efetividade no tratamento fotodinâmico mostraram que, de fato, essa porfirina é menos efetiva que a ZnRuTPyP mas, por outro lado, é dramaticamente mais efetiva que a TPP. Dessa forma, ficou claro que, a

efetividade no tratamento fotodinâmico também está relacionada com perfil catiônico das porfirinas rutenadas.

Obviamente, um melhor explicação para a efetividade do tratamento fotodinâmico dessas porfirinas deve envolver ainda outros parâmetros que não foram o foco deste apêndice. Acreditamos portanto que, as porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP, apresentam características fotodinâmicas adequadas para serem utilizadas com sucesso em PDT. No entanto, outros parâmetros relativos ao potencial anticancerígeno e antiangiogênico, atribuídos aos átomos de rutênio, devem ser avaliados para uma compreensão global da real funcionalidade dessas moléculas como sistemas multiterapêuticos.

## Apêndice B

### Atividades desenvolvidas e perspectivas futuras

Como mencionado previamente, os estudos apresentados nesta tese são parte de um conjunto mais abrangente de resultados, obtidos durante os últimos quatro anos que foram importantes em diversas colaborações do grupo porém que não foram incluídos nessa tese. Apresentaremos a seguir um quadro abaixo com um breve resumo das atividades desenvolvidas durante este período:

		Atividades desenvolvidas
<b>Interações</b>	Apresentados no corpo desta tese.	1. Avaliação das interações das porfirinas TMPyP e TPPS <sub>4</sub> com imunoglobulinas.
		2. Estudo das interações das porfirinas TMPyP e TPPS <sub>4</sub> com albumina de soro bovino.
		3. Estudo dos parâmetros de ligação envolvidos na interação de DNA Plasmidial com as porfirinas TPPS <sub>4</sub> , ZnTPPS, TMPyP e ZnTMPyP utilizando técnicas de absorção UV/Vis.
		4. Estudo das interações das porfirinas TPPS <sub>4</sub> , TMPyP e ZnTMPyP com nanopartículas magnéticas.
	Trabalho concluído que não foi apresentado na tese final.	5. Estudo das afinidades das porfirinas TPPS <sub>4</sub> , TMPyP, ZnTPPS e ZnTMPyP por membranas de eritrócitos utilizando as técnicas de fluorescência estática e resolvida no tempo.
<b>Caracterizações</b>	Apresentados no corpo desta tese (apêndice).	6. Caracterização fotofísica e fotoquímica (coeficiente de absorção molar, rendimentos quânticos de fluorescência e oxigênio singleto) das porfirinas RuTPyP e ZnRuTPyP.
	Trabalhos em andamento em parceria com prof. Dr. G. R. Lino	7. Medidas de emissão fluorescente da hematoporfirina em um potencial sistema para diagnóstico de herpesvírus bovino tipo 1.
		8. Formulação de um creme-gel com potencial atividade de inativação fotodinâmica de microrganismos.
	Trabalho em andamento em parceria com prof. Dr. A. F. Bakusis	9. Medidas de absorção UV/Vis e emissão fluorescente em um sistema nanocarreador multifuncional.

Trabalho em andamento em parceria com prof <sup>a</sup> . Dra. T. D. Martins	10. Avaliação da atividade antioxidante em nanoestruturas peptídicas.
Trabalho em andamento	11. Cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete para as porfirinas TMPyP e TPPS <sub>4</sub> e seus complexos com zinco.

Os tópicos de 1 até 6 apresentados no quadro de atividades, envolve os temas centrais, diretamente relacionados com as principais investigações desenvolvidas no doutorado. Dessa forma, para o corpo da tese, foram abordados os estudos envolvendo as interações de porfirinas com proteínas, DNA plasmidial e nanopartículas magnéticas.

Tivemos ainda três trabalhos publicados e um submetido, que foram desdobramentos dos estudos apresentados no quadro de atividades, além de outros dois que estão em fase final de preparação. Diversos trabalhos, diretamente relacionados com os temas investigados, foram apresentados em congressos e *workshops* na forma de painéis e comunicações orais. O quadro abaixo mostra os trabalhos publicados e os principais trabalhos apresentados.

<b>Tópicos Relacionados</b>	<b>Artigos Publicados</b>
4	<i>Use of Spectroscopic Techniques for Evaluating the Coupling of Porphyrins on Biocompatible Nanoparticles. A Potential System for Photodynamics, Theranostics, and Nanodrug Delivery Applications.</i> Autores: L. N. Magno, <u>F. C. Bezerra</u> , L. E. S. Freire, R. A. Guerra, A. F. Bakuzis e P. J. Gonçalves. The Journal of Physical Chemistry. A, v. 121, p. 1924-1931, 2017.
6	<i>Diagnóstico Fotodinâmico: Princípios e Aplicações.</i> Autores: Oliveira, Taise Maria dos Anjos; Teles, Amanda Vargas; <u>Bezerra, Fábio de Castro</u> ; Gonçalves, Pablo José; De Souza, Guilherme Rocha Lino Enciclopédia Biosfera, v. 11, p. 976-1000, 2015.
9	<i>Photodynamic inactivation of Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) by porphyrins.</i> Autores: Teles A.V., Oliveira T.M.A, <u>Bezerra F.C.</u> , Alonso L, Alonso A, Borissevitch I.E, Gonçalves P.J, Souza G.R.L. Journal of General Virology, v. 99, p. 1301-1306, 2018.
<b>Artigo submetido e já revisado aguardando resposta final do editor</b>	
2	<i>Effects of bovine serum albumin (BSA) on the photophysical characteristics of meso-tetrakis(p-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS<sub>4</sub>).</i> Autores: P. J. Gonçalves, <u>F. C. Bezerra</u> , L. M. Almeida, L. Alonso, A. Alonso, S. C. Zílio, I. E. Borissevitch

<b>Artigos em fase de preparação</b>	
<b>6</b>	<i>Tetra-ruthenated porphyrins: Photophysical investigation, BSA photo-oxidation study of and its photoinactivation toward Salmonella typhimurium.</i> Autores: Lucas B. Menezes, <u>Fábio C. Bezerra</u> , Amanda V. Teles, Kamilla Moraes Alves, Lais Alonso, Antonio Alonso, Iouri E. Borissevitch, Guilherme R. Lino, Maria Auxiliadora Andrade, Pablo J. Gonçalves, Bernardo A. Iglesias.
<b>4</b>	<i>Effects of Zinc Complex in Charged Porphyrins on the photo-degradation of macromolecules and membranes models.</i> Autores: L. Alonso, <u>F. C. Bezerra</u> , A. V; Telles, G, R. Lino, L. M. Almeida, A. Alonso, S. C. Zílio, I. E. Borissevitch, P. J. Gonçalves.
<b>Depósito de pedido de Patente</b>	
<b>7</b>	<i>Desinfecção de sêmen por fotossensibilizadores e imunocombinados</i> Inventores: Oliveira, Taise Maria dos Anjos; De Souza, Guilherme Rocha Lino Teles, Gonçalves, Pablo José; Amanda Vargas; <u>Bezerra, Fábio de Castro</u> ; Brazil, Denize Silva
<b>Principais trabalhos apresentados</b>	
<b>2</b>	Apresentação Oral: <i>Efeitos da Interação com Albumina de Soro Bovino sobre as Características dos Estados Excitados da Porfirina meso-Tetrakis(P-Sulfonatophenyl).</i> Autores: <u>F. C. Bezerra</u> , L. M. Almeida, L. Alonso, A. Alonso, S. C. Zílio, I. E. Borissevitch, P. J. Gonçalves. <b>I Workshop de Física Aplicada à Medicina e Biologia</b>
<b>4</b>	Apresentação Oral: <i>Use of Spectroscopic Techniques for Evaluating the Coupling of Porphyrins on Biocompatible Nanoparticles. A Potential System for Photodynamics, Theranostics, and Nanodrug Delivery Applications.</i> Autores: Magno, Lais N., <u>Bezerra, Fábio C.</u> , Freire, Luiz Eduardo S., Guerra, Rubens A., Bakuzis, Andris F., Gonçalves, Pablo J. <b>I Workshop do programa de Pós-Graduação em Física</b>
<b>2</b>	Painel: <i>Termodinâmica da Interação de Duas Porfirinas Hidrossolúveis com Albumina de Soro Bovino.</i> Autores: <u>Fábio de Castro Bezerra</u> , Iouri Evgenievitch Borissevitch, Pablo José Gonçalves. <b>5º Encontro de Física do Centro-Oeste</b>
<b>6</b>	Apresentação Oral: <i>Avaliação do Potencial Fotodinâmico de Porfirinas Tetra-Rutenadas.</i> Autores: <u>F. C. Bezerra</u> , A. V. Teles, L. B. Menezes, B. A. Iglesias, M. A. Andrade, G. R. L. Souza, P. J. Gonçalves. <b>XXXIII Semana da Física</b> <b>“PRÊMIO DE MELHOR COMUNICAÇÃO ORAL”</b>

Como perspectivas futuras, pretendemos ainda, através de acordos de colaboração, realizar *docking* molecular, que são investigações teóricas sobre as interações das porfirinas com as macromoléculas biológicas, e dessa forma, esclarecer melhor o perfil dessas interações. Pretendemos também, dar continuidade aos trabalhos em andamento que estão apresentados

nos tópicos de 7 até 10 do quadro de atividades. Com relação ao tema 7, pretendemos realizar estudos de interações da hematoporfirina com anticorpos reativos ao Herpes vírus bovino, para explicar melhor os resultados, já obtidos, de inativação desse vírus em sêmen bovino. Quanto ao tema 8, pretendemos fazer outras formulações com concentrações variadas de fotossensibilizadores e diferentes viscosidades para determinar a condição ótima do creme-gel na inativação de papiloma em bovinos. Os temas 9 e 10 estão nas fases iniciais de investigações e, dessa forma, pretendemos realizar novas medidas de absorção Uv-vis e emissão fluorescente, para estabelecer controles e protocolos adequados.

## Referências

- [1] I. E. Borissevitch, T. T. Tominaga, H. Imasato, and M. Tabak, “Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation,” *J. Lumin.*, vol. 69, no. 2, pp. 65–76, Sep. 1996.
- [2] M. Makarska-Bialokoz, “Interactions of hemin with bovine serum albumin and human hemoglobin: A fluorescence quenching study,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 193, pp. 23–32, 2018.
- [3] T. M. Allen and P. R. Cullis, “Drug delivery systems: entering the mainstream.,” *Science*, vol. 303, no. 5665, pp. 1818–22, Mar. 2004.
- [4] F. Kratz and U. Beyer, “Serum Proteins as Drug Carriers of Anticancer Agents: A Review,” *Drug Deliv.*, vol. 5, no. 4, pp. 281–299, Jan. 1998.
- [5] V. V. Zarubaev, T. C. Kris’ko, E. V. Kriukova, and T. D. Muraviova, “Effect of albumin on the fluorescence quantum yield of porphyrin -based agents for fluorescent diagnostics,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 20, pp. 137–143, Dec. 2017.
- [6] M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, L. T. Rosenblum, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, “Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 12, pp. 1685–1691, Dec. 2011.
- [7] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría, “Magnetic nanoparticles for drug delivery,” *Nano Today*, vol. 2, no. 3, pp. 22–32, Jun. 2007.
- [8] Y. Li *et al.*, “A smart and versatile theranostic nanomedicine platform based on nanoporphyrin,” *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 4712, Dec. 2014.
- [9] F. U. Rehman, C. Zhao, H. Jiang, and X. Wang, “Biomedical applications of nano-titania in theranostics and photodynamic therapy,” *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 40–54, Dec. 2016.
- [10] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fähling, and Roland Felix, “Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of

- biocompatible superparamagnetic nanoparticles,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 201, no. 1–3, pp. 413–419, Jul. 1999.
- [11] C. S. S. R. Kumar and F. Mohammad, “Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 9, pp. 789–808, Aug. 2011.
- [12] T. J. Dougherty *et al.*, “Photodynamic Therapy,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, no. 12, pp. 889–905, Jun. 1998.
- [13] O. Raab, “Effect of fluorescent substances on Infusoria,” *Z. Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 524–546, 1900.
- [14] R. M. Szeimies *et al.*, “Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 47, no. 2, pp. 258–262, 2002.
- [15] S. T. Kim, D. Y. Kang, J. S. Kang, J. W. Baek, Y. S. Jeon, and K. S. Suh, “Photodynamic therapy with methyl-aminolaevulinic acid for mycosis fungoides,” *Acta Derm. Venereol.*, vol. 92, no. 3, pp. 264–268, 2012.
- [16] B. Valeur, *Molecular fluorescence : principles and applications*. Wiley-VCH, 2002.
- [17] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, May 2003.
- [18] M. Garcia-Diaz, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, “Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy,” *Methods*, vol. 109, pp. 158–166, Oct. 2016.
- [19] A. C. Tedesco, F. L. Primo, and P. da C. C. de Jesus, “Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers,” *Multifunct. Syst. Comb. Deliv. Biosensing Diagnostics*, pp. 9–29, Jan. 2017.
- [20] K. M. Smith and J. E. Falk, *Porphyrins and metalloporphyrins : a new edition based on the original volume by J.E. Falk*. Elsevier Scientific Pub. Co, 1975.
- [21] I. J. Macdonald and T. J. Dougherty, “Basic principles of photodynamic therapy,” *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 05, no. 02, pp. 105–129, Feb. 2001.

- [22] R. Bonnett, "Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 24, no. 1, p. 19, Jan. 1995.
- [23] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–23, Mar. 2005.
- [24] J. M. Dąbrowski, "Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation," *Adv. Inorg. Chem.*, vol. 70, pp. 343–394, Jan. 2017.
- [25] S. G. Nunez, *Pdt-terapia fotodinamica antimicrobiana na odontologia*. Elsevier Mosby, 2015.
- [26] M. S. Baptista *et al.*, "Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways," *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, no. 4, pp. 912–919, Jul. 2017.
- [27] J. A. Bonacin, F. M. Engelmann, D. Severino, H. E. Toma, and M. S. Baptista, "Singlet oxygen quantum yields ( $\Phi_d$ ) in water using beetroot extract and an array of LEDs," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 20, no. 1, pp. 31–36, 2009.
- [28] A. P. Gerola *et al.*, "Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 232, pp. 14–21, Mar. 2012.
- [29] C. Fracalossi *et al.*, "Singlet oxygen production by combining erythrosine and halogen light for photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans*," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 15, pp. 127–132, Sep. 2016.
- [30] Y. Zheng *et al.*, "Synthesis, singlet oxygen generation, photocytotoxicity and subcellular localization of azobisporphyrins as potentially photodynamic therapeutic agents *in vitro* cell study," *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 21, no. 02, pp. 122–127, Feb. 2017.
- [31] I. Kruk, T. Michalska, and A. Kładna, "Formation of singlet oxygen during farmorubicin oxidation," *Chemosphere*, vol. 44, no. 7, pp. 1565–71, Sep. 2001.
- [32] L. Spencer Lima, "Lei de Lambert–Beer," *Rev. Ciência Elem.*, vol. 1, no. 1, Dec. 2013.
- [33] D. F. Swinehart, "The Beer-Lambert Law," *J. Chem. Educ.*, vol. 39, no. 7, p. 333, Jul.

1962.

- [34] M. D. P. T. Sotomayor, I. L. T. Dias, M. R. V. Lanza, A. B. Moreira, and L. T. Kubota, “Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas,” *Quim. Nova*, vol. 31, no. 7, pp. 1755–1774, Jan. 2008.
- [35] J. R. Lakowicz, Ed., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [36] J. Yin, Y. Hu, and J. Yoon, “Fluorescent probes and bioimaging: alkali metals, alkaline earth metals and pH,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 14, pp. 4619–4644, 2015.
- [37] Z. Tian *et al.*, “Spectroscopic study on the interaction between mononaphthalimide spermidine (MINS) and bovine serum albumin (BSA),” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 142, pp. 103–109, Jan. 2015.
- [38] M. I. Halawa, W. Gao, M. Saqib, S. A. Kitte, F. Wu, and G. Xu, “Sensitive detection of alkaline phosphatase by switching on gold nanoclusters fluorescence quenched by pyridoxal phosphate,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 95, pp. 8–14, Sep. 2017.
- [39] L. N. Magno, F. C. Bezerra, L. E. S. Freire, R. A. Guerra, A. F. Bakuzis, and P. J. Gonçalves, “Use of Spectroscopic Techniques for Evaluating the Coupling of Porphyrins on Biocompatible Nanoparticles. A Potential System for Photodynamics, Theranostics, and Nanodrug Delivery Applications,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 121, no. 9, pp. 1924–1931, Mar. 2017.
- [40] W. F. Falco *et al.*, “Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 299, pp. 203–209, Feb. 2015.
- [41] P. J. Gonçalves *et al.*, “Effects of interaction with CTAB micelles on photophysical characteristics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 181, no. 2–3, pp. 378–384, Jul. 2006.
- [42] HILL and A. V., “The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves,” *J. Physiol.*, vol. 40, pp. 4–7, 1910.
- [43] R. W. Congdon, G. W. Muth, and A. G. Splittgerber, “The Binding Interaction of

- Coomassie Blue with Proteins,” *Anal. Biochem.*, vol. 213, no. 2, pp. 407–413, Sep. 1993.
- [44] A. Bekdemir and F. Stellacci, “A centrifugation-based physicochemical characterization method for the interaction between proteins and nanoparticles,” *Nat. Commun.* 2016 7, vol. 7, no. 1, p. 13121, Oct. 2016.
- [45] Z.-Q. Xu *et al.*, “Interactions between carbon nanodots with human serum albumin and  $\gamma$ -globulins: The effects on the transportation function,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 301, pp. 242–249, Jan. 2016.
- [46] S. Goutelle *et al.*, “The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling,” *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 22, no. 6, pp. 633–648, Dec. 2008.
- [47] P. D. Ross and S. Subramanian, “Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability,” *Biochemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 3096–102, May 1981.
- [48] H. B. Callen and H. B. Callen, *Thermodynamics and an introduction to thermostatistics*. Wiley, 1985.
- [49] P. W. Peter W. Atkins and J. De Paula, *Atkins’ Physical chemistry*. Oxford University Press, 2010.
- [50] R. I. Boysen, Y. Wang, H. H. Keah, and M. T. W. Hearn, “Observations on the origin of the non-linear van’t Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments,” *Biophys. Chem.*, vol. 77, no. 2–3, pp. 79–97, Mar. 1999.
- [51] T. Förster, “Energiewanderung und Fluoreszenz,” *Naturwissenschaften*, vol. 33, no. 6, pp. 166–175, 1946.
- [52] T. Förster, “Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz,” *Ann. Phys.*, vol. 437, no. 1–2, pp. 55–75, Jan. 1948.
- [53] T. Förster, “Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie,” *Zeitschrift für Naturforsch. A*, vol. 4, no. 5, pp. 321–327, May 1949.
- [54] T. Förster, “10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation,” *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 27, no. 0, pp. 7–17, Jan. 1959.

- [55] FORSTER and T., "Delocalization excitation and excitation transfer," *Mod. Quantum Chem.*, 1965.
- [56] I. Medintz and N. Hildebrandt, Eds., *FRET - Förster Resonance Energy Transfer*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- [57] I. L. Medintz and N. Hildebrandt, *FRET - Förster resonance energy transfer : from theory to applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2014.
- [58] A. K. Kenworthy, "Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy," *Methods*, vol. 24, no. 3, pp. 289–296, Jul. 2001.
- [59] R. J. Ward and G. Milligan, "Structural and biophysical characterisation of G protein-coupled receptor ligand binding using resonance energy transfer and fluorescent labelling techniques," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 1, pp. 3–14, Jan. 2014.
- [60] B. Prevo and E. J. G. Peterman, "Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 4, pp. 1144–1155, Jan. 2014.
- [61] R. Abboud, C. Charcosset, and H. Greige-Gerges, "Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 207, pp. 260–270, Oct. 2017.
- [62] F. Kratz, "INNO-206 (DOXO-EMCH), an Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin Under Development for Phase II Studies."
- [63] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, and S. Tomao, "Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 4, pp. 99–105, 2009.
- [64] J. Mayr *et al.*, "An albumin-based tumor-targeted oxaliplatin prodrug with distinctly improved anticancer activity in vivo," *Chem. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 2241–2250, Feb. 2017.
- [65] Y.-R. Zheng *et al.*, "Pt(IV) Prodrugs Designed to Bind Non-Covalently to Human Serum Albumin for Drug Delivery," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 24, pp. 8790–8798, Jun. 2014.
- [66] M. Hanif *et al.*, "Anticancer activity of Ru- and Os(arene) compounds of a maleimide-

- functionalized bioactive pyridinecarbothioamide ligand,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 165, pp. 100–107, Dec. 2016.
- [67] S. Chakraborty *et al.*, “Mitochondria Targeted Protein-Ruthenium Photosensitizer for Efficient Photodynamic Applications,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 6, pp. 2512–2519, Feb. 2017.
- [68] D. Hu *et al.*, “Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer,” *Biomaterials*, vol. 93, pp. 10–19, Jul. 2016.
- [69] G. Battogtokh and Y. T. Ko, “Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 733–743, Feb. 2017.
- [70] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai, and A. dos S. Farias, *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, 2008.
- [71] G. Ramírez-García *et al.*, “An immunoconjugated up-conversion nanocomplex for selective imaging and photodynamic therapy against HER2-positive breast cancer,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 21, pp. 10154–10165, May 2018.
- [72] S. Kishimoto *et al.*, “Evaluation of oxygen dependence on in vitro and in vivo cytotoxicity of photoimmunotherapy using IR-700–antibody conjugates,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 85, pp. 24–32, Aug. 2015.
- [73] K. Sato, T. Nagaya, Y. Nakamura, T. Harada, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, “Near infrared photoimmunotherapy prevents lung cancer metastases in a murine model,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 23, pp. 19747–58, Aug. 2015.
- [74] T. Nagaya *et al.*, “Near infrared photoimmunotherapy with an anti-mesothelin antibody,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 17, pp. 23361–9, Apr. 2016.
- [75] G. Nam, S. Rangasamy, H. Ju, A. A. S. Samson, and J. M. Song, “Cell death mechanistic study of photodynamic therapy against breast cancer cells utilizing liposomal delivery of 5,10,15,20-tetrakis(benzo[b]thiophene) porphyrin,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 166, pp. 116–125, Jan. 2017.

- [76] A. Hanakova *et al.*, “Study of photodynamic effects on NIH 3T3 cell line and bacteria,” *Biomed. Pap.*, vol. 158, no. 2, pp. 201–207, Jun. 2014.
- [77] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*. Academic Press, 1992.
- [78] F. Wilkinson, W. P. Helman, and A. B. Ross, “Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution,” *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 22, no. 1, pp. 113–262, Jan. 1993.
- [79] J. Mosinger, M. Janošková, K. Lang, and P. Kubát, “Light-induced aggregation of cationic porphyrins,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 181, no. 2–3, pp. 283–289, Jul. 2006.
- [80] P. J. Gonçalves *et al.*, “Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP),” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 79, no. 5, pp. 1532–1539, Sep. 2011.
- [81] I. Zebger *et al.*, “Direct optical detection of singlet oxygen from a single cell,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, no. 4, pp. 319–22, Apr. 2004.
- [82] H. Ashkenazi, I. Pechatnikov, and Y. Nitzan, “Low-Intensity Photosensitization May Enhance RecA Production,” *Curr. Microbiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 317–323, Apr. 2006.
- [83] L. M. Almeida, F. F. Zanoelo, K. P. Castro, I. E. Borissevitch, C. M. A. Soares, and P. J. Gonçalves, “Cell Survival and Altered Gene Expression Following Photodynamic Inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 88, no. 4, pp. 992–1000, Jul. 2012.
- [84] K. Lang, P. Kubát, P. Lhoták, J. Mosinger, and D. M. Wagnerová, “Photophysical properties and photoinduced electron transfer within host-guest complexes of 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin with water-soluble calixarenes and cyclodextrins,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 4, pp. 558–65, Oct. 2001.
- [85] L. P. F. Aggarwal, M. S. Baptista, and I. E. Borissevitch, “Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 186, no. 2–3, pp. 187–193, Feb. 2007.

- [86] T. TIP, "Extinction coefficients," 2008.
- [87] I. E. Borissevitch, "More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher," *J. Lumin.*, vol. 81, no. 3, pp. 219–224, Apr. 1999.
- [88] Q. Gu and J. E. Kenny, "Improvement of Inner Filter Effect Correction Based on Determination of Effective Geometric Parameters Using a Conventional Fluorimeter," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 1, pp. 420–426, Jan. 2009.
- [89] Y.-Z. Zhang, B. Zhou, Y.-X. Liu, C.-X. Zhou, X.-L. Ding, and Y. Liu, "Fluorescence Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with P-Aminoazobenzene," *J. Fluoresc.*, vol. 18, no. 1, pp. 109–118, Jan. 2008.
- [90] D. C. Carter and J. X. Ho, "Structure of Serum Albumin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, Jan. 1994.
- [91] G.-F. Shen, T.-T. Liu, Q. Wang, M. Jiang, and J.-H. Shi, "Spectroscopic and molecular docking studies of binding interaction of gefitinib, lapatinib and sunitinib with bovine serum albumin (BSA)," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 153, pp. 380–390, Dec. 2015.
- [92] M. B. Moreira, D. S. Franciscato, K. C. F. Toledo, J. R. B. de Souza, H. S. Nakatani, and V. R. de Souza, "Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex," *Quim. Nova*, 2014.
- [93] S. M. Andrade and S. M. B. Costa, "Spectroscopic Studies on the Interaction of a Water Soluble Porphyrin and Two Drug Carrier Proteins," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 3, pp. 1607–1619, Mar. 2002.
- [94] N. S. Lebedeva, Y. A. Gubarev, and O. I. Koifman, "The interaction of cationic and anionic porphyrins with the bovine serum albumin in borate buffer," *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 88, no. 3–4, pp. 191–198, Aug. 2017.
- [95] N. Lebedeva, E. Malkova, S. Syrbu, Y. Gubarev, and D. Nikitin, "Investigation of Interactions between Cationic and Anionic Porphyrins and BSA in Aqueous Media," *Int. J. Biochem. Biophys.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–18, 2014.

- [96] C.-Q. Xiao, F.-L. Jiang, B. Zhou, R. Li, and Y. Liu, "Interaction between a cationic porphyrin and bovine serum albumin studied by surface plasmon resonance, fluorescence spectroscopy and cyclic voltammetry," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 10, no. 7, p. 1110, Jun. 2011.
- [97] H.-M. Ma *et al.*, "Spectroscopic studies on the interaction of a water-soluble cationic porphyrin with proteins," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 72, no. 3, pp. 465–469, Apr. 2009.
- [98] N. S. Lebedeva, Y. A. Gubarev, E. S. Yurina, and S. A. Syrbu, "Features of interaction of tetraiodide meso-tetra(N-methyl-3-pyridyl)porphyrin with bovine serum albumin," *J. Mol. Liq.*, vol. 265, pp. 664–667, Sep. 2018.
- [99] S. M. Andrade and S. M. B. Costa, "Spectroscopic Studies of Water-Soluble Porphyrins with Protein Encapsulated in Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) Reverse Micelles: Aggregation versus Complexation," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 12, no. 4, pp. 1046–1057, Jan. 2006.
- [100] X.-L. Lu, J.-J. Fan, Y. Liu, and A.-X. Hou, "Characterization of the interaction between cationic Erbium (III)–porphyrin complex with bovine serum albumin," *J. Mol. Struct.*, vol. 934, no. 1–3, pp. 1–8, Sep. 2009.
- [101] A. Ghisaidoobe, S. Chung, A. B. T. Ghisaidoobe, and S. J. Chung, "Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 22518–22538, Dec. 2014.
- [102] O. Abou-Zied, "Understanding the Physical and Chemical Nature of the Warfarin Drug Binding Site in Human Serum Albumin: Experimental and Theoretical Studies," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 14, pp. 1800–1816, Mar. 2015.
- [103] R. E. da Silva, K. C. F. Toledo, H. B. Jorge, B. Moreira Neto, V. R. de Souza, and H. S. Nakatani, "Interaction of ruthenium complex with bovine serum albumin for amperometric detection of ascorbic acid," *Quim. Nova*, vol. 37, no. 10, pp. 1633–1638, 2014.
- [104] H. M. Suresh Kumar, R. S. Kunabenchi, J. S. Biradar, N. N. Math, J. S. Kadadevarmath,

- and S. R. Inamdar, "Analysis of fluorescence quenching of new indole derivative by aniline using Stern–Volmer plots," *J. Lumin.*, vol. 116, no. 1–2, pp. 35–42, Jan. 2006.
- [105] M. Lúcio *et al.*, "Effect of anti-inflammatory drugs in phosphatidylcholine membranes: A fluorescence and calorimetric study," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 471, no. 4–6, pp. 300–309, Mar. 2009.
- [106] R. E. Marc, R. F. Murry, and S. F. Basinger, "Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 15, no. 7 Pt 2, pp. 5106–29, Jul. 1995.
- [107] "Função do anticorpo." [Online]. Available: [https://www.news-medical.net/health/Antibody-Function-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Antibody-Function-(Portuguese).aspx). [Accessed: 23-Jul-2019].
- [108] D. Mew, C. K. Wat, G. H. Towers, and J. G. Levy, "Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates.," *J. Immunol.*, vol. 130, no. 3, pp. 1473–7, Mar. 1983.
- [109] T. Nishimura and M. Mitsunaga, "TROP2-targeted photoimmunotherapy in experimental human pancreatic cancer," *Cancer Res.*, vol. 79, no. 13 Supplement, pp. 2386–2386, Jul. 2019.
- [110] Y. Liu *et al.*, "Interaction of curcumin with intravenous immunoglobulin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study," *Immunobiology*, vol. 213, no. 8, pp. 651–661, Oct. 2008.
- [111] Y. Liu *et al.*, "Study on the Interactions of Kaempferol and Quercetin with Intravenous Immunoglobulin by Fluorescence Quenching, Fourier Transformation Infrared Spectroscopy and Circular Dichroism Spectroscopy," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 56, no. 4, pp. 443–451, Apr. 2008.
- [112] Y. Liu *et al.*, "Interaction of Taxol with intravenous immunoglobulin: An inhibition of Taxol from crystallizing in aqueous solution," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 8, no. 3, pp. 390–400, Mar. 2008.
- [113] Y.-J. Hu, Y. Liu, L.-X. Zhang, R.-M. Zhao, and S.-S. Qu, "Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method," *J. Mol. Struct.*, vol. 750, no. 1–3, pp. 174–178, Aug. 2005.

- [114] Y.-Q. Wang, H.-M. Zhang, G.-C. Zhang, W.-H. Tao, and S.-H. Tang, "Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study," *J. Lumin.*, vol. 126, no. 1, pp. 211–218, Sep. 2007.
- [115] C. Hao, G. Xu, Y. Feng, L. Lu, W. Sun, and R. Sun, "Fluorescence quenching study on the interaction of ferroferric oxide nanoparticles with bovine serum albumin," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 184, pp. 191–197, Sep. 2017.
- [116] B. K. Lee, Y. H. Yun, and K. Park, "Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 125, pp. 158–164, Mar. 2015.
- [117] S. Chapman *et al.*, "Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise," *Nano Today*, vol. 8, no. 5, pp. 454–460, Oct. 2013.
- [118] J. Dobson, "Magnetic nanoparticles for drug delivery," *Drug Dev. Res.*, vol. 67, no. 1, pp. 55–60, Jan. 2006.
- [119] M. Nowostawska, S. A. Corr, S. J. Byrne, J. Conroy, Y. Volkov, and Y. K. Gun'ko, "Porphyrin-magnetite nanoconjugates for biological imaging," *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 13, Apr. 2011.
- [120] C. Zhao *et al.*, "Bio-imaging and Photodynamic Therapy with Tetra Sulphonatophenyl Porphyrin (TSPP)-TiO<sub>2</sub> Nanowhiskers: New Approaches in Rheumatoid Arthritis Theranostics," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 11518, Sep. 2015.
- [121] S. Senthilkumar, R. Hariharan, A. Suganthi, M. Ashokkumar, M. Rajarajan, and K. Pitchumani, "Synergistic photodynamic action of ZnO nanomaterials encapsulated meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin," *Powder Technol.*, vol. 237, pp. 497–505, Mar. 2013.
- [122] R. Rahimi, J. Shokraiyan, M. Rabbani, and F. Fayyaz, "Enhanced photobactericidal activity of ZnO nanorods modified by meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin under visible LED lamp irradiation," *Water Sci. Technol.*, vol. 71, no. 8, pp. 1249–1254, Apr. 2015.
- [123] S. I. Park, Y. H. Hwang, J. H. Lim, J. H. Kim, H. I. Yun, and C. O. Kim, "Biological and thermic effects of magnetic fluids for photodynamic therapy and hyperthermia," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 304, no. 1, pp. e403–e405, Sep. 2006.

- [124] D. M. Oliveira *et al.*, “Studies of zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional agent for cancer treatment,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 289, pp. 476–479, Mar. 2005.
- [125] G. C. Bolfarini, M. P. Siqueira-Moura, G. J. F. Demets, P. C. Morais, and A. C. Tedesco, “In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 115, pp. 1–4, Oct. 2012.
- [126] F. L. Primo, P. P. Macaroff, Z. G. M. Lacava, R. B. Azevedo, P. C. Morais, and A. C. Tedesco, “Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 310, no. 2, pp. 2838–2840, Mar. 2007.
- [127] E. M. Múzquiz-Ramos, V. Guerrero-Chávez, B. I. Macías-Martínez, C. M. López-Badillo, and L. A. García-Cerda, “Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 397–402, Jan. 2015.
- [128] K. S. Kim *et al.*, “Stimuli-responsive magnetic nanoparticles for tumor-targeted bimodal imaging and photodynamic/hyperthermia combination therapy,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 22, pp. 11625–11634, Jun. 2016.
- [129] P. J. Gonçalves, L. De Boni, N. M. B. Neto, J. J. Rodrigues, S. C. Zilio, and I. E. Borissevitch, “Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 407, no. 1–3, pp. 236–241, May 2005.
- [130] P. J. Gonçalves, I. E. Borissevitch, and S. C. Zilio, “Effect of protonation on the singlet–singlet excited-state absorption of meso-tetrakis(p-sulphonatophenyl) porphyrin,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 469, no. 4–6, pp. 270–273, Feb. 2009.
- [131] D. S. Correa *et al.*, “Excited-state absorption of meso-tetrasulfonatophenyl porphyrin: Effects of pH and micelles,” *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 42, pp. 516–521, Apr. 2015.
- [132] G. D. Benicio, F. Pelegri, A. F. Bakuzis, K. L. C. Miranda, and P. P. C. Sartoratto, “Magneto-optical properties of ionic magnetic fluids,” *J. Appl. Phys.*, vol. 101, no. 9, p.

09J106, May 2007.

- [133] K. Rudzka, Á. V. Delgado, and J. L. Viota, “Maghemite Functionalization for Antitumor Drug Vehiculization,” *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 7, pp. 2017–2028, Jul. 2012.
- [134] R. Improta, C. Ferrante, R. Bozio, and V. Barone, “The polarizability in solution of tetraphenyl-porphyrin derivatives in their excited electronic states: a PCM/TD-DFT study,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 22, p. 4664, May 2009.
- [135] P. J. Gonçalves *et al.*, “Excited-state dynamics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates,” *Opt. Mater. (Amst.)*, vol. 34, no. 4, pp. 741–747, Feb. 2012.
- [136] P. J. Gonçalves *et al.*, “Effect of interaction with micelles on the excited-state optical properties of zinc porphyrins and J-aggregates formation,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 112, pp. 309–317, Aug. 2013.
- [137] A. P. Gerola *et al.*, “Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, no. 4, pp. 884–894, Jul. 2011.
- [138] E. F. F. Silva, F. A. Schaberle, C. J. P. Monteiro, J. M. Dąbrowski, and L. G. Arnaut, “The challenging combination of intense fluorescence and high singlet oxygen quantum yield in photostable chlorins – a contribution to theranostics,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 12, no. 7, p. 1187, Jun. 2013.
- [139] I. E. Borissevitch *et al.*, “Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin,” *J. Lumin.*, vol. 134, pp. 83–87, Feb. 2013.
- [140] N. Dasgupta, S. Ranjan, D. Patra, P. Srivastava, A. Kumar, and C. Ramalingam, “Bovine serum albumin interacts with silver nanoparticles with a ‘side-on’ or ‘end on’ conformation,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 253, pp. 100–111, Jun. 2016.
- [141] V. Singh and A. K. Mishra, “Green and cost-effective fluorescent carbon nanoparticles for the selective and sensitive detection of iron (III) ions in aqueous solution: Mechanistic insights and cell line imaging studies,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 227, pp. 467–474, May 2016.

- [142] A. J. Shaikh, F. Rabbani, T. A. Sherazi, Z. Iqbal, S. Mir, and S. A. Shahzad, "Binding Strength of Porphyrin–Gold Nanoparticle Hybrids Based on Number and Type of Linker Moieties and a Simple Method To Calculate Inner Filter Effects of Gold Nanoparticles Using Fluorescence Spectroscopy," *J. Phys. Chem. A*, vol. 119, no. 7, pp. 1108–1116, Feb. 2015.
- [143] A. Kathiravan, V. Anbazhagan, M. Asha Jhonsi, and R. Renganathan, "Fluorescence quenching of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin by colloidal TiO<sub>2</sub>," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 70, no. 3, pp. 615–618, Aug. 2008.
- [144] A. Kathiravan, P. S. Kumar, R. Renganathan, and S. Anandan, "Photoinduced electron transfer reactions between meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin and colloidal metal-semiconductor nanoparticles," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 333, no. 1–3, pp. 175–181, Feb. 2009.
- [145] L. De Boni *et al.*, "Pulse train fluorescence technique for measuring triplet state dynamics," *Opt. Express*, vol. 19, no. 11, p. 10813, May 2011.
- [146] \* Ricardas Rotomskis, and Ramunas Augulis, V. Snitka#, R. V. and, and B. Liedberg, "Hierarchical Structure of TPPS4 J-Aggregates on Substrate Revealed by Atomic Force Microscopy," 2004.
- [147] N. Li, Y. Ma, C. Yang, L. Guo, and X. Yang, "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods," *Biophys. Chem.*, vol. 116, no. 3, pp. 199–205, Aug. 2005.
- [148] S. E. Sherman and S. J. Lippard, "Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA," *Chem. Rev.*, vol. 87, no. 5, pp. 1153–1181, Oct. 1987.
- [149] L. H. Hurley, "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 188–200, Mar. 2002.
- [150] B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, and J. R. Aldrich-Wright, "Metal complex interactions with DNA," *Dalt. Trans.*, vol. 44, no. 8, pp. 3505–3526, Feb. 2015.
- [151] E. Boschi *et al.*, "Interaction of a Cationic Porphyrin and Its Metal Derivatives with G-Quadruplex DNA," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 50, pp. 12807–12819, Dec. 2016.

- [152] G. Pratviel, "Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 308, pp. 460–477, Feb. 2016.
- [153] Y.-F. Huo, L.-N. Zhu, K.-K. Liu, L.-N. Zhang, R. Zhang, and D.-M. Kong, "Water-Soluble Cationic Metalloporphyrins: Specific G-Quadruplex-Stabilizing Ability and Reversible Chirality of Aggregates Induced by AT-Rich DNA," *Inorg. Chem.*, vol. 56, no. 11, pp. 6330–6342, Jun. 2017.
- [154] X.-F. Zhang, "BODIPY photosensitizers based on PET and heavy atom effect: A comparative study on the efficient formation of excited triplet state and singlet oxygen in BODIPY dimers and monomers," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 355, pp. 431–443, Mar. 2018.
- [155] C. Pavani, A. F. Uchoa, C. S. Oliveira, Y. Iamamoto, and M. S. Baptista, "Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 233–240, Feb. 2009.
- [156] S. Nonell, C. Flors, and Royal Society of Chemistry (Great Britain), *Singlet oxygen. Volume 1 : applications in biosciences and nanosciences.* .
- [157] A. V. Teles *et al.*, "Photodynamic inactivation of Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) by porphyrins," *J. Gen. Virol.*, vol. 99, no. 9, pp. 1301–1306, Sep. 2018.
- [158] J. R. Lakowicz, B. Shen, Z. Gryczynski, S. D'Auria, and I. Gryczynski, "Intrinsic Fluorescence from DNA Can Be Enhanced by Metallic Particles," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 286, no. 5, pp. 875–879, Sep. 2001.
- [159] D. E. V. Schmechel and D. M. Crothers, "Kinetic and hydrodynamic studies of the complex of proflavine with poly A·poly U," *Biopolymers*, vol. 10, no. 3, pp. 465–480, Mar. 1971.
- [160] D. H. Tjahjono, S. Mima, T. Akutsu, N. Yoshioka, and H. Inoue, "Interaction of metallopyrazoliumylporphyrins with calf thymus DNA," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 85, no. 2–3, pp. 219–228, Jun. 2001.
- [161] S. Bhattacharya, G. Mandal, and T. Ganguly, "Detailed spectroscopic investigations to reveal the nature of interaction of anionic porphyrin with calf thymus DNA," *J.*

- Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 101, no. 1, pp. 89–96, Oct. 2010.
- [162] “AC&T | – Academia de Ciência e Tecnologia.” [Online]. Available: <http://www.ciencianews.com.br/>. [Accessed: 23-Jul-2019].
- [163] F. A. Schaberle, V. A. Kuz'min, and I. E. Borissevitch, “Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1621, no. 2, pp. 183–191, May 2003.
- [164] N. S. Lebedeva, E. S. Yurina, Y. A. Gubarev, and S. A. Syrbu, “Interactions of tetracationic porphyrins with DNA and their effects on DNA cleavage,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 199, pp. 235–241, Jun. 2018.
- [165] V. M. De Paoli, S. H. De Paoli, I. E. Borissevitch, and A. C. Tedesco, “Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA,” *J. Alloys Compd.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 27–31, Oct. 2002.
- [166] M. Asadi, E. Safaei, B. Ranjbar, and L. Hasani, “Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn(ii) and Co(ii) tetrapyrroline porphyrins to calf thymus DNA: the role of the central metal in binding parameters,” *New J. Chem.*, vol. 28, no. 10, p. 1227, Oct. 2004.
- [167] H. F. Lodish *et al.*, *Molecular cell biology*. W.H. Freeman, 2008.
- [168] K. Hirakawa and S. Nakajima, “Effect of DNA microenvironment on photosensitized reaction of watersoluble cationic porphyrins,” *Recent Adv. DNA gene Seq.*, vol. 8, no. 1, pp. 35–43, 2014.
- [169] T. Qin *et al.*, “Binding Interactions of Zinc Cationic Porphyrin with Duplex DNA: From B-DNA to Z-DNA,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, p. 1071, Apr. 2018.
- [170] P. Mroz *et al.*, “Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 2516–2539, Jun. 2011.
- [171] K. Moghissi, M. R. Stringer, and K. Dixon, “Fluorescence photodiagnosis in clinical practice,” *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 5, no. 4, pp. 235–237, Dec. 2008.
- [172] A. Guerriero, W. Oberhauser, T. Riedel, M. Peruzzini, P. J. Dyson, and L. Gonsalvi, “New Class of Half-Sandwich Ruthenium(II) Arene Complexes Bearing the Water-

- Soluble CAP Ligand as an in Vitro Anticancer Agent,” *Inorg. Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 5514–5518, May 2017.
- [173] B. T. Elie, Y. Pecheny, F. Uddin, and M. Contel, “A heterometallic ruthenium–gold complex displays antiproliferative, antimigratory, and antiangiogenic properties and inhibits metastasis and angiogenesis-associated proteases in renal cancer,” *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 23, no. 3, pp. 399–411, May 2018.
- [174] F. Li, J. G. Collins, and F. R. Keene, “Ruthenium complexes as antimicrobial agents,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 8, pp. 2529–2542, Apr. 2015.
- [175] A. da Silva, L. Gomes, J. de Carvalho, F. Barbosa, and D. Pereira, “Características da Salmonella Spp.: uma Revisão Literária,” in *International Journal of Nutrology*, 2018, vol. 11, no. S 01, p. Trab228.
- [176] P. Nordmann, G. Cuzon, and T. Naas, “The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 9, no. 4, pp. 228–236, Apr. 2009.
- [177] J. A. Pandini *et al.*, “Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de Salmonella spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil,” *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*, vol. 82, no. 0, Apr. 2015.
- [178] C. L. Ventola, “The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats,” *P T*, vol. 40, no. 4, pp. 277–83, Apr. 2015.
- [179] C. J. H. von Wintersdorff *et al.*, “Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer,” *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 173, Feb. 2016.
- [180] W. Mäntele and E. Deniz, “UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 173, pp. 965–968, Feb. 2017.
- [181] A. R. da Silva, A. C. Pelegrino, A. C. Tedesco, and R. A. Jorge, “Photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)indium(III),” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, no. 3, pp. 491–501, 2008.
- [182] H. E. Toma and K. Araki, “Supramolecular assemblies of ruthenium complexes and

- porphyrins,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 196, no. 1, pp. 307–329, Jan. 2000.
- [183] J. Dolanský, P. Henke, Z. Malá, L. Žárská, P. Kubát, and J. Mosinger, “Antibacterial nitric oxide- and singlet oxygen-releasing polystyrene nanoparticles responsive to light and temperature triggers,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 5, pp. 2639–2648, Feb. 2018.
- [184] B. R. Rabello *et al.*, “Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 238, pp. 53–62, Jun. 2012.
- [185] M. A. Scorciapino *et al.*, “Rationalizing the permeation of polar antibiotics into Gram-negative bacteria,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 29, no. 11, p. 113001, Mar. 2017.
- [186] D. Benedetto Tiz, D. Kikelj, and N. Zidar, “Overcoming problems of poor drug penetration into bacteria: challenges and strategies for medicinal chemists,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 13, no. 6, pp. 497–507, Jun. 2018.
- [187] E. Gandin, Y. Lion, and A. Van de Vorst, “Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 37, no. 3, pp. 271–278, Mar. 1983.
- [188] D. M. Marin *et al.*, “Efficient intersystem crossing using singly halogenated carbomethoxyphenyl porphyrins measured using delayed fluorescence, chemical quenching, and singlet oxygen emission,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 43, pp. 29090–29096, Oct. 2015.
- [189] M. Managa, B. P. Ngoy, D. Mafukidze, J. Britton, and T. Nyokong, “Photophysical studies of meso-tetrakis(4-nitrophenyl) and meso-tetrakis(4-sulfophenyl) gallium porphyrins loaded into Pluronic F127 polymeric micelles,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 348, pp. 179–187, Nov. 2017.