



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física

Ariane Gornates Arantes

**Foto-oxidação de proteínas por porfirinas
hidrossolúveis**

Orientador: Dr. Pablo José Gonçalves

Goiânia 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, 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.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome completo da autora: Ariane Gornates Arantes

Título do trabalho: Foto-oxidação de proteínas por porfirinas hidrossolúveis

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Pablo Jose Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 29/01/2024, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariane Gornates Arantes, Discente**, em 29/01/2024, às 21:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4331129** e o código CRC **E8D43065**.

Referência: Processo nº 23070.059288/2023-03

SEI nº 4331129

Ariane Gornates Arantes

Foto-oxidação de proteínas por porfirinas hidrossolúveis

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Dr. Pablo José Gonçalves.

Goiânia 2024

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

Arantes, Ariane Gornates

Foto-oxidação de proteínas por porfirinas hidrossolúveis
[manuscrito] / Ariane Gornates Arantes. - 2024.
50 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Física Médica, Goiânia, 2024.
Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fotodegradação. 2. Porfirinas. 3. Triptofano. 4. PDT. I. Gonçalves,
Pablo José, orient. II. Título.

CDU 577.3

Ariane Gornates Arantes

Foto-oxidação de proteínas por porfirinas hidrossolúveis

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Física do Instituto de Física da
Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.
Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Pablo José Gonçalves

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás
Presidente da Banca

Prof. Dr. Antônio Alonso

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Cássia Alessandra Marquezin

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e nove dias do mês de janeiro do ano de 2024 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Foto-oxidação de proteínas por porfirinas hidrossolúveis**”, de autoria de **Ariane Gornates Arantes**, do curso de Física Médica, do Instituto de Física da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Pablo José Gonçalves (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Cássia Alessandra Marquezin (IF/UFG) e Prof. Dr. Antônio Alonso (IF/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição da estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **10,0** (dez vírgula zero), tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Pablo Jose Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 29/01/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 29/01/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 29/01/2024, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4331080** e o código CRC **AAFE47DF**.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador Dr. Pablo José Gonçalves que me deu a oportunidade de conhecer o laboratório, dividindo seus conhecimentos comigo e me ajudando em cada ideia de experimento e análise de resultados.

Também queria agradecer imensamente a técnica do laboratório Jaqueline Cristine Desordi que viveu ao meu lado as conquistas e as muitas frustrações de cada resultado experimental obtido, além de ter me acompanhado em todos os experimentos, inclusive nos realizados durante as férias e feriados.

Meus agradecimentos também vão para minha família, em especial ao meu irmão que me apoiou desde o início na escolha de física médica como curso e não deixou de acreditar no meu potencial.

Agradeço diariamente por todos os amigos que fiz na jornada acadêmica e em destaque ao meu amigo Rafael Krause que esteve ao meu lado desde o início da graduação, em cada partida de sinuca, cada tarde de estudos e cada briga por conta de relatório, me dando força quando eu queria desistir.

Resumo

A Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade terapêutica em ascensão, indicada como uma alternativa ao tratamento de micro-organismos e diversos tipos de câncer. Para seu funcionamento são necessários três componentes: oxigênio molecular, luz visível e um fotossensibilizador (FS). Dentre os FS mais utilizados estão as porfirinas, que podem ser catiônicas ou aniônicas dependendo da carga periférica da sua estrutura. Em uma administração sistêmica, os FS percorrem a corrente sanguínea, sendo possível a interação com elementos do corpo como proteínas, que podem ser foto-oxidadas com a administração controlada de luz, perdendo sua função, seja estruturalmente ou funcionalmente, o que pode ocasionar morte celular de tecidos alvo. O presente trabalho analisou a foto-oxidação da albumina sérica bovina (BSA) por duas porfirinas hidrossolúveis catiônicas (TMPyP e ZnTMPyP) e duas aniônicas (TPPS e ZnTPPS). Foi analisado o efeito da presença do átomo metálico no anel central da porfirina; dois tipos de fontes de irradiação (uma fonte halógena e um módulo laser emitindo em 532 nm); o efeito da BSA na produção de oxigênio singlete e, por fim, o efeito da adição de oxigênio constante de tempo de foto-oxidação. Inicialmente foi encontrado um protocolo que permitiu a obtenção reprodutiva das constantes de foto-oxidação. Na sequência, foi observado que a constante de tempo de foto-oxidação é maior para porfirinas catiônicas, devido à maior proximidade com o resíduo fluorescente triptofano, e aumenta com a presença do zinco, que por ser um átomo pesado favorece o processo de cruzamento intersistemas e produção de espécies reativas. Também foi observado que a lâmpada halógena proporciona uma degradação mais rápida do que a do laser, podendo estar associado à sua maior amplitude espectral poderia oxidar outros componentes da albumina. Além disso, foi possível concluir que a BSA atua como um obstáculo entre o FS e o oxigênio molecular, reduzindo a formação de oxigênio singlete, o que fez necessária a adição de gás oxigênio na solução para obtenção de sinal de fosforescência, o que promove uma redução na taxa foto-oxidativa. Nossa hipótese é de que a foto-oxidação rápida no início do processo pode mudar a conformação da BSA, bloqueando o acesso do oxigênio. Os resultados aqui obtidos são valiosos para o estudo de foto-oxidação de proteínas e que podem ser estendidos para outras estruturas biológicas alvos de estudos sobre ação fotodinâmica.

Palavras chave: Fotodegradação, porfirinas, triptofano, PDT.

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is a growing therapy, indicated as an alternative to the treatment of microorganisms and various types of cancer. For its operation, three components are necessary: molecular oxygen, visible light and a photosensitizer (FS). Among the most used FS are porphyrins, which can be cationic or anionic depending on the peripheral charge of their structure. In systemic administration, FS travel through the bloodstream, making it possible to interact with body elements such as proteins, which can be photo-oxidized with controlled administration of light, losing their function, whether structurally or functionally, which can cause death of target tissues. The present work analyzed the photo-oxidation of bovine serum albumin (BSA) by two cationic (TMPyP and ZnTMPyP) and two anionic (TPPS and ZnTPPS) water-soluble porphyrins. The effect of the presence of the metallic atom in the central ring of the porphyrin was analyzed; two types of irradiation sources (a halogen source and a laser module emitting at 532 nm); the effect of BSA on the production of singlet oxygen and, finally, the effect of adding constant photo-oxidation oxygen. Initially, a protocol was found that allowed the reproducible obtainment of photo-oxidation constants. Subsequently, it was observed that the photo-oxidation constant is greater for cationic porphyrins, due to their greater proximity to the fluorescent residue tryptophan, and increases with the presence of zinc, which, as it is a heavy atom, favors the process of intersystem crossing and production of reactive species. It was also observed that the halogen lamp provides faster degradation than the laser, which may be associated with its greater spectral amplitude and could oxidize other albumin components. Furthermore, it was possible to conclude that BSA acts as an obstacle between FS and molecular oxygen, reducing the formation of singlet oxygen, which made it necessary to add oxygen gas to the solution to obtain a phosphorescence signal, which promotes a reduction in photo-oxidative rate. Our hypothesis is that rapid photo-oxidation at the beginning of the process can change the conformation of BSA, blocking oxygen access. The results obtained here are valuable for the study of protein photo-oxidation and can be extended to other biological structures targeted for studies on photodynamic action.

Keywords: Photodegradation, porphyrins, tryptophan, PDT.

Lista de Figuras

Figura 1: Diferentes tipos de fotossensibilizadores: a) Porfirina; b) Clorina; c) Ftalocianina.	2
Figura 2: Estrutura da BSA: a) Domínios e Subdomínios; b) Localização dos triptofanos.	3
Figura 3: Diagrama de Jablonski.	5
Figura 4: Esquemática da multiplicidade de spin.	6
Figura 5: Diagrama de Jablonki de um FS, com os estados eletrônicos da molécula, os processos fotofísicos e as espécies reativas formadas que ocasionam a morte celular.	8
Figura 6: a) Diagrama de níveis envolvidos na técnica b) Arranjo experimental para detecção de oxigênio singlete.	9
Figura 7: a) Montagem esquemática da técnica de Flash-Fotólise b) diagrama de níveis de energia envolvidos na técnica.	10
Figura 8: Estrutura molecular das porfirinas: a) TPPS; b) ZnTPPS; c) TMPyP; d) ZnTMPyP.	13
Figura 9: Espectros de emissão da lâmpada halógena e do laser com comprimento de onda em 532 nm.	16
Figura 10: Espectro de fluorescência da BSA na presença da TPPS, com $\lambda_{exc} = 270$ nm.	18
Figura 11: Espectro de fluorescência da BSA: a) Variando o λ_{exc} ; b) Variando as larguras das fendas de excitação e emissão.	19
Figura 12: Gráfico da irradiância da fonte de luz em função da distância do detector.	20
Figura 13: Espectro de fluorescência da BSA: a) Irradiada e sem porfirina; b) Sem irradiar e com porfirina.	21
Figura 14: Espectros de fluorescência com $\lambda_{exc} = 260$ nm: a) TMPyP; b) ZnTMPyP; c) ZnTPPS; d) TPPS.	22
Figura 15: Foto-oxidação da albumina pela luz na presença das porfirinas em diferentes instantes de tempo.	23
Figura 16: Intensidade relativa dos picos de fluorescência com as diferentes fontes de irradiação para as porfirinas analisadas.	25

Figura 17: Espectros de fluorescência com adição de oxigênio: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP; d) ZnTPPS.	27
Figura 18: Intensidade relativa de fluorescência para as três amostras analisadas e indicado o tempo de degradação.	28
Figura 19: Gráficos da foto-oxidação da BSA pelo módulo laser (532 nm) em solução com e sem adição oxigênio indicando seus respectivos tempos de degradação: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP.	28
Figura 20: Espectros de fosforescência sem e com a BSA sob adição de oxigênio e à direita seus respectivos espectros de absorção: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP.	30
Figura 21: a) Espectro de absorção do estado fundamental da porfirina TMPyP e b) decaimento do estado tripleto.	32
Figura 22: Curvas de decaimento do estado tripleto da amostra TMPyP: em preto o decaimento com oxigênio, e em vermelho com borbulhamento de nitrogênio.	33

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tempos de vida das transições no fotossensibilizador.	7
Tabela 2: Coeficientes de absorção molar do pico obtidos na literatura e as absorbâncias calculadas pela equação 12.	14
Tabela 3: Altura entre o líquido na cubeta e a ponta da lâmpada, a potência e a irradiância definida por potência pela área irradiada.....	20
Tabela 4: Tempos de degradação e constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas.....	23
Tabela 5: Constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas irradiadas com o laser e a lâmpada.	26
Tabela 6: Constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas com e sem a adição de O ₂	29
Tabela 7: Valores das áreas abaixo da curva de fosforescência das amostras com BSA (I_{fos}) e sem (I_{fos0}), valores de absorbância no comprimento de onda de excitação (532 nm) das amostras com BSA (A_{532}) e sem (A_{532-0}), rendimento quântico de oxigênio singlete das amostras sem BSA obtidos na literatura ($\Phi_{\Delta 0}$) e com BSA calculados (Φ_{Δ}).....	31
Tabela 8: Tempos de vida do estado tripleto na presença de oxigênio τ , e na ausência do oxigênio τ_0 e a constante de supressão kq	33

Sumário

1. Capítulo: Introdução.....	1
2. Capítulo: Objetivos	4
3. Capítulo: Base científica e fundamentação teórica	5
3.1. Dinâmica dos estados excitados	5
3.2. Detecção do oxigênio singlete	8
3.3. Técnica da Flash-Fotólise	10
4. Capítulo: Metodologia.....	13
4.1. Preparação das amostras	13
4.1.1. Porfirinas	13
4.1.2. Albumina	14
4.2. Interação das porfirinas com a albumina e processo de foto-oxidação da BSA utilizando uma fonte halógena.	15
4.2.1. Análise das condições experimentais	16
4.3. Processo de foto-oxidação da BSA utilizando um laser.....	16
4.3.1. Medidas para obtenção do oxigênio singlete.....	17
4.3.2. Medidas no aparato da Flash Fotólise	17
5. Capítulo: Resultados e Discussões	18
5.1. Ajuste das condições experimentais para os experimentos de foto-oxidação	18
5.1.1. Análise das condições experimentais para obtenção do espectro de emissão de fluorescência.....	18
5.1.2. Análise do comprimento de onda de excitação e das fendas de excitação e emissão. 19	
5.1.3. Análise da potência da fonte halógena.	20
5.2. Foto-oxidação da BSA	20
5.2.1. Foto-oxidação utilizando uma lâmpada halógena	21
5.2.1.1. Análise do efeito da carga da porfirina e da presença do metal	22
5.2.1.2. Análise do sítio de ligação da BSA	24
5.2.2. Foto-oxidação da BSA utilizando um laser	24
5.2.2.1. Efeito da adição de oxigênio na foto-oxidação da albumina.....	26
5.2.2.2. Efeito da presença da albumina sobre a produção de oxigênio singlete 29	
5.2.2.2.1. Explicação do efeito pelos tempos de vida do estado tripleto	31
6. Capítulo: Conclusões.....	34

INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva que está sendo utilizada para o tratamento de doenças neoplásicas. Ela consiste em uma foto-reação oxidativa que depende de três componentes: um fotossensibilizador (FS), a luz visível e o oxigênio molecular que está presente nos tecidos.

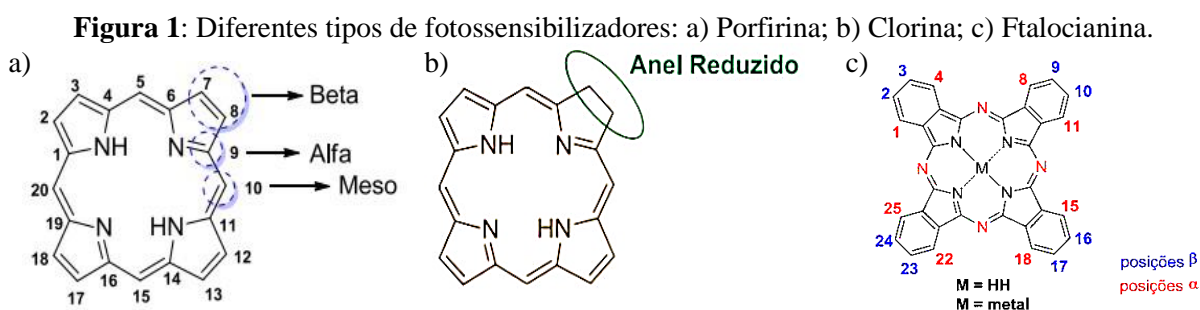
Ao incidir luz em um FS ele absorve a energia e passa para um estado excitado, onde pode haver a formação do estado tripleto, que é um estado metaestável, ou seja, um estado mais energético que carrega consigo a restrição de multiplicidade diferente, que lhe impede a transição imediata para o estado fundamental. A energia desse estado tripleto excitado geralmente é suficiente para reagir com o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio (EROs) e o oxigênio singleto, capazes de ocasionar morte celular em alvos biológicos específicos por meio de estresse oxidativo (GONCALVES, P. J, et al. 2021).

A PDT tem diversas aplicações bem sucedidas, dentre elas está o combate à microrganismos como fungos, vírus e bactérias, e o tratamento de diversos tipos de câncer como de esôfago e pulmão, em que é feita a administração de uma fibra óptica para a irradiação dos tecidos (USUÁRIOS 2023). Recentemente, o Ministério da Saúde incorporou a PDT no Sistema Único de Saúde (SUS) como uma alternativa para o tratamento do câncer de pele mais frequente no Brasil, o basocelular superficial e nodular. Sua incorporação foi indicada pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec) devido ao baixo custo, e bons resultados de tratamento (TERAPIA, 2023). Os estudos apresentados na avaliação indicaram que 85% dos tumores tratados com o procedimento foram eliminados, sem efeitos colaterais importantes e sem formação de cicatriz.

A PDT também vem sendo usada como uma alternativa promissora contra a resistência bacteriana à antibióticos (SINTRA R., 2024). Para isso uma molécula é adicionada a um sistema de análise contendo bactérias, após ela ser absorvida é feita sua ativação com luz, o resultado é a produção de radicais livres que realizam os processos foto-oxidativos responsáveis pela destruição da resistência de membrana e das bombas de efluxo que têm a função de descartar substâncias que não interessam para a bactéria, além disso ocorre a

redução da capacidade de produção enzimática, assim é possível realizar a administração de antibióticos tradicionais para matá-las. As pesquisas provaram que, de forma análoga, também é possível quebrar a resistência fúngica aos fungicidas.

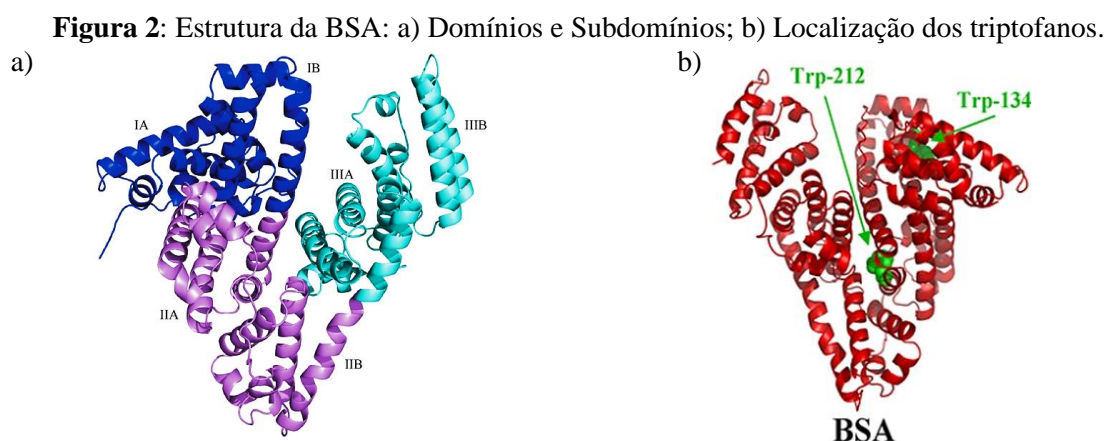
Os principais FS são as porfirinas, ftalocianinas e clorinas, cujas estruturas moleculares estão representadas na **Figura 1**. Entretanto, dentre eles, os mais utilizados são as porfirinas, pois essas moléculas têm bom rendimento de produção do oxigênio singlete, alta seletividade, ou seja, mais afinidade e penetração no tecido doente em relação ao saudável e baixa toxicidade na ausência de luz (OLIVEIRA, K.T., et al.2014). Elas são heterociclos aromáticos com quatro unidades pirrólicas unidas por pontes meso-metínicas.



importantes de células e tecidos que desempenham funções-chave dentro dos organismos, incluindo reações metabólicas, estrutura celular, transporte de moléculas e outros. Danos induzidos por foto-oxidação de proteínas podem resultar em alterações estruturais e funcionais como o seu dobramento, sua fragmentação etc. (CAVALCANTE R.S. 2009). Esses eventos podem causar dano celular e disfunção tecidual, o que pode resultar em apoptose, necrose, alteração da sinalização celular e múltiplas patologias humanas (PATTISON D.I., 2012).

Dentre as moléculas mais abundantes no sangue está a albumina, ela está fortemente associada ao transporte de nutrientes, sua interação com os fotossensibilizadores causa alterações em suas conformações estruturais. A albumina sérica bovina (BSA) é uma proteína do sangue bovino que tem grande similaridade estrutural com a do sangue humano (HSA) (BUJACZ A., 2012). Além disso, tem se mostrado um sistema simples e valioso que permite estudo de processos foto-oxidativos.

As albuminas, ilustradas na **Figura 2-a)**, possuem estruturas helicoidais divididas em três domínios (I, II e III) de conformações similares e que se subdividem em dois subdomínios (A e B) que se diferem entre si pela rigidez da estrutura proteica devido ao número de pontes dissulfeto. A BSA apresenta dois aminoácidos triptofano fluorescentes, o Trp 134 no sítio IB e o Trp 212 no sítio IIA, que são utilizados para monitoramento e podem ser vistos na **Figura 2-b)**. Na BSA, a interação com o fotossensibilizador leva à supressão da fluorescência da banda de emissão em 347 nm (BELATIK, A. et al. 2012), associada aos dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212), situados em dois domínios proteicos de interações hidrofóbicas e a eventual formação de agregados. Sua ligação com o fotossensibilizador gera uma alteração do tempo de vida do estado tripleto.



Fonte: (BELATIK, A. et al. 2012)

OBJETIVOS

O presente trabalho de conclusão de curso teve como principal objetivo analisar a foto-oxidação da proteína albumina por porfirinas hidrossolúveis. Para isso foram avaliados os espectros de absorção, fluorescência e fosforescência de quatro amostras na presença e ausência da albumina. Além disso, também foi alterada a condição de saturação de oxigênio, com isso foi possível fazer uma imersão nas propriedades fotofísicas das moléculas. Os objetivos específicos do trabalho foram:

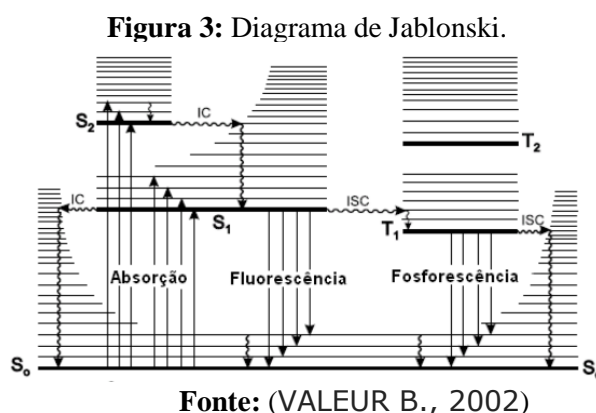
- i. Obtenção das constantes de tempo de foto-oxidação em solução;
- ii. Avaliação dos efeitos das cargas (positivas ou negativas);
- iii. Avaliação da presença de metais no anel central da porfirina;
- iv. Obtenção das constantes de tempo de foto-oxidação em solução em condição de saturação de oxigênio;
- v. Avaliação do efeito da albumina sobre os estados tripletos;
- vi. Avaliação do efeito da presença da albumina sobre a produção de oxigênio singlete.

BASE CIENTÍFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Dinâmica dos estados excitados

Para compreender os processos fotofísicos avaliados no trabalho é necessário utilizar um diagrama de níveis de energia, conhecido por diagrama de Jablonski. Este modelo permite explicar a dinâmica de estados excitados.

Em 1933, Aleksander Jablonski, físico polonês, propôs um diagrama de níveis de energia para explicar as transições eletrônicas de moléculas orgânicas, como os FS. Esses níveis são bem definidos, eles têm um estado fundamental singleto de menor energia (S_0) e estados excitados de maior energia singleto (S_1, S_2, \dots, S_m) e tripleto (T_1, T_2, \dots, T_n). O diagrama de Jablonski é ilustrado na **Figura 3**, nela podemos ver os níveis eletrônicos como linhas espessas horizontais e os níveis vibracionais como linhas menos espessas e podemos ver os processos fotofísicos que acontecem na molécula.

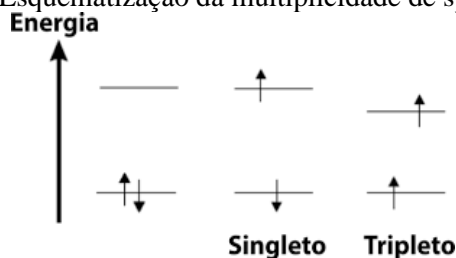


A nomenclatura dos estados singleto e tripleto se dá por meio da multiplicidade (M) de spin da molécula, que é dada pela equação:

$$M = 2S + 1 \quad (1)$$

sendo S o spin total da molécula. A **Figura 4** nos mostra no primeiro estágio a molécula no estado singleto fundamental, pois temos um elétron com spin $+1/2$ e outro com spin $-1/2$, portanto, $S = 0$, assim $M = 1$. No segundo estágio $M = 1$ pelo mesmo motivo, mas um elétron se encontra no estado mais energético, dessa forma ela se encontra no estado singleto excitado; por fim, no terceiro estágio temos o estado tripleto excitado, pois temos dois elétrons com spin $+1/2$, portanto, $S = 1$ e $M = 3$.

Figura 4: Esquemática da multiplicidade de spin.



Fonte: QUORA (2018, p.3)

Os fotossensibilizadores (FS) são moléculas que em seu estado fundamental (S_0) atuam como absorvedores da luz visível. Ao absorverem fótons de energia correspondente à diferença de energia entre os níveis, eles passam para um estado excitado que é chamado estado singleto (S_1). Para voltar para o estado fundamental eles sofrem processos radiativos (com emissão de fótons) e não radiativos (sem emissão de fótons). O processo de perda de energia importante na PDT é o cruzamento intersistemas, pois nele teremos a formação de estado tripleto (T_1), que é um estado metaestável que permite a reação com um substrato para formar EROs e esses mecanismos irão produzir a foto-oxidação e levar à morte celular.

Os processos não radiativos do FS são a relaxação vibracional, a conversão interna (CI) e o cruzamento intersistemas (ISC). A relaxação vibracional é uma transição em que a perda energética ocorre por meio de colisões moleculares e perdas térmicas. A CI é uma conversão entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. A conversão do estado S_1 para S_0 é possível, mas é menos eficiente do que a de S_2 para S_1 , devido a diferença energética entre os níveis S_1 e S_0 ser muito maior. O ISC é uma transição entre dois sistemas vibratórios isoenergéticos com níveis pertencentes a estados eletrônicos de diferentes

multiplicidades de spin, ele pode ser rápido o suficiente para competir com outros processos de desativação de S_1 .

Os processos radiativos são chamados de fotoluminescência e são divididos em dois tipos: fluorescência e fosforescência. A fluorescência é a emissão de fótons acompanhada de relaxação, com preservação da multiplicidade de spin, o que permite um retorno do estado S_1 ao estado fundamental S_0 . A fosforescência é a emissão de fótons a partir do estado excitado tripleto T_1 para S_0 , onde tem-se decaimento radiativo e ela tem tempo significativamente maior que o da fluorescência pois a transição envolve estados de diferentes multiplicidades. O tempo de vida característico de cada transição é dado na **Tabela 1**.

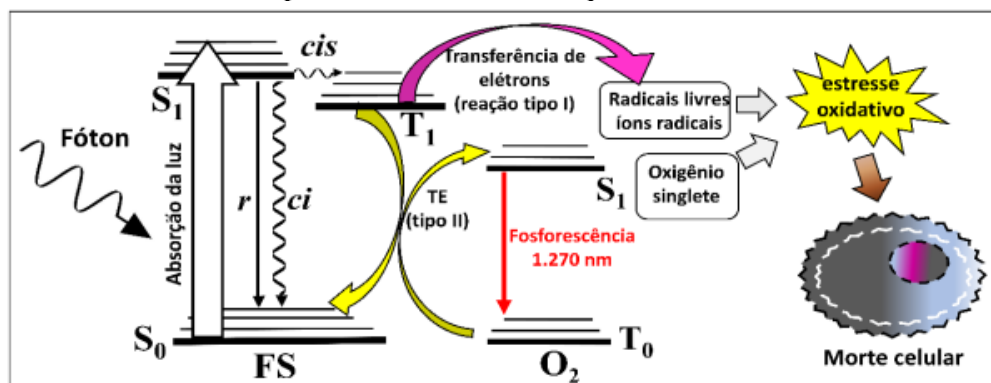
Tabela 1: Tempos de vida das transições no fotossensibilizador.

<i>Processo</i>	<i>Tempo característico (s)</i>
Absorção	10^{-15}
Relaxação vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tempo de vida do estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Conversão interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Tempo de vida do estado excitado T_1	$10^{-6} - 10^0$

Fonte: (VALEUR B., 2002)

Após o processo de conversão interna teremos uma população no estado tripleto. Na presença de oxigênio molecular, como acontece nos tecidos, o FS tem energia suficiente para interagir com o O_2 e formar espécies reativas, podendo levar à morte celular por meio de foto-oxidação e esse é o mecanismo explorado pela PDT, que faz a aplicação disso em tecidos alvo, com o objetivo de promover a morte celular em tecidos tumorais ou infecciosos. O processo é descrito esquematicamente na **Figura 5**.

Figura 5: Diagrama de Jablonki de um FS, com os estados eletrônicos da molécula, os processos fotofísicos e as espécies reativas formadas que ocasionam a morte celular.



Fonte: GONCALVES, P. J, et al. (2021, cap.1 p.17)

Na **Figura 5** podemos ver o diagrama de níveis de energia típico de um FS. Existem dois mecanismos para gerar as espécies capazes de ocasionar morte celular (GONCALVES, P. J, et al., 2021): a transferência de elétrons (reação tipo I) e o processo de transferência de energia entre moléculas do FS, no estado tripleto, para o oxigênio molecular (reação tipo II).

A reação tipo I produz espécies reativas de oxigênio (ERO's) e é favorecida em condições de baixa concentração de oxigênio molecular. Dentre as espécies formadas a mais agressiva é o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que pode ser obtido pela foto-oxidação da água. Ela promove a morte celular por apoptose ou autofagia pelo estresse causado no retículo endoplasmático.

Na reação tipo II temos como principal produto formado o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que é extremamente importante na PDT devido seu tempo de vida ser suficiente para reagir com alvos remotos (NONELL; FLORS, 2016). Reações deste tipo são favorecidas em condições de alta concentração de oxigênio. O oxigênio singleto reage com proteínas, podendo gerar hidroperóxidos resultando em danos a outras proteínas celulares, promovendo a morte celular por apoptose (RONSEIN et al., 2006).

3.2. Detecção do oxigênio singleto

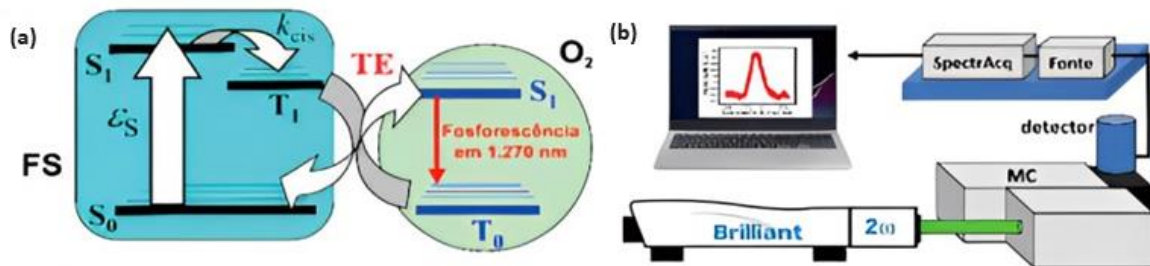
Devido à importância da formação de oxigênio singleto na PDT é útil quantificar sua produção. Isso é feito pelo cálculo do rendimento quântico de produção do $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ). Ele é obtido por meio da combinação de técnicas experimentais que envolvem medidas de emissão de fosforescência do oxigênio singleto e a absorção da molécula FS. Este é o chamado método

direto. No processo de relaxação do oxigênio singlete ocorre a emissão de fosforescência na região do infravermelho, com o máximo localizado perto de 1270 nm.

O sistema adquirido pelo Grupo de Biofotônica da UFG para obtenção do espectro de fosforescência indicado na **Figura 6-b)** consiste em:

- Uma fonte de laser contínuo com comprimento de onda de excitação $\lambda_{exc}=532$ nm;
- Um porta-amostra, onde será incidido o feixe de laser;
- Um monocromador que seleciona o comprimento de onda da luz de análise, a qual é coletada por um detector de estado sólido refrigerado (InGaAs);
- Um console de controle e processamento de dados (*SpectrAcq*) que faz a interface com um computador.

Figura 6: a) Diagrama de níveis envolvidos na técnica b) Arranjo experimental para detecção de oxigênio singlete.



Fonte: Alterado de GONCALVES, P. J, et al. (2021, cap.1 p.22)

O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) pode ser calculado pela seguinte equação (GONCALVES, P. J, et al. 2021):

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I_{fos}}{A_{\lambda_{exc}}} \frac{A_{\lambda_{exc-0}}}{I_{fos0}} \Phi_{\Delta 0} \quad (2)$$

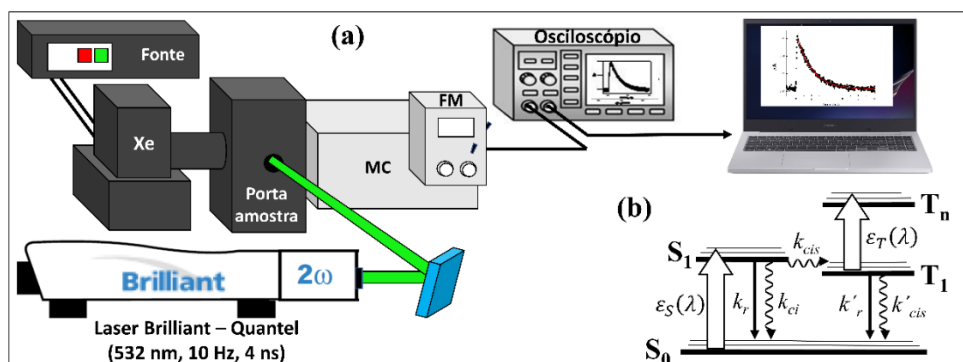
Sendo, I_{fos} e I_{fos0} as integrais da curva de emissão de fosforescência, ou seja, a área abaixo da curva, da amostra e do padrão respectivamente, $A_{\lambda_{exc}}$ e $A_{\lambda_{exc-0}}$ os valores de absorvância no comprimento de onda de excitação da amostra e do padrão e $\Phi_{\Delta 0}$ o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete do padrão.

3.3. Técnica da Flash-Fotólise

A Flash-Fotólise, também chamada de espectroscopia de Absorção Transiente, é uma técnica capaz de gerar, sondar e caracterizar espécies de vida curta, como os estados excitados moleculares tripletos. Ela permite monitorar e avaliar a formação de estados tripletos, seu tempo de vida, taxa de supressão do oxigênio, espectro transiente do estado tripleto e seu rendimento quântico de formação, características de grande importância para o estudo e desenvolvimento de um melhor fotossensibilizador para ser utilizado na PDT (ZHANG, X.F., 2017).

O sistema da Flash-Fotólise pertence à família de técnicas de bombeio e prova (*pump-probe*), que são usados para estudar processos rápidos de espécies transitórias que têm um tempo de vida muito curto. O bombeio do sistema (*pump*) utilizado em laboratório é um laser de Nd:YAG, emitindo em 532 nm (2º harmônico) com pulso da ordem de 4-6 nanossegundos, numa taxa de repetição de 10 Hz (Figura 7). O bombeio é realizado por um pulso intenso de laser que permitirá que uma significativa população seja promovida aos estados excitados S_1 através da absorção $S_0 \rightarrow S_1$ (GONCALVES P. J., 2021). Após a absorção, parte da população volta ao estado fundamental por meio dos processos radiativos e não radiativos. Uma das formas de liberação de energia é por meio do cruzamento intersistemas (ISC), onde há a formação do estado tripleto $S_1 \rightarrow T_1$. O estado T_1 é um estado metaestável com tempo de vida da ordem de microssegundos, o qual poderá ser monitorado na Flash-Fotólise.

Figura 7: a) Montagem esquemática da técnica de Flash-Fotólise b) diagrama de níveis de energia envolvidos na técnica.



Fonte: GONCALVES, P. J, et al. (2021, cap.1 p.20)

No equilíbrio termodinâmico, toda população eletrônica estará no estado fundamental singlete S_0 . Quando incidimos um feixe de laser na banda de absorção de uma amostra,

teremos uma absorvância (A_1) devido à transição $S_0 \rightarrow S_1$. Ela pode ser escrita conforme a lei de Beer-Lambert:

$$A_1 = \varepsilon_S C_0 \ell \quad (3)$$

onde ε_S é o coeficiente de absorção molar do estado fundamental envolvido na transição $S_0 \rightarrow S_1$, C_0 é a concentração total da população eletrônica, que inicialmente se encontra no estado S_0 e ℓ é o caminho óptico da cubeta em que a amostra foi inserida.

Após a excitação $S_0 \rightarrow S_1$, parte da população eletrônica retorna para o estado fundamental singlete (S_0) pelos processos citados anteriormente e o restante vai para o estado tripleto T_1 . Quando a luz da lâmpada de xenônio (probe) atinge a amostra, haverá população tanto no estado fundamental S_0 quanto no estado tripleto T_1 . Nessa etapa, a absorção da amostra será devido às transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $T_1 \rightarrow T_n$. Tais transições são representadas pelos coeficientes de absorção molar ε_S e ε_T , respectivamente. De forma análoga, as populações eletrônicas nos estados S_0 e T_1 serão representadas por C_S e C_T , respectivamente. Assim, a absorvância devido a lâmpada de xenônio (A_2) será representada pela expressão:

$$A_2 = (\varepsilon_S C_S + \varepsilon_T C_T) \ell \quad (4)$$

Os coeficientes de absorção molar são constantes, mas a população eletrônica é dependente do tempo. Geralmente o caminho óptico da cubeta de vidro ou quartzo ℓ é de 1 cm, então esse termo será omitido nas próximas equações.

Uma vez que o tempo de vida do estado S_1 é muito curto (nanossegundos), podemos assumir que a população eletrônica se distribui apenas entre os estados S_0 e T_1 e assim, podemos escrever:

$$C_S(t) + C_T(t) = C_0 \quad (5)$$

Onde C_0 é a concentração total. Para simplificar a notação, o símbolo que representa a dependência temporal (t) será omitido. Agora, substituindo C_S da equação (5) na equação (4), obtemos:

$$A_2 = \varepsilon_S (C_0 - C_T) + \varepsilon_T C_T \quad (6)$$

Aplicando propriedade distributiva:

$$A_2 = \varepsilon_S C_0 - \varepsilon_S C_T + \varepsilon_T C_T \quad (7)$$

Reescrevendo:

$$A_2 = A_1 - (\varepsilon_S - \varepsilon_T)C_T \quad (8)$$

Considerando que $\Delta A = A_2 - A_1$, obtemos:

$$\Delta A = -(\varepsilon_S - \varepsilon_T)C_T \quad (9)$$

Finalmente, obtemos a absorção transiente da amostra (ΔA):

$$\Delta A = (\varepsilon_T - \varepsilon_S)C_T \quad (10)$$

Explicitando as dependências, temos que a absorção molar depende do comprimento de onda (λ) e a população depende do tempo (t), assim podemos escrever na forma completa da absorção transiente (GONCALVES, P. J, et al., 2021):

$$\Delta A(\lambda, t) = [\varepsilon_T(\lambda) - \varepsilon_S(\lambda)]C_T(t)\ell \quad (11)$$

Para um dado comprimento de onda (λ), a curva da absorção transiente permite obter a evolução temporal da concentração da população no estado tripleto C_T e assim obter o tempo de vida desse estado.

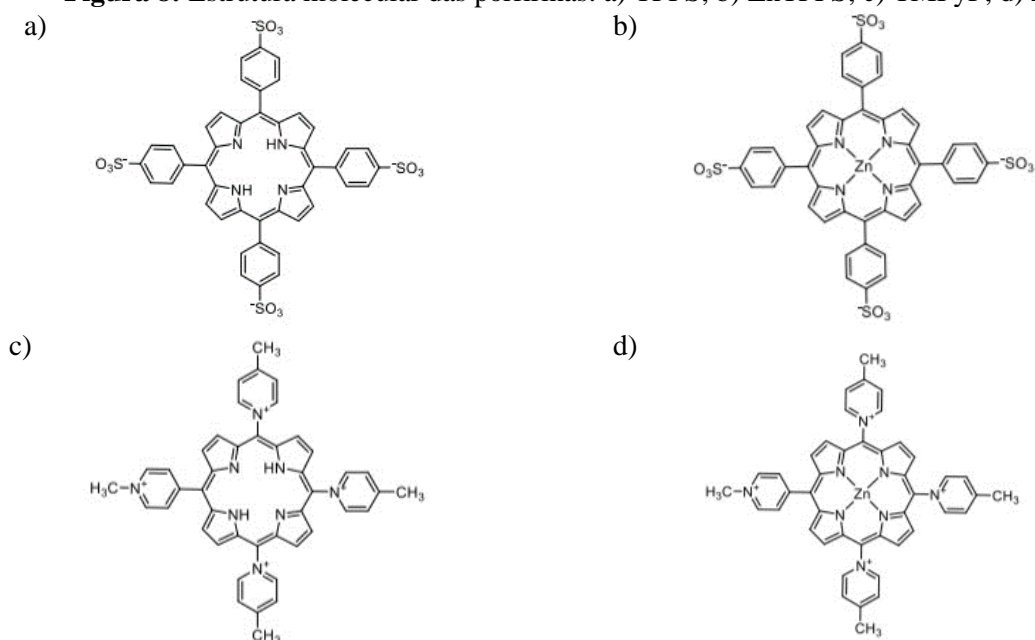
METODOLOGIA

4.1. Preparação das amostras

4.1.1. Porfirinas

No experimento foram utilizadas as porfirinas aniônicas 5,10,15,20- Tetrakis(4-sulfonatofenil)-21H,23H-porfirina (TPPS) e 5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatofenil)-21H,23H-porfirina de zinco II (ZnTPPS), e as porfirinas catiônicas 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridínio)-21H,23H-porfirina (TMPyP) e 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridínio)-21H,23H-porfirina de zinco II (ZnTMPyP), a estrutura molecular delas está indicada na **Figura 8**, elas foram escolhidas por serem típicos FS, com atividade fotodinâmica conhecida, propriedades fotofísicas bem exploradas e que já estão sendo utilizadas pelo grupo de Biofotônica do IF-UFG nos últimos anos. As porfirinas foram adquiridas da empresa Porphyrn Inc e a albumina de soro bovina (BSA) da Sigma Co.

Figura 8: Estrutura molecular das porfirinas: a) TPPS; b) ZnTPPS; c) TMPyP; d) ZnTMPyP.



Fonte: (DUCAS E. S. A., 2021)

As soluções de porfirinas foram preparadas em solução tampão fosfato-salino (PBS) de pH=7,2 e foram feitos 10 mL de solução para cada porfirina. Foram ajustadas suas concentrações usando a equação de Beer-Lambert (12) a partir dos coeficientes de absorção molar do pico de absorção obtidos na literatura, indicados na **Tabela 2**. Na equação, a absorbância (A) é dada pelo produto entre o coeficiente de absorção molar (ϵ), a concentração da amostra (C), e o caminho óptico da cubeta em que a amostra foi inserida (l) (GONCALVES, P. J, et al. 2021).

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) C l \quad (12)$$

Tabela 2: Coeficientes de absorção molar do pico obtidos na literatura e as absorbâncias calculadas pela equação 12.

	TPPS	ZnTPPS	TMPyP	ZnTMPyP
Pico (nm)	515	562	518	562
ϵ (L/mol.cm)	$1,30 \cdot 10^4$	$1,74 \cdot 10^4$	$1,39 \cdot 10^4$	$1,74 \cdot 10^4$
Absorbância	0,13	1,18	0,14	1,18

Fonte: (DUCAS E. S. A., 2021)

4.1.2. Albumina

Para o preparo da solução de BSA, foram feitos os cálculos de ajuste de acordo com a equação (13). Para obter uma concentração molar inicial (C_1) de 1 mM, a massa de 71,1 mg de BSA em pó foi diluída em 1,077 mL de PBS.

$$C_1 = \frac{m}{MM.V} \quad (13)$$

em que C_1 é a concentração molar (em mol/L), m é a massa de soluto (em g), MM é a massa molar do soluto indicada pelo fabricante (em g/mol) e V é o volume (em L). A solução estoque foi armazenada na geladeira (6° C) para que sua conservação fosse possível durante todos os dias de experimento.

4.2. Interação das porfirinas com a albumina e processo de foto-oxidação da BSA utilizando uma fonte halógena.

Para a observação da foto-oxidação de proteínas, a BSA foi retirada da geladeira e deixada por 15 minutos na estufa (35°C) e depois por 30 minutos em temperatura ambiente para completa termalização da amostra. Em seguida, a amostra da BSA foi diluída para uma concentração final (C_2) a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para isso, foram adicionados 20 μ L de BSA em 2 mL de porfirina, a solução foi armazenada por 30 minutos para a completa ligação entre as porfirinas e a BSA. Para realizar a devida diluição, os volumes utilizados (V_1 e V_2) foram obtidos utilizando a equação (14) mantendo a proporção de concentração (C_1 e C_2) desejada.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (14)$$

Em seguida 2,5 mL da solução foram colocados em uma cubeta de quartzo e foi feita a medida do espectro de fluorescência. O restante da solução foi mantido no béquer e coberto com papel alumínio para que a luz não degradasse a amostra. A cubeta foi irradiada por uma lâmpada halógena (emitindo de 400-900 nm) por dez minutos e foi feita a medida de fluorescência da amostra irradiada em função do tempo de irradiação. O processo de irradiação e medida foi repetido 6 vezes para acompanhar a degradação da proteína com o tempo. O béquer tampado durante 60 min foi analisado a partir da obtenção do espectro de fluorescência.

Na etapa de medição nos equipamentos, usamos 2,5 mL de PBS para fazer a linha de base, que nos indica a influência do solvente na nossa análise, e em seguida foi obtido o espectro de fluorescência da BSA na presença de cada porfirina no mesmo volume no espectrofluorímetro Hitachi F-7000, gentilmente cedido pelo prof. Dr. Antônio Alonso do laboratório de Biofísica do IF/UFG. A largura das fendas de entrada e saída do espectrofluorímetro também foram ajustadas para 1 e 2,5 nm respectivamente. A irradiação foi realizada a 5 cm de distância, incidindo em toda a amostra, com a presença de uma pulga magnética e o agitador magnético, para a homogeneização da solução.

4.2.1. Análise das condições experimentais

Para garantir que as condições experimentais são as mais adequadas, ou seja, que contenham o maior sinal, foram feitas algumas análises referentes ao comprimento de onda de excitação da amostra e a largura das fendas de entrada e saída do espectrofluorímetro. A análise foi feita sem irradiação da amostra, inicialmente apenas com BSA.

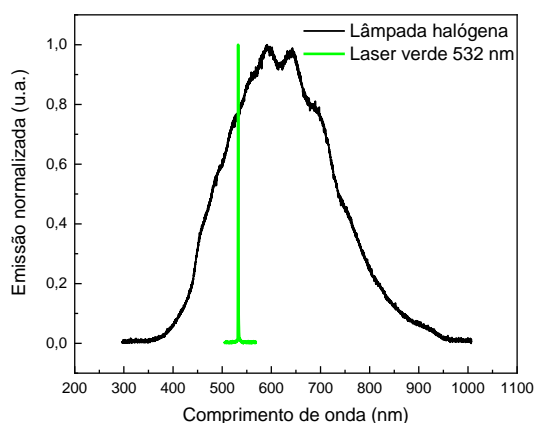
Também quantificamos as propriedades da irradiação da amostra. Para isso foi medida a potência da lâmpada por um medidor de potência variando a altura entre o líquido na cubeta e a ponta da lâmpada e a partir dos valores de potência e altura foram calculadas as irradiâncias, definida pela potência pela área irradiada.

Para tentar entender o processo de degradação, foram feitas duas análises de controle. As suposições eram de que a proteína é degradada pela luz independente da presença de porfirina, ou a proteína é degradada pela porfirina independente da presença da luz halógena

4.3. Processo de foto-oxidação da BSA utilizando um laser.

Neste processo repetimos o mesmo procedimento descrito na Seção 4.2 substituindo a fonte halógena por uma fonte de laser com comprimento de onda em 532 nm. A agitação magnética foi usada para garantir que a maior quantidade possível de moléculas pudesse passar pelo feixe de irradiação, sendo excitadas. A diferença entre os espectros de emissão das fontes de irradiação se encontra na **Figura 9**.

Figura 9: Espectros de emissão da lâmpada halógena e do laser com comprimento de onda em 532 nm.



Fonte: Autoria própria

Na busca por encontrar um protocolo de preparação das amostras que levasse a resultados de foto-oxidação reprodutíveis, várias alternativas foram testadas. O protocolo que se mostrou reprodutivo segue as seguintes etapas:

Conforme descrito na seção 4.2, após a termalização da BSA, inicialmente colocamos a albumina em contato com a porfirina para ocorrer a interação dos componentes por 15 minutos em repouso no escuro. Em seguida, deixamos sob agitação utilizando um agitador magnético, ainda no escuro, por mais 15 minutos e só então demos início às medidas.

4.3.1. Medidas para obtenção do oxigênio singlete.

Adicionamos a solução de porfirina em uma cubeta, usamos o aparato experimental ilustrado na **Figura 6-b)** para a análise de produção de oxigênio singlete. Foi medido o espectro de fosforescência por 3 ciclos de repetição, processo que demorava cerca de 9 minutos e como a amostra estava sob irradiação constante do laser, a hipótese é de que ela degradava. Posteriormente foi obtido o espectro de absorção e fluorescência da amostra, para comprovar nossa hipótese, o processo foi repetido na presença da BSA.

Não obtivemos sinal na medida de fosforescência da amostra de porfirina com a BSA, então percebemos que era necessária a adição de oxigênio para a retomada do sinal, o que fez com que todas as medidas seguintes fossem feitas nesse padrão. Para isso, foi borbulhado o gás oxigênio por 20 minutos para dentro da cubeta, que foi tampada com um septo de borracha, além disso foi feita a agitação manual durante esse tempo para garantir a homogeneização do acesso ao gás na amostra. Em seguida, foram obtidos os espectros de fosforescência, absorção e fluorescência respectivamente da amostra contendo BSA, o processo foi repetido 5 vezes para a obtenção da constante de tempo de foto-oxidação.

4.3.2. Medidas no aparato da Flash Fotólise

Utilizamos a técnica da Flash Fotólise do laboratório de Biofotônica, ilustrada na **Figura 7-a)**, para a obtenção dos tempos de vida do estado tripleto. Fizemos a medida com a solução de porfirina e depois vedamos a cubeta com um septo de borracha e fizemos o borbulhamento com o gás nitrogênio, para fazer uma varredura e remover o oxigênio da amostra. Em seguida fizemos a medida para obter o tempo de vida do estado tripleto na ausência de oxigênio para realizar uma comparação.

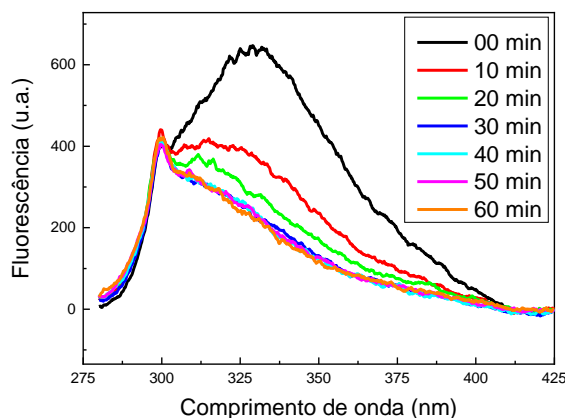
RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Ajuste das condições experimentais para os experimentos de foto-oxidação

5.1.1. Análise das condições experimentais para obtenção do espectro de emissão de fluorescência

Inicialmente realizamos uma análise preliminar das condições experimentais para obtenção do espectro de emissão de fluorescência a ser empregado no estudo de foto-oxidação. Nesta etapa empregamos a porfirina TPPS com a albumina. O espectro de fluorescência da BSA na presença da TPPS com comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 270 nm foi obtido conforme descrito na metodologia (Seção 4.2) e se encontra na figura abaixo, o valor escolhido é devido o conhecimento de que a BSA absorve na faixa de 270-290 nm. É possível observar na **Figura 10** que conforme o tempo de irradiação aumenta, a intensidade de fluorescência reduz, o que indica uma degradação.

Figura 10: Espectro de fluorescência da BSA na presença da TPPS, com $\lambda_{exc} = 270$ nm.



Fonte: Autoria própria

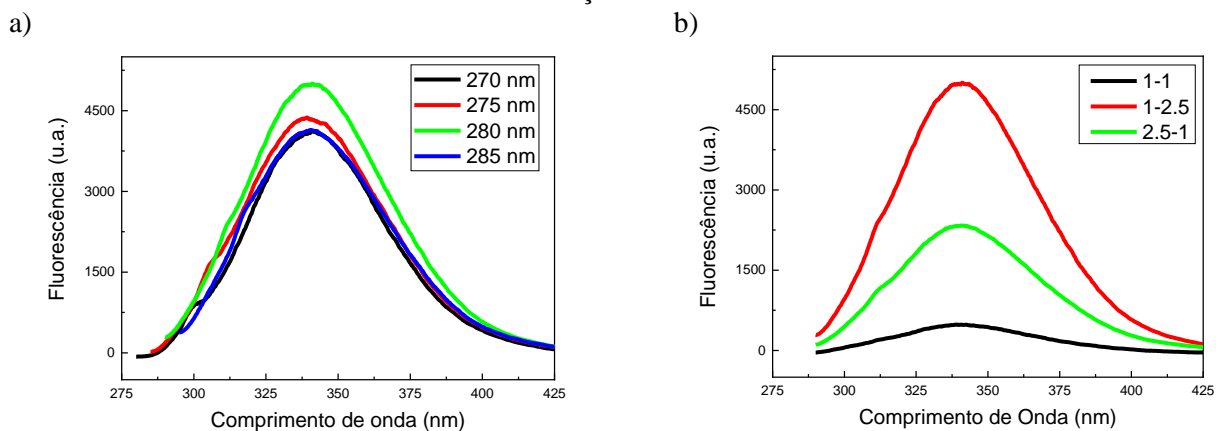
Uma análise do gráfico é a presença de um pico, por volta de 300 nm, que se confunde com o pico do espectro de fluorescência, o que dificulta a identificação do valor exato do pico que nos interessa, o problema é devido à presença do efeito raman do solvente, que se trata de um espalhamento inelástico da radiação pelo material. Para contornar esse problema, o comprimento de onda de excitação foi variado, o que levou a um deslocamento do pico do efeito.

5.1.2. Análise do comprimento de onda de excitação e das fendas de excitação e emissão.

É necessário 10 nm de diferença do comprimento de onda de emissão para não fazer a medição do feixe de excitação, dessa forma, o comprimento de onda de excitação foi variado em 270, 275, 280 e 285 nm. Podemos ver pela **Figura 11-a)** que o maior sinal foi obtido em 280 nm, sendo um indicativo de que a configuração inicial era de fato a mais eficiente. Isso se justifica devido o pico de absorção da BSA ser próximo de 280 nm.

Depois foi feita a análise da largura das fendas de excitação e emissão da lâmpada do fluorímetro, elas foram variadas em 1-1 nm, 1-2,5 nm e 2,5-1 nm, sendo o primeiro valor o comprimento de onda de excitação e o segundo o de emissão, e pela **Figura 11-b)** vemos que novamente o nosso aparato inicial foi o que apresentou maior intensidade, ou seja, o de 1-2,5 nm.

Figura 11: Espectro de fluorescência da BSA: a) Variando o λ_{exc} ; b) Variando as larguras das fendas de excitação e emissão.



Fonte: Autoria própria

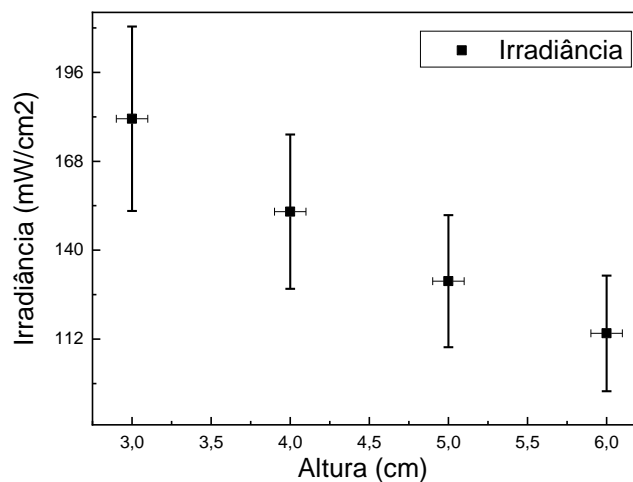
5.1.3. Análise da potência da fonte halógena.

Para quantificar as propriedades da irradiação da fonte de irradiação, a sua potência de emissão foi medida em função da distância da fonte. A partir desses valores, foi calculada a irradiância que está apresentada na **Tabela 3**. Para esse cálculo, foi considerado que a potência era depositada em um béquer de área $1,77 \text{ cm}^2$. Com esses dados, foi feito um gráfico da irradiância pela altura da lâmpada, **Figura 12**.

Tabela 3: Altura entre o líquido na cubeta e a ponta da lâmpada, a potência e a irradiância definida por potência pela área irradiada.

Altura (cm)	Potência da lâmpada (mW)	Irradiância (mW/cm^2)
$5,0 \pm 0,1$	$230,0 \pm 0,2$	$130,2 \pm 20,8$
$6,0 \pm 0,1$	$201,0 \pm 0,2$	$113,7 \pm 18,2$
$4,0 \pm 0,1$	$268,7 \pm 0,2$	$152,1 \pm 24,3$
$3,0 \pm 0,1$	$320,3 \pm 0,2$	$181,3 \pm 29,0$

Figura 12: Gráfico da irradiância da fonte de luz em função da distância do detector.



Fonte: Autoria própria

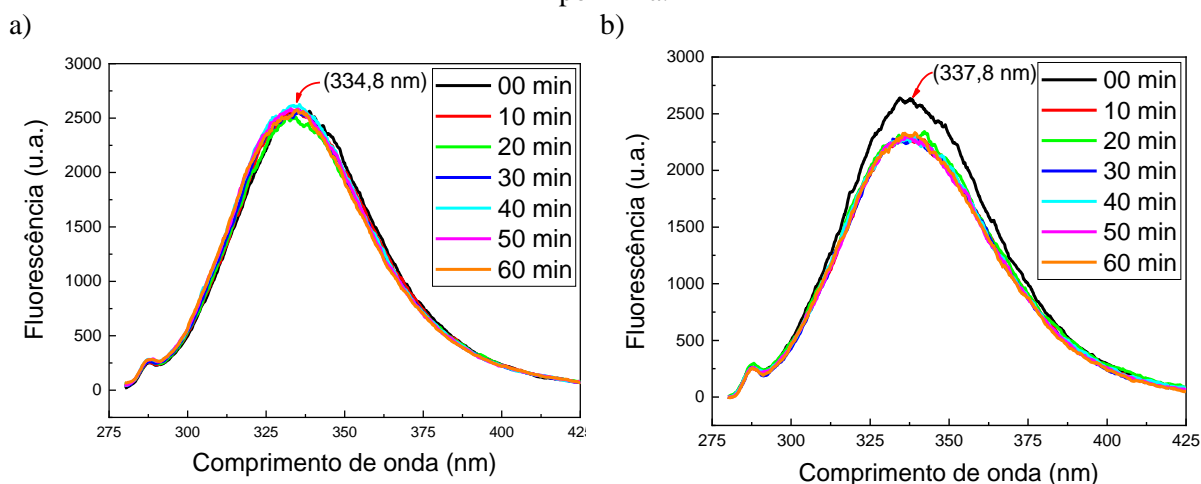
5.2. Foto-oxidação da BSA

5.2.1. Foto-oxidação utilizando uma lâmpada halógena

Depois foi feito o controle para verificar se era de fato a presença da porfirina estava afetando a degradação da BSA. Para isso uma solução de análise foi preparada contendo apenas a BSA em PBS e então foi irradiada por 60 min. Foi possível observar que a amostra não foi degradada (**Figura 13-a**), ou seja, na ausência da porfirina, não obtivemos degradação, indicando que a presença da porfirina é o que de fato estava promovendo a degradação da BSA. Além disso, foi variado o comprimento de onda de excitação para 260 nm a fim de deslocar o pico raman, para não interferir no espectro.

Outro controle foi realizado nas mesmas condições para ver se a presença da luz afetava a degradação da BSA, para isso a solução de análise foi preparada com TPPS e BSA em PBS mantendo a concentração, mas dessa vez não houve a irradiação. Foi possível observar pela **Figura 13-b**) que a amostra teve uma pequena degradação em um primeiro momento e depois estabilizou, isso se dá pela supressão de fluorescência da albumina pela porfirina, neste fenômeno uma faixa de espectro de absorção da porfirina coincide com uma faixa do espectro de fluorescência da BSA. Como não houve degradação nos tempos seguintes, isso indica que de fato a presença da luz é o que degrada a amostra.

Figura 13: Espectro de fluorescência da BSA: a) Irradiada e sem porfirina; b) Sem irradiar e com porfirina.

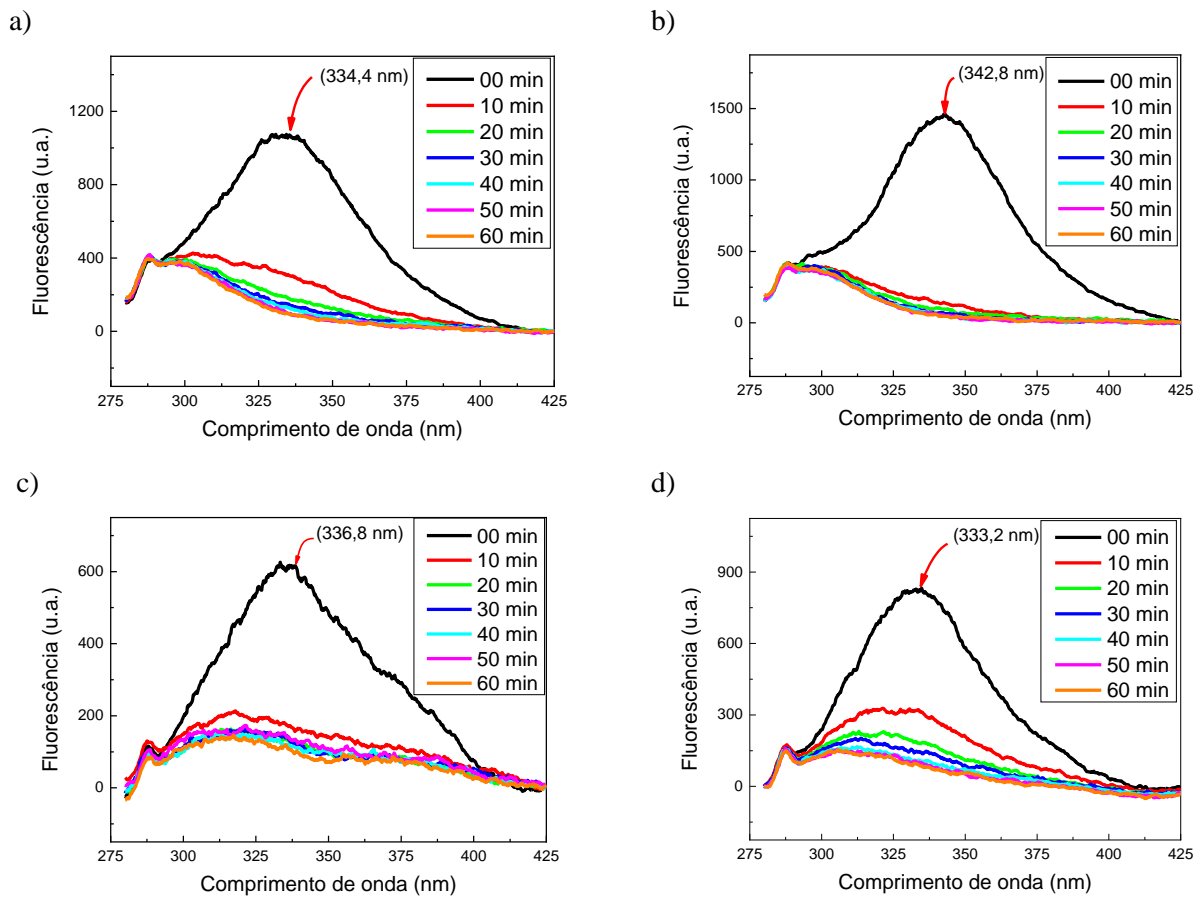


Fonte: Autoria própria

5.2.1.1. Análise do efeito da carga da porfirina e da presença do metal

Em seguida foram obtidos os espectros de fluorescência (excitação em 260 nm) para as demais porfirinas em função de tempo de irradiação, **Figura 14**.

Figura 14: Espectros de fluorescência com $\lambda_{exc} = 260$ nm: a) TMPyP; b) ZnTMPyP; c) ZnTPPS; d) TPPS.



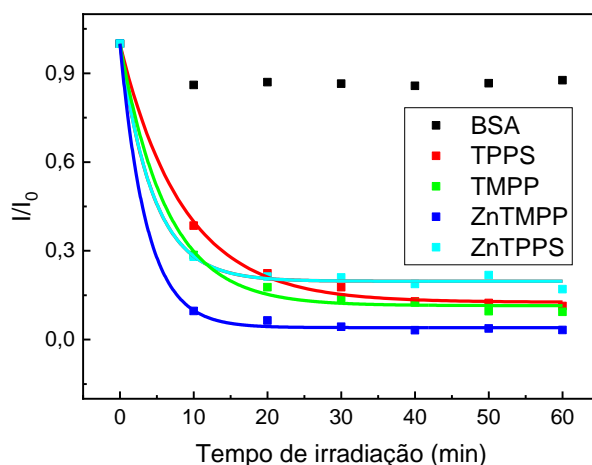
Fonte: Autoria própria

Nos espectros foram indicados, por setas vermelhas, as intensidades máximas de fluorescência sem irradiação e obtivemos as intensidades de fluorescência neste comprimento de onda para os demais tempos. Os valores foram normalizados e colocados em um gráfico, dessa forma foi possível obter o tempo de degradação (t_1) pelo ajuste exponencial, dado pela equação (15).

$$y = A_1 e^{-x/t_1} + y_0 \quad (15)$$

Os resultados de todas as amostras foram colocados em um único gráfico para realizar uma comparação, como demonstrado na **Figura 15**.

Figura 15: Foto-oxidação da albumina pela luz na presença das porfirinas em diferentes instantes de tempo.



Fonte: Autoria própria

Foi possível obter a constante de tempo de foto-oxidação (k) que é definida pelo inverso do t_1 , ou seja:

$$k = \frac{1}{t_1} \quad (16)$$

Tabela 4: Tempos de degradação e constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas.

	ZnTMPyP	TMPyP	ZnTPPS	TPPS
t_1 (s)	$3,57 \pm 0,29$	$6,36 \pm 0,54$	$4,45 \pm 0,49$	$8,37 \pm 0,50$
k (s^{-1})	$0,28 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$

A partir dos dados da tabela podemos fazer duas análises: o efeito das cargas e a presença do zinco no anel central.

1. O efeito das cargas das amostras: podemos observar que as porfirinas catiônicas são mais efetivas. A TMPP apresentou um aumento de 33% na constante de tempo de foto-oxidação (k) dos compostos em relação a TPPS. Enquanto que a ZnTMPyP apresentou um aumento de 27% em comparação com a ZnTPPS.

2. A presença do zinco: podemos observar que a presença do zinco aumenta a eficiência de foto-oxidação. A ZnTMPP apresentou um aumento de 75% para em relação à TMPP, enquanto que para a ZnTPPS, o aumento foi de 83% em relação a TPPS.

O zinco é um átomo pesado, e isso interfere nas regras de transição, o que favorece a inversão do spin e formação do tripleto, e conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio. Esse efeito ajuda a explicar o aumento da constante de tempo de foto-oxidação das amostras de zinco.

5.2.1.2. *Análise do sítio de ligação da BSA*

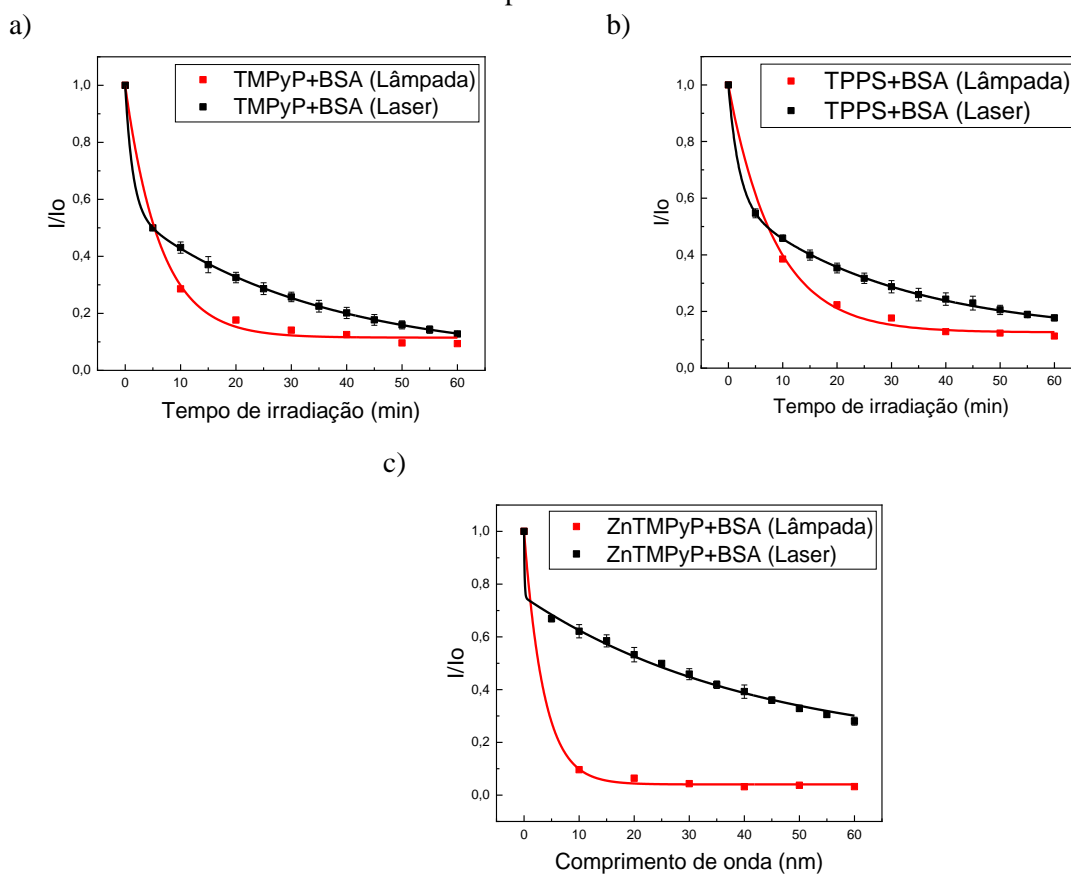
Outra análise foi a do sítio de ligação da BSA. As características de absorção e emissão intrínseca das proteínas no comprimento de onda de excitação utilizado são devidas principalmente ao resíduo de aminoácido aromático triptofano. Apesar da BSA ter a função de transporte de nutrientes e, portanto, ligação com diversos tipos de estruturas, ela não adsorve moléculas aleatoriamente à sua superfície. Na verdade, ela apresenta sítios de ligação altamente específicos. A maioria dos nutrientes transportados pela BSA se liga em sítios no subdomínio IB, conhecidos como sítio heme, que é uma cavidade hidrofóbica onde está localizado o Trp-134. Estudos (SMITH K.M.; FALK J.E., 1975), (MA H. M. et al., 2009) sugerem que porfirinas catiônicas se liguem no sítio heme, o que indica que as porfirinas TMPP e ZnTMPP ocupem esse sítio. Outro sítio de grande relevância é o sítio I de Sudlow, onde é encontrado o Trp-212, ele é um arcabouço onde a distribuição dos resíduos de aminoácidos conduz a uma superfície hidrofóbica de um lado e uma superfície carregada positivamente no outro (CARTER, D.C.; HO J. X., 1994), o que indica ser o sítio de ligação das porfirinas aniônicas TPPS e ZnTPPS, por ser um composto de carga compatível. Dessa forma, acreditamos que haja uma maior proximidade do sítio de ligação das porfirinas catiônicas ao triptofano, o que ajudaria explicar o maior efeito dessas porfirinas.

5.2.2. *Foto-oxidação da BSA utilizando um laser*

Devido à queda abrupta nos primeiros minutos de degradação decidimos fazer o monitoramento da fluorescência a cada 5 minutos de irradiação e agora utilizando um laser de estado sólido emitindo em 532 nm com potência em média de (65 ± 3) mW incidindo na

amostra, que se manteve estável durante todo o processo de medida. Os resultados de intensidade relativa do sinal de emissão de fluorescência pelo tempo de irradiação das amostras se encontram na **Figura 16**. Para as medidas de fluorescência, a excitação foi em 280 nm.

Figura 16: Intensidade relativa dos picos de fluorescência com as diferentes fontes de irradiação para as porfirinas analisadas.



Fonte: Autoria própria

Devido à degradação rápida no início da análise, foi necessário fazer um ajuste biexponencial para a obtenção dos tempos de degradação, cuja equação é dada por:

$$y = A_1 e^{-x/t_1} + A_2 e^{-x/t_2} \quad (17)$$

onde A_1 e A_2 representam os fatores pré-exponenciais e t_1 e t_2 os tempos de foto-oxidação associados às devidas taxas de foto-oxidação (k) pela relação $k = 1/t$.

A curva do ajuste da ZnTMPP mostrou valores duvidáveis e por isso não conseguimos obter sua constante de tempo de foto-oxidação. Os resultados das constantes de tempo de foto-oxidação das demais porfirinas, dadas pela equação (16), foram inseridos na **Tabela 5**.

Tabela 5: Constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas irradiadas com o laser e a lâmpada.

Fonte	Amostra	k (s ⁻¹)		A		t (s)	
		k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	A ₁	A ₂	t ₁ (s)	t ₂ (s)
Laser	TMPyP	0,75 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,54 ± 0,00	1,34 ± 0,15	33,38 ± 1,35
	TPPS	0,50 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	1,99 ± 0,20	29,36 ± 2,23
Lâmpada	TMPyP	0,16 ± 0,01		1,00 ± 0,02		6,36 ± 0,54	
	TPPS	0,12 ± 0,01		1,00 ± 0,02		8,37 ± 0,50	

O fator pré-exponencial nos dá qual a contribuição de cada termo. Para a TMPyP a contribuição da rápida foto-oxidação, dada pelo menor tempo de degradação, foi de 46%, enquanto que a contribuição da foto-oxidação mais lenta foi de 54%. Para a TPPS a contribuição mais rápida foi de 47% e a mais lenta de 53%.

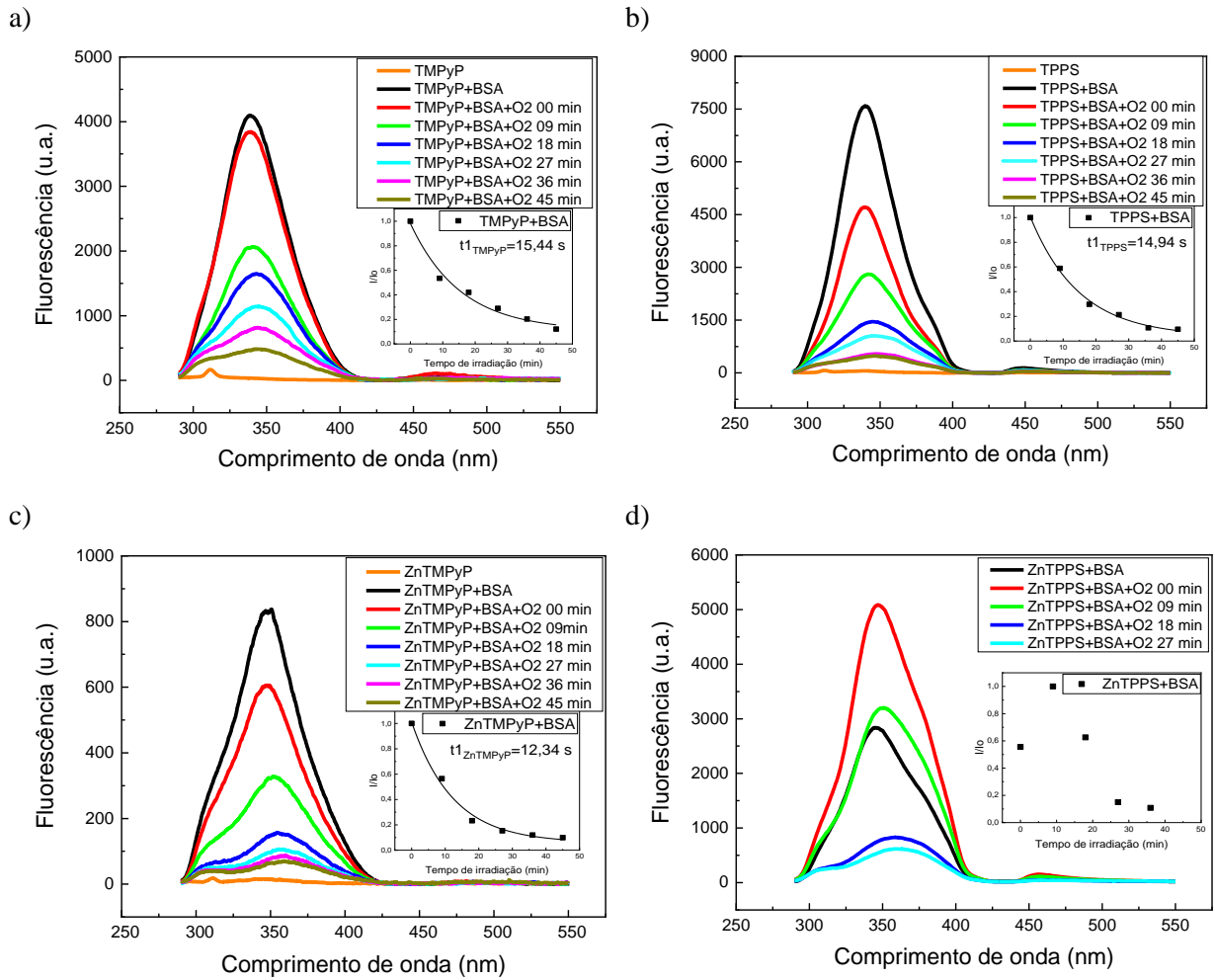
A componente de menor tempo poderia indicar a rápida foto-oxidação e alteração da conformação da BSA, o que bloquearia o acesso do oxigênio, resultando assim em uma segunda etapa de foto-oxidação mais lenta.

Pela análise do gráfico e dos valores da **Tabela 5** podemos concluir que a lâmpada halógena proporciona uma degradação mais rápida do que a do laser. Isso pode estar associado à maior amplitude espectral da fonte em relação ao laser, que poderia estar fotoativando outros componentes da albumina.

5.2.2.1. Efeito da adição de oxigênio na foto-oxidação da albumina

Nesta seção avaliamos a foto-oxidação da albumina em uma solução em que foi adicionado oxigênio, conforme procedimento realizado no final da Seção 4.3.1. Os espectros de fluorescência das amostras estão apresentados na **Figura 17**. Para facilitar as análises, os gráficos de intensidade relativa de fluorescência foram inseridos para cada amostra na presença de BSA com adição de oxigênio e com o ajuste monoexponencial da curva, dado pela equação (15), é possível obter o tempo de degradação da BSA na amostra.

Figura 17: Espectros de fluorescência com adição de oxigênio: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP; d) ZnTPPS.

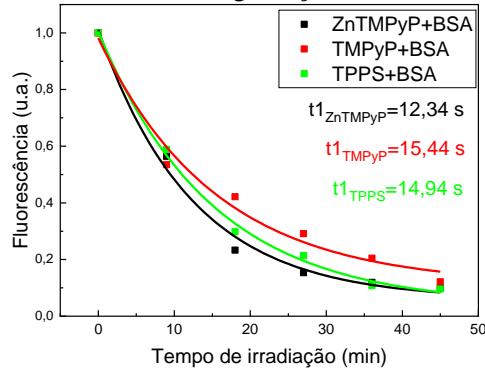


Fonte: Autoria própria

Aqui é indicado o comportamento anormal da amostra de ZnTPPS citado anteriormente que nos fez descartá-la e seguir os estudos apenas com as demais moléculas.

Para uma análise visual, os três gráficos de intensidade relativa de fluorescência pelo tempo de irradiação foram colocados em uma única imagem (**Figura 18**) e juntamente foram inseridos os tempos de degradação de cada uma das amostras.

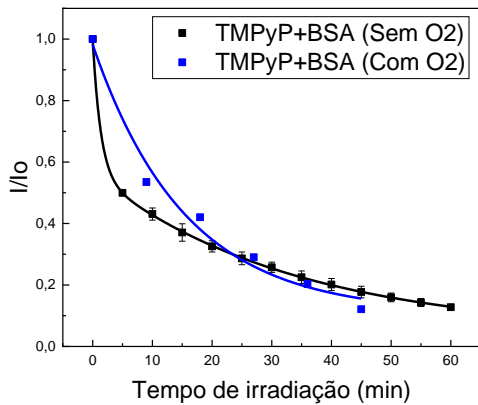
Figura 18: Intensidade relativa de fluorescência para as três amostras analisadas e indicado o tempo de degradação.



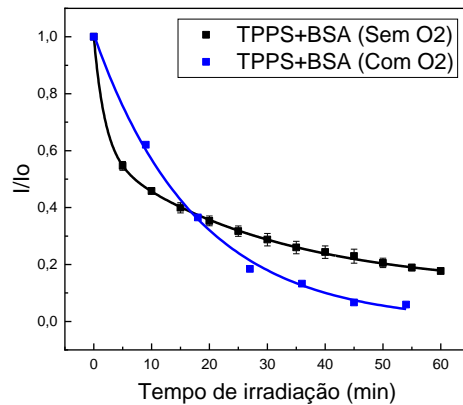
Fonte: Autoria própria

A partir das medidas foi possível comparar os resultados de foto-degradação da BSA na condição de irradiação com a fonte laser, com e sem a adição de oxigênio, para isso foram colocados em um mesmo gráfico seus valores de intensidade relativa de fluorescência pelo tempo de irradiação e seus ajustes exponenciais, como indicado na **Figura 19**.

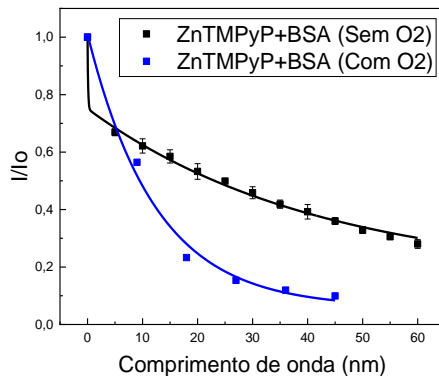
Figura 19: Gráficos da foto-oxidação da BSA pelo módulo laser (532 nm) em solução com e sem adição oxigênio indicando seus respectivos tempos de degradação: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP.



b)



c)



Fonte: Autoria própria

Para a comparação quantitativa usamos as constantes de tempo de foto-oxidação obtidas pela equação (16). Foram feitos ajustes monoexponencias pelo software Origin e os resultados foram inseridos na **Tabela 6**.

Tabela 6: Constantes de tempo de foto-oxidação das porfirinas com e sem a adição de O₂.

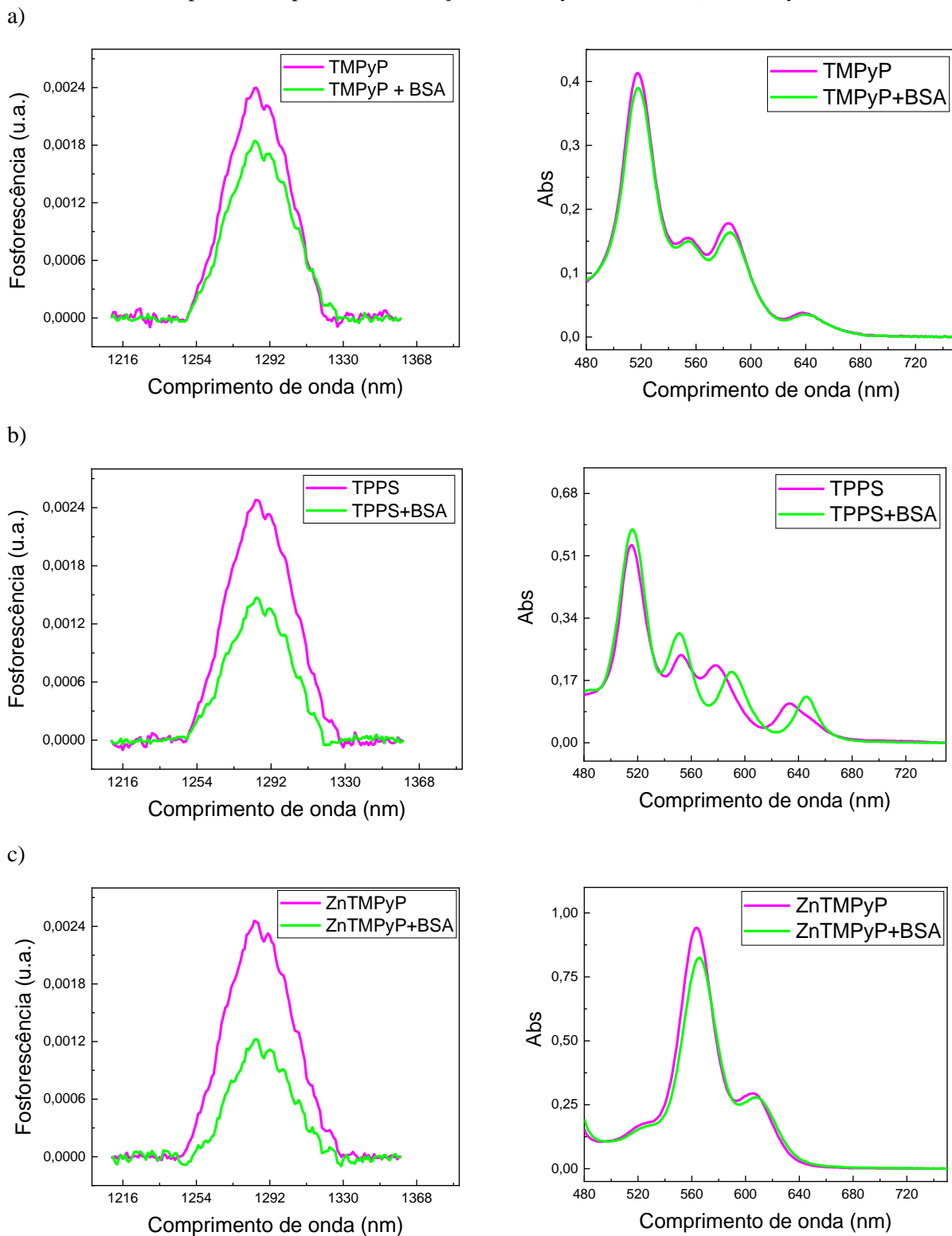
		k (s ⁻¹)		A		t (s)	
		k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	A ₁	A ₂	t ₁ (s)	t ₂ (s)
Sem O ₂	TMPyP	0,75 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,54 ± 0,00	1,34 ± 0,15	33,38 ± 1,35
	TPPS	0,50 ± 0,05	0,03 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	1,99 ± 0,20	29,36 ± 2,23
Com O ₂	TMPyP	0,06 ± 0,01		1,00 ± 0,08		15,44 ± 3,56	
	TPPS	0,07 ± 0,01		1,00 ± 0,04		14,94 ± 1,55	

A presença do oxigênio reduziu a taxa de foto-oxidação da albumina. Nossa hipótese é que a rápida foto-oxidação nos primeiros 5 minutos pode ter mudado a conformação da albumina que bloqueou o acesso do oxigênio, fazendo o processo ficar mais lento.

5.2.2.2. *Efeito da presença da albumina sobre a produção de oxigênio singlete*

Para avaliar a produção de oxigênio singlete na presença da albumina, foi realizado o procedimento descrito na Seção 4.3.1. Como mencionado previamente, nenhum sinal da fosforescência do oxigênio singlete das porfirinas foi obtido na presença da albumina. O sinal só foi observado quando adicionamos oxigênio à solução. O espectro de emissão do oxigênio singlete, bem como o espectro de absorção UV/Vis de cada amostra na ausência e presença da albumina estão apresentados na **Figura 20**.

Figura 20: Espectros de fosforescência sem e com a BSA sob adição de oxigênio e à direita seus respectivos espectros de absorção: a) TMPyP; b) TPPS; c) ZnTMPyP.



Fonte: Autoria própria

Foi calculada a área sob a curva de fosforescência e, com os dados obtidos no espectro de absorção, calculamos o rendimento quântico de oxigênio singlete pela equação (2),

considerando padrão os valores sem a adição de BSA obtidos na literatura (PRASEUTH et al., 1986); (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993), os resultados se encontram na **Tabela 7**.

Tabela 7: Valores das áreas abaixo da curva de fosforescência das amostras com BSA (I_{fos}) e sem (I_{fos0}), valores de absorbância no comprimento de onda de excitação (532 nm) das amostras com BSA (A_{532}) e sem (A_{532-0}), rendimento quântico de oxigênio singlete das amostras sem BSA obtidos na literatura ($\Phi_{\Delta0}$) e com BSA calculados (Φ_{Δ}).

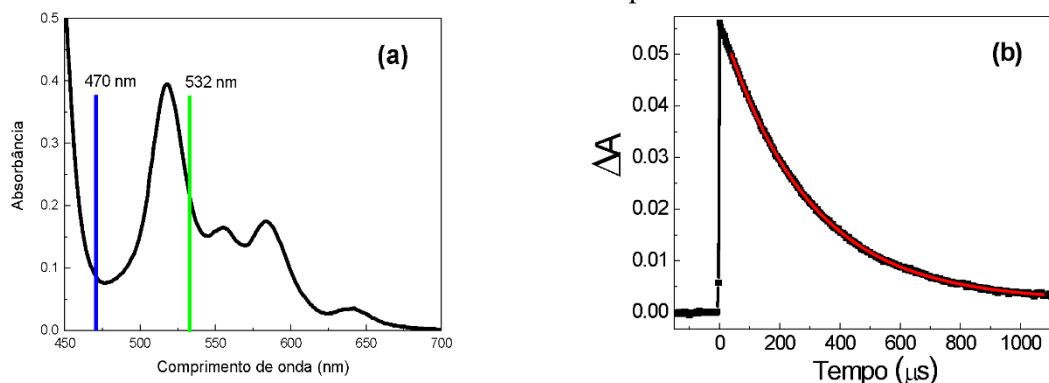
	I_{fos0}	I_{fos}	A_{532-0}	A_{532}	$\Phi_{\Delta0}$	Φ_{Δ}
TPPS+BSA	0,099	0,055	0,234	0,238	0,620	0,336
TMPyP+BSA	0,091	0,071	0,228	0,234	0,740	0,562
ZnTMPyP+BSA	0,101	0,043	0,187	0,177	0,880	0,391

Com estes resultados podemos concluir que a presença da BSA reduz a produção de oxigênio singlete, com porcentagens de 54% para a TPPS, 76% para a TMPyP e 44% para a ZnTMPyP.

5.2.2.2.1. *Explicação do efeito pelos tempos de vida do estado tripleto*

Como indicado na metodologia (Seção 4.3.2) usamos a técnica da Flash Fotólise para a obtenção dos tempos de vida do estado tripleto. Na **Figura 21-a**) está apresentado o espectro de absorção da porfirina TMPyP e estão destacados os comprimentos de onda do laser de excitação (532 nm) e o comprimento de onda de análise (470 nm). A **Figura 21-b**) apresenta a curva de decaimento do estado tripleto da porfirina TMPyP. O tempo de vida do estado tripleto é obtido através do ajuste de um decaimento monoexponencial utilizando o software Origin.

Figura 21: a) Espectro de absorção do estado fundamental da porfirina TMPyP e b) decaimento do estado tripleto.



Fonte: Alterado de (DUCAS E. S. A., 2021)

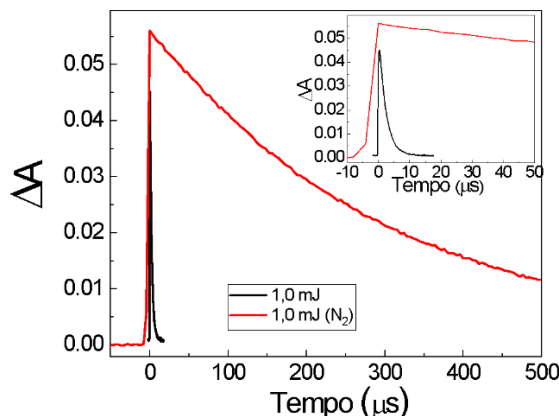
O estado tripleto é um estado metaestável, com tempo de vida da ordem de microssegundos. Esse estado pode reagir com o oxigênio molecular, transferindo sua energia para formar o oxigênio singleto. Essa interação reduz o tempo de vida do estado tripleto. A comparação do tempo de vida na presença do oxigênio permite obter a constante de supressão bimolecular k_q do estado tripleto pelo oxigênio. Isso pode ser realizado analisando as constantes de decaimento ($k_i = 1/t_i$) na presença e ausência de oxigênio na solução. Para isso, se utiliza a relação:

$$k = k_0 + k_q[O_2] \quad (18)$$

Em que k_0 é a constante de decaimento do estado tripleto na ausência do oxigênio molecular, k é a constante de decaimento na presença de oxigênio e $[O_2]$ a concentração de oxigênio na solução ($[O_2] = 2,4 \cdot 10^{-4} M$) (AGGARWAL L.P.F., 2005). O oxigênio foi retirado da solução através do borbulhamento de nitrogênio na solução durante 20 min.

Os tempos de vida de tripleto na presença do oxigênio e ausência são descritos na **Tabela 8**. Esses tempos de vida são semelhantes aos encontrados na literatura (GONCALVES P. J., 2011). Diante desses valores, a equação (18) permitiu obter os valores de k_q , que são da ordem do processo ocorrendo em solução aquosa controlado pela difusão.

Figura 22: Curvas de decaimento do estado tripleto da amostra TMPyP: em preto o decaimento com oxigênio, e em vermelho com borbulhamento de nitrogênio.



Fonte: (DUCAS E. S. A., 2021)

Tabela 8: Tempos de vida do estado tripleto na presença de oxigênio τ , e na ausência do oxigênio τ_0 e a constante de supressão k_q .

	τ , μs	τ_0 , μs	k_q , $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
TPPS	2,4	121,0	1,7
TMPyP	2,7	112,0	1,5
ZnTMPyP	3,4	133,0	1,2

Esses dados ajudam a explicar o resultado anterior do efeito da albumina na produção de oxigênio singleto (seção 5.2.2.2). O processo de difusão é o que faz com que o agente fotossensibilizador encontre oxigênio para ocorrer a transferência de energia. Na presença da albumina há um bloqueio da difusão. Dessa forma, a presença da albumina na solução atua como um obstáculo para o encontro entre o FS e o oxigênio. Assim, explicando o motivo de não conseguirmos fazer a medida de oxigênio singleto na presença da albumina. Isso só foi possível com a adição de oxigênio na amostra, que com a saturação do oxigênio na solução, facilitamos o acesso do FS, o que nos forneceu um sinal de fosforescência.

CONCLUSÕES

O presente trabalho de conclusão de curso permitiu compreender os princípios básicos da Terapia Fotodinâmica. Foi realizado um estudo da foto-oxidação da BSA por porfirinas hidrossolúveis catiônicas e aniônicas utilizando uma fonte halógena e um módulo laser emitindo em 532 nm. Foi encontrado um protocolo que permitiu a obtenção reprodutiva das constantes de tempo de foto-oxidação obtidas a partir dos espectros de fluorescência. Também foi analisado o efeito da adição de oxigênio na constante de tempo de foto-oxidação e, por fim, foi avaliado o efeito da albumina na produção de oxigênio singlete por meio dos valores de rendimento quântico de oxigênio singlete obtidos. Concluímos que a presença do zinco aumenta a foto-oxidação por ser um átomo pesado, o que favorece a produção de estados tripletes e oxigênio singlete. Além disso, as porfirinas catiônicas mostraram ter maior constante de tempo de foto-oxidação, o que pode ser atribuído à sua maior proximidade com o triptofano, que é um resíduo de aminoácido aromático responsável pela emissão de fluorescência. Quando alteramos a fonte de irradiação para o módulo laser, obtivemos uma degradação descrita por um processo biexponencial. A componente mais rápida poderia indicar a rápida foto-oxidação e alteração conformacional da BSA, o que bloquearia o acesso do oxigênio, resultando assim em uma segunda etapa de foto-oxidação mais lenta. A saturação da solução contendo a amostra, com adição de oxigênio, aumentaria a disponibilidade de oxigênio na solução de forma a evitar o possível bloqueio resultante de uma alteração conformacional, e assim a taxa de foto-oxidação volta a ser monoexponencial. Os experimentos também mostraram que a presença da BSA reduz a produção de oxigênio singlete. Esse resultado pôde ser explicado pelo fato da BSA servir como um obstáculo para a difusão e encontro entre o fotossensibilizador e o oxigênio, reduzindo o processo de transferência de energia e consequentemente a formação do oxigênio singlete.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL L.P.F. Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS₄ e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica. Ribeirão Preto - SP (2005).

BELATIK, A. et al. Locating the Binding Sites of Pb (II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. PLoS ONE, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e36723, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036723>.

BEZERRA, F. C.; SILVEIRA-ALVES, E; LEITE, C. K.; SOUZA, G. R. L. **Inativação fotodinâmica: Aspectos fotofísicos e aplicações no combate a microrganismos.** In: DAL MOLIN, R. S.; LOPES, A. N. (eds.). **Infectologia bases epidemiológicas e clínicas.** 1st ed. Guarujá: Editora Científica, 2021. p. 13–32. DOI 10.37885/210303817. Available at: <http://www.editoracientifica.org/articles/code/210303817>.

BUJACZ, A. "Structures of bovine, equine and leporine serum albumin." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 68.10 (2012): 1278-1289.

CARTER D. C. and HO J. X., "Structure of Serum Albumin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, Jan. 1994.

CAVALCANTE R.S., IMASATO H., BAGNATO V.S., PERUSSI J.R., A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers, *Laser Phys. Lett.* 6 (2009) 64-70.

DUCAS E. S. A., Implantação das técnicas espectroscópicas para o estudo dos efeitos da albumina nos estados excitados de porfirinas e seus complexos de zinco II. Qualificação (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2021.

GONCALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M.; LIMA, A. R.; TELES, A. V.; OLIVEIRA, T. M. dos A.; BEZERRA, F.C.; ALVES JR, E. S.; LEITE, C.K.; SOUZA, G.R.L. Inativação Fotodinâmica: aspectos fotofísicos e aplicações no combate a microrganismos (2021).

GONCALVES P. J., FRANZEN P. L., CORREA D. S., ALMEIDA L. M., TAKARA M., ITO A. S., ZILIO S. C., BORISSEVITCH I. E., *Spectrochim. Acta A*, 79 (2011) 1532–1539.

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.

NONELL S. et al. *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*. Royal Society of Chemistry (2016).

OLIVEIRA K.T., SOUZA J.M., GOBO R.S., ASSIS F.F., BROCKSON T.J., Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônica. *RVQ*, v.7, n.1, 10 (2014).

PATTISON D.I., RAHMANTO A.S., DAVIES M. J., Photo-oxidation of proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, 11,38.

PRASEUTH, D., GAUDEMER, A., VERLHAC, J.-B., KRALIC, I., SISOBOFF, I., & GUILLB, E. (1986) *Photochem. Photobiol.* 44,717-724.

QUORA (2018, p.3) **Diagrama de energias dos estados singleto e tripleto** <https://pt.quora.com/Por-que-subst%C3%A2ncias-fluorescentes-ou-fosforescentes-brilham-e-qual-%C3%A9-a-diferen%C3%A7a-entre-elas#:~:text=A%20diferen%C3%A7a%20entre%20a%20fosforesc%C3%A2ncia,quando%20param%20de%20receber%20energia> . Acesso em 17 de janeiro de 2024.

RONSEIN, Graziella Eliza et al. **Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas**. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 563-568, (2006). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000300027>. Acesso em: 18 jan. 2024.

SINTRA R. IFSC/USP no combate às bactérias resistentes – Na vanguarda das pesquisas utilizando foto-oxidação. 2024. Disponível em: <http://saocarlos.usp.br/ifsc-usp-no-combate-as-bacterias-resistentes-na-vanguarda-das-pesquisas-utilizando-foto-oxidacao/>. Acesso em 17 jan. 2024.

SMITH K. M. and FALK J. E., *Porphyrins and metalloporphyrins : a new edition based on the original volume by J.E. Falk*. Elsevier Scientific Pub. Co, 1975.

TERAPIA fotodinâmica é incorporada no SUS. *In: Terapia fotodinâmica é incorporada no SUS* [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2023/setembro/terapia-fotodinamica-e-incorporada-no-sus>. Acesso em: 17 jan. 2024.

USUÁRIOS do SUS com câncer de pele basocelular serão tratados com inovação 100% nacional. *In: Usuários do SUS com câncer de pele basocelular serão tratados com inovação 100% nacional*. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt->

[br/assuntos/noticias/2023/julho/usuarios-do-sus-com-cancer-de-pele-basocelular-serao-tratados-com-inovacao-100-nacional](https://br.assuntos/noticias/2023/julho/usuarios-do-sus-com-cancer-de-pele-basocelular-serao-tratados-com-inovacao-100-nacional). Acesso em: 17 jan. 2024.

VALEUR, B. (2002) Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim.

ZHANG, X. F. Laser Flash Photolysis. Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, First Edition, Institute of Applied Photochemistry, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei, China, (2017).