



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Avaliação Fotodinâmica de Porfirinas de Pd(II) em
Modelos Tumorais *In Vitro*

EDYNARA CRUZ DE MORAES

GOIÂNIA-GO

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 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 das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) 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 material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Edynara Cruz de Moraes

3. Título do trabalho

Avaliação fotodinâmica de porfirinas de Pd(II) em modelos tumorais *in vitro*

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento 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(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

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;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

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



Documento assinado eletronicamente por **Edynara Cruz De Moraes, Discente**, em 25/03/2026, às 10:24, 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 **Pablo Jose Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2026, às 21:14, 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?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&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 **6082782** e o código CRC **BCA5CE73**.

EDYNARA CRUZ DE MORAES

**Avaliação Fotodinâmica de Porfirinas de Pd(II) em
Modelos Tumoriais *In Vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a defesa - Nível Doutorado.

Área de Concentração: Biofotônica

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

GOIÂNIA-GO

2026

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

CRUZ DE MORAES, EDYNARA
Avaliação Fotodinâmica de Porfirinas de Pd(II) em Modelos Tumorais In Vitro [Manuscrito] / EDYNARA CRUZ DE MORAES. - 2026.
CXIII, 113 f.: il. 2026

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves; co-orientadora: Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2026.

Ilustrações.

Apêndice.

Bibliografia.

Inclui: siglas, símbolos, tabelas, gráfico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fotossensibilizador. 2. Metaloporfirinas. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Câncer de Pele. 5. Câncer de Pâncreas.

I. Gonçalves, Pablo José, orient. II. Lacerda, Elisângela de Paula Silveira, co-orient. III. Título.

CDU 53



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata N° 86 da sessão de Defesa de Tese de Edynara Cruz de Moraes que confere o título de Doutora em Física, na área de concentração em Física.

Aos 27 dias do mês de fevereiro de 2026, a partir das 14h00min, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Avaliação fotodinâmica de porfirinas de Pd(II) em modelos tumorais *in vitro*”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Pablo José Gonçalves (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Anderson Rodrigues Lima Caires (INFI/UFMS), membro titular externo; Professor Doutor Leonardo Pereira Franchi (ICB/UFG), membro titular externo; Professor Doutor Antonio Alonso (IF/UFG), membro titular interno; e Professor Doutor Ricardo Costa de Santana (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 a candidata aprovada 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 27 dias do mês de fevereiro de 2026.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Costa De Santana, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2026, às 18:04, 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 27/02/2026, às 18:04, 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 **Pablo Jose Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2026, às 18:04, 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 **Leonardo Pereira Franchi, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2026, às 10:48, 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 **5952391** e o código CRC **DCE80860**.

Referência: Processo nº 23070.005104/2026-20

SEI nº 5952391

Dedicatória

*Aos meus pais dedico esta pesquisa.
Os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos.
Muito obrigada!*

*De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que ele estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro.*

- SÁBULO, Fernando Tavares

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, e por sempre me dar forças para seguir minha jornada de cabeça erguida;

Aos meus pais, Puresa e Edson, e minhas irmãs, Nylida Mara, Mayara Kely e Lara Raquel, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Essa é mais uma conquista nossa. Amo vocês;

Ao meu marido, Yuri Silva Pitaluga, que sempre me faz rir e me traz alegria todos os dias. Obrigada por me incentivar e apoiar incondicionalmente na realização dos meus sonhos, estando ao meu lado em cada passo desta jornada. Sua presença torna tudo mais leve e possível. Te amo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pablo José Gonçalves, pela orientação dedicada, rigor científico e ensinamentos transmitidos ao longo desta jornada. Sua competência e apoio constante foram essenciais para a realização deste trabalho e para meu crescimento como pesquisadora.

A Dra. Elisângela Lacerda de Paula, que me acolheu no momento mais difícil do meu doutorado, quando eu mais precisava de apoio e direção. As pós-doc Lívia do Carmo Silva e Juliana Santana de Cúrcio, expresso minha sincera gratidão pela parceria, amizade, disponibilidade, apoio técnico e intelectual durante todo o desenvolvimento desta pesquisa. A convivência e o aprendizado compartilhado com vocês foram fundamentais para o crescimento deste trabalho e para minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, por me permitir desenvolver parte da minha pesquisa junto à sua competente equipe na UFSCar. Agradeço também a todos os membros do grupo pela colaboração e, em especial, ao pós-doc Dr. Marcos Palmeira, pelo apoio, dedicação e pelas valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

A Dra. Tayyba Nasan, pela orientação atenciosa, pelo acolhimento generoso durante minha experiência no Wellman Center for Photomedicine e, sobretudo, pela inspiração como mulher na ciência. Aos membros de sua equipe, pela competência e colaboração em todas as etapas, em especial à pós-doc Dra. Fernanda Viana Cabral,

pela supervisão dedicada e pelas valiosas contribuições durante meu doutorado sanduíche.

Aos demais professores do Instituto de Física da UFG que de uma ou outra forma também contribuíram para com este trabalho; Ao meu querido aluno de ic Lucas

A todos da minha Família que amo muito, em especial as minhas tias, Maria do Carmo e Maria Socorro, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Ao meu cunhado, Prof. Dr. Felipe França Faria, por me acompanhar desde a graduação e incentivar a seguir os caminhos da pesquisa;

Aos meus amigos Alisson e Diego

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

Sumário

<i>Capítulo 1</i>	16
<i>Introdução</i>	16
<i>Objetivos</i>	22
<i>Objetivo Geral</i>	22
<i>Objetivos Específicos</i>	22
<i>Capítulo 2</i>	23
<i>Fundamentos Teóricos</i>	23
2.1 <i>Uma breve história da PDT</i>	24
2.2 <i>Princípios fundamentais da Terapia Fotodinâmica</i>	26
2.2.1 <i>Processos fotofísicos e fotoquímicos</i>	27
2.3 <i>Fotossensibilizadores em PDT</i>	31
2.3.1 <i>Porfirinas e o efeito do Átomo Pesado</i>	34
2.3.2 <i>Propriedades de Complexos de Paládio e Relevância Oncológica</i>	36
2.4 <i>Processos fotobiológicos em Terapia Fotodinâmica</i>	38
2.4.1 <i>Danos diretos em PDT</i>	38
2.4.2 <i>Danos indiretos em PDT</i>	39
4.2.3 <i>PDT no Melanoma: Entre Barreiras Biológicas e Oportunidades Terapêuticas</i>	41
4.2.4 <i>PDT no Adenocarcinoma Ductal Pancreático: Remodelando o Microambiente Tumoral</i>	43
<i>Capítulo 3</i>	47
<i>Materiais e métodos</i>	47
3.1 <i>Complexos porfirínicos: $\{TPyP[PdCl(P-P)]_4\}(PF_6)_4$</i>	48
3.2 <i>Fotofísica e fotoquímica</i>	49
3.2.1 <i>Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis</i>	49
3.2.2 <i>Medições dos estados tripleto</i>	49

3.2.3	<i>Determinação de rendimento de formação de oxigênio singlete: método direto</i>	50
3.3	<i>Investigação biológica</i>	51
3.3.1	<i>Estudo de interação com BSA</i>	51
3.3.2	<i>Câncer de pele tipo melanoma</i>	52
3.3.2.1	<i>Condições de cultivo celular</i>	52
3.3.2.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	52
3.3.2.3	<i>Ensaio de fototoxicidade</i>	53
3.3.2.4	<i>Ensaio morfológico</i>	53
3.3.2.5	<i>Determinação dos níveis intracelulares de ROS</i>	54
3.3.2.6	<i>Ensaio clonogênico</i>	54
3.3.2.7	<i>Ensaio de migração celular</i>	55
3.3.3	<i>Câncer Pancreático</i>	55
3.3.3.1	<i>Fotobiologia em modelo 3D de câncer pancreático</i>	55
3.3.3.2	<i>Esferóides 3D homogêneo</i>	56
3.3.3.3	<i>Esferóides 3D: simulação de desmoplasia</i>	56
3.3.3.4	<i>Parâmetros de irradiação</i>	56
3.3.3.5	<i>Análise de Viabilidade</i>	57
3.3.3.6	<i>Medição de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)</i>	57
3.3.3.7	<i>Uptake por Citometria de Fluxo</i>	58
3.3.3.8	<i>Detecção de Calreticulina</i>	58
3.3.3.9	<i>Avaliação de Danos Organelares</i>	58
3.3.3.10	<i>Análise estatística</i>	59
Capítulo 4		60
	<i>Propriedades fotofísicas e interação com biomolécula</i>	60
4.1	<i>Propriedades fotofísicas dos FS</i>	61
4.1.1	<i>Espectros de absorvância</i>	61

4.1.2	<i>Rendimento quântico de formação de estados tripletos e oxigênio singleto..</i>	61
4.2	<i>Interação com biomoléculas</i>	63
4.2	<i>Interação com BSA.....</i>	63
4.3	<i>Discussão</i>	65
Capítulo 5	67
<i>Atividade fotodinâmica em modelo 2D de câncer de pele tipo melanoma</i>		67
5.1	<i>Avaliação citotóxica</i>	68
5.2	<i>Avaliação fototóxica dos complexos</i>	70
5.4	<i>Resposta Clonogênica.....</i>	74
5.5	<i>Inibição da Migração</i>	76
5.6	<i>Análise da Geração de ROS</i>	77
5.7	<i>Discussão</i>	78
5.8	<i>Conclusão</i>	81
Capítulo 6	82
<i>Atividade fotodinâmica em modelo 3D de câncer de pâncreas</i>		82
6.1	<i>Eficiência de internalização celular.....</i>	83
6.2	<i>Eficácia da Terapia Fotodinâmica em modelo tumoral 3D homogêneo</i>	83
6.3	<i>TFD em Modelo Tumoral 3D Heterogêneo</i>	85
6.4	<i>Análise Cinética da Geração de ROS Induzida.....</i>	87
6.5	<i>Imunogenicidade Induzida pela Terapia Fotodinâmica com Porf@dppf.....</i>	88
6.6	<i>Acúmulo Subcelular de Complexos Metálicos: Efeitos em Lisossomos e Mitocôndrias</i>	89
6.7	<i>Discussão.....</i>	90
6.8	<i>Conclusão</i>	93
<i>Perspectivas futuras</i>		94
Referencias		95

Lista de abreviaturas de siglas

- OH. Radical hidroxila
- $^1\text{O}_2$. Oxigênio singlete
- 2D. *Bidimensionais*
- 3D. *Tridimensionais*
- ALA. Ácido 5-aminolevulínico
- APCs. *Antigen-Presenting Cells*
- CAFs. *Cancer-Associated Fibroblasts*
- CD. *Immunogenic Cell Death*
- CI. Conversão interna
- CIS. Cruzamento intersistema
- Conitec. *Comitê de Avaliação de Tecnologias em Saúde*
- CRT. *Calreticulin*
- CTLA-4. Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Protein 4
- DAMFS. Damage-Associated Molecular Patterns
- DMEM. *Modified Eagle Medium*
- DMSO. *Dimethyl sulfoxide*
- dppb. *1,4-bis(difenilfosfino)butano*
- dppe. *1,2-bis(difenilfosfino)etano*
- dppf. *1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno*
- dppp. *1,3-bis(difenilfosfino)propano*
- ECM. *Extracellular Matrix*
- FDA. *Food and Drug Administration*
- H_2O_2 . Peróxido de hidrogênio
- HMGB1. *High-Mobility Group Box 1*
- HP. *Hematoporfirina*
- HpD. *Hematoporphyrin derivatives*
- IF. *Índice de Fototoxicidade*
- LFP. *Laser Flash Photolysis*
- $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ânion superóxido
- PD-1. Programmed Cell Death Protein
- PDAC. Pancreatic ductal adenocarcinoma
- PDI. Photodynamic Inactivation, Photodynamic Inactivation

PD-L1. Programmed Death-Ligand 1

PDP. Photodynamic Priming

PDT. Photodynamic Therapy

FS. Fotossensibilizador

FSCs. Pancreatic Stellate Cells

ROS. Reactive Oxygen Species

RT. Radioterapia

RV. Relaxamento vibracional

SUS. Sistema Único de Saúde

TPyP. Tetra(4-piridil)porfirina

USP. *Universidade de São Paulo*

Lista de figuras

Figura 1: Marcos do Câncer — novas adições. Adaptado de Hanahan 2022 [5].	17
Figura 2: Diagrama de Jablonski representando os processos de absorção de energia, relaxação vibracional, fluorescência, fosforescência e conversão intersistêmica entre os estados excitados singlete e triplete de uma molécula. Na esquerda da figura, temos a representação espectros de absorção (linha azul), fluorescência (linha vermelha) e fosforescência (linha roxa). Adaptado de Abdel (2014) [17].	28
Figura 3: Estrutura básica dos FSs: Porfirina, bacterioclorina, clorina e ftalocianina. Adaptado de Baskaran, R., Lee, J., & Yang, S. G. (2018)[40].	32
Figura 4: Nomenclatura das posições atômicas do macrociclo: designação numérica e designação do sítio Fonte [41].	34
Figura 5: Espectro de absorção UV–Vis porfirínico, evidenciando a banda intensa de Soret (B) e as bandas Q [43].	35
Figura 6: Ilustração esquemática do mecanismo da PDT. Três mecanismos de lesão tumoral mediada por PDT in vivo : danos diretos as células, dano vascular e inflamação e respostas imunes. Adaptado de Liuchang Tan et al (2022) [51].	41
Figura 7: Representação esquemática do microambiente tumoral de adenocarcinoma ductal pancreático antes e após a Terapia Fotodinâmica (Fonte: autor próprio).	45
Figura 8: Representação das estruturas químicas dos precursores de paládio: (a) PdCl ₂ (dppe), (b) PdCl ₂ (dppp), (c) PdCl ₂ (dppb) e (d) PdCl ₂ (dppf)	48
Figura 9: Estruturas químicas dos complexos de paládio(II) derivados da porfirina meso-tetra(4-piridil) (TPyP): A) Porf@dppe, B) Porf@dppp, C) Porf@dppb e D) Porf@dppf.	49
Figura 10: Espectros apresentaram picos característicos dos complexos de porfirinas .	61
Figura 11: Curvas de decaimento de ΔA_0 em função da energia dos compostos.	62
Figura 12: Espectro fosforescência do oxigenio singlete	63
Figura 13: Espectros de fluorescência da solução de BSA (2,5 μ M) em tampão Tris–HCl (0,1 M NaCl, pH 7,4) na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos (A) Porf@dppb, (B) Porf@dppf a 298 K.	64
Figura 14: Gráfico de Stern–Volmer para o apagamento da fluorescência da BSA complexo (A) Porf@dppb e (B) Porf@dppf.	65
Figura 15: Viabilidade celular de (A) A375, (B) B16F10 e (C) Hacat tratadas com os precursores na ausência de luz. Viabilidade celular de (D) A375, (E) B16F10 e (F) HACAT complexos porfirínicos na ausência de luz.	69

Figura 16: Viabilidade celular de (A) A375, (B)B16F10 e (C) Haca7 tratadas com complexos porfirínicos na presença de luz.....	72
Figura 17: Análise morfológica de células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm ²). Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul), enquanto o iodeto de propídio (PI) (vermelho) foi utilizado para identificar perda de integridade de membrana associada à morte celular.	74
Figura 18: Análise do ensaio clonogênico em células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm ²). (a) Imagens representativas das colônias clonogênicas formadas após a PDT com os fotossensibilizadores testados. (b) Análise quantitativa da eficiência de formação de colônias em relação ao grupo controle (não irradiado). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p < 0,05).	75
Figura 19: Ensaio de migração de células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm ²). (a) Imagens representativas do ensaio de cicatrização (“wound healing”), mostrando a migração celular para a área do risco 24 h após o tratamento. (b) Análise quantitativa do fechamento da ferida (%) para células tratadas com Porf@dppf. (c) Análise quantitativa do fechamento da ferida (%) para células tratadas com Porf@dppb. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. ns = não significativo (p > 0,05); **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.....	77
Figura 20: Geração intracelular de ROS em células de melanoma A375 tratadas com os complexos Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm ²). Os níveis de ROS foram detectados utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. ns = não significativo (p > 0,05); *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,0001.	78
Figura 21:Captação intracelular dos compostos Porf@dppb e Porf@dppf em células MIA PaCa-2 após 90 minutos de incubação no escuro. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão. **p < 0,01; ***p < 0,0001.	83
Figura 22: Imagens de fluorescência (mCherry) e curva dose-resposta da PDT de esferoides homogêneos de MIA PaCa-2 tratados com os compostos Porf@dppf e Porf@dppb na concentração de (A e B, respectivamente) 1 µM, (C e D, respectivamente) 2 µM e (E e F,) 3 µM, seguidos de irradiação com diferentes doses de luz (1,5; 3; 6 e 10	

J/cm ²). Grupos controle (não tratados) e dark (tratados sem luz) foram incluídos para comparação.....	84
Figura 23: Curva dose-resposta da DPT. Quantificação da intensidade de fluorescência mCherry e EGPF e curva dose resposta em esferoides heterogêneos de MIA PaCa-2 cocultivados com PCAFs e tratados com Porf@dppb e Porf@dppf na concentração de (A e B, respectivamente) 1 μM, (C e D, respectivamente) 2 μM e (E e F, respectivamente) 3 μM após irradiação com doses crescentes de luz (1,5; 3; 6 e 10 J/cm ²). Os valores de fluorescência foram normalizados em relação ao grupo dark.	86
Figura 24: Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelo composto (a) Porf@dppb e (b) Porf@dppf (3 μM) em células tratadas sob diferentes condições de luz. As células foram expostas a doses de luz de 1,5; 3; 6 e 10 J/cm ²	88
Figura 25: Exposição de calreticulina na superfície celular após tratamento com o composto Porf@dppf (3 μM) e irradiação com doses crescentes de luz (0, 1,5 e 10 J/cm ²). Observa-se uma resposta dependente da dose, com forte sinal de fluorescência na dose.	89
Figura 26: Análise por microscopia de fluorescência da integridade mitocondrial (vermelho), lisossomal (verde) e nuclear (azul) após tratamento com os complexos....	90

Lista de tabelas

Tabela 1: Reações fotofísicas e seus respectivos tempos característicos. Adaptado de Plaetzer et al, (2009).	29
Tabela 3: Rendimentos quânticos de estado tripleto (Φ_T) e de oxigênio singleto (Φ_Δ) dos complexos.	63
Tabela 4: Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) para o sistema composto-HSA.	65
Tabela 5: Valores de IC_{50} (μM) obtidos para os complexos precursores de paládio e seus complexos porfirínicos na ausência da luz. Os índices de seletividade ($IS1 = Hacat/A375$; $IS2 = Hacat/B16F10$) foram calculados a partir dos valores de IC_{50} correspondentes... ..	70
Tabela 6: Valores de IC_{50} (μM) obtidos para os complexos porfirínicos na presença da luz. IF1 refere-se às células Hacat, IF2 às células A375, e IF3 às células B16-F10.	73
Tabela 7: Valores de IC_{50} (J/cm^2) para os fotossensibilizadores Porf@dppf e Porf@dppb nas concentrações de 1, 2 e 3 μM em esferoides tumorais 3D compostos por células mCherry-MIA PaCa-2.	85
Tabela 8: Valores de IC_{50} (J/cm^2) obtidos para o composto Porf@dppf testado em diferentes concentrações (1, 2 e 3 μM) em esferoides tumorais 3D. A viabilidade foi avaliada em duas linhagens celulares: mCherry-MIA PaCa-2 (adenocarcinoma ductal pancreático humano).	86

Resumo

O câncer permanece como uma das principais causas de mortalidade no mundo, apresentando elevada resistência terapêutica e potencial metastático, o que reforça a necessidade de abordagens alternativas e seletivas, como a Terapia Fotodinâmica. Neste trabalho, foi avaliado o potencial fotodinâmico de quatro porfirinas *meso*-tetra(4-piridil) complexadas com paládio(II) e ligantes difosfínicos (Porf@dppe, Porf@dppp, Porf@dppb e Porf@dppf), incluindo a caracterização fotofísica, interação com biomoléculas e aplicação em diferentes modelos experimentais de câncer, como melanoma humano (A375), melanoma murino (B16F10) e modelos tridimensionais (3D) de adenocarcinoma ductal pancreático, além de queratinócitos não tumorais (Hacat). A caracterização fotofísica revelou elevados rendimentos de formação do estado tripleto e de geração de oxigênio singlete para os complexos Porf@dppe, Porf@dppp e Porf@dppb ($\Phi_T \approx 0,72-0,93$; $\Phi_\Delta \approx 0,62-0,67$), enquanto o Porf@dppf apresentou valores menores, atribuídos à presença da unidade ferrocênica. Estudos com albumina sérica bovina indicaram constantes de ligação moderadas, sugerindo transporte plasmático eficiente. Em modelos bidimensionais de melanoma, os compostos exibiram baixa citotoxicidade no escuro e elevada fototoxicidade sob luz azul ($\lambda = 415$ nm), com valores de IC_{50} na faixa nanomolar após a irradiação. O Porf@dppb destacou-se pela maior seletividade fotodinâmica, enquanto o Porf@dppf apresentou maior citotoxicidade global, associada à geração sustentada de espécies reativas de oxigênio. Ensaio biológicos demonstraram alterações morfológicas, aumento de ROS, redução da clonogenicidade e da migração celular. Em modelos 3D de adenocarcinoma ductal pancreático, a Terapia Fotodinâmica com luz vermelha ($\lambda = 635$ nm) revelou maior eficácia do Porf@dppf em comparação ao Porf@dppb, associada à maior captação celular, geração sustentada de espécies reativas de oxigênio e indução de morte celular imunogênica, evidenciada pela exposição de calreticulina. Em conjunto, os resultados indicam que as metaloporfirinas de paládio(II) são fotossensibilizadores promissores para aplicações fotodinâmicas em diferentes tipos de câncer.

Palavras-chave: Fotossensibilizador, Metaloporfirinas, Terapia Fotodinâmica, Câncer de pele, Câncer de pâncreas.

Abstract

Cancer remains one of the leading causes of mortality worldwide, exhibiting high therapeutic resistance and metastatic potential, which reinforces the need for alternative and selective approaches such as Photodynamic Therapy. In this work, the photodynamic potential of four meso-tetra(4-pyridyl) porphyrins complexed with palladium(II) and diphosphine ligands (Porf@dpe, Porf@dppp, Porf@dppb, and Porf@dppf) was evaluated, including photophysical characterization, biomolecular interactions, and application in different experimental cancer models, such as human melanoma (A375), murine melanoma (B16F10), and three-dimensional (3D) models of pancreatic ductal adenocarcinoma, as well as non-tumoral keratinocytes (Hacat). Photophysical characterization revealed high triplet-state formation and singlet oxygen generation yields for the Porf@dpe, Porf@dppp, and Porf@dppb complexes ($\Phi_T \approx 0.72\text{--}0.93$; $\Phi_\Delta \approx 0.62\text{--}0.67$), whereas Porf@dppf exhibited lower values, attributed to the presence of the ferrocene unit. Studies with bovine serum albumin indicated moderate binding constants, suggesting efficient plasma transport.

In two-dimensional melanoma models, the compounds exhibited low dark cytotoxicity and high phototoxicity under blue light ($\lambda = 415$ nm), with IC_{50} values in the nanomolar range after irradiation. Porf@dppb stood out for its higher photodynamic selectivity, whereas Porf@dppf showed greater overall cytotoxicity, associated with sustained reactive oxygen species generation. Biological assays demonstrated morphological alterations, increased reactive oxygen species levels, and reduced clonogenicity and cell migration. In 3D pancreatic ductal adenocarcinoma models, photodynamic therapy under red light ($\lambda = 635$ nm) revealed higher efficacy of Porf@dppf compared to Porf@dppb, associated with enhanced cellular uptake, sustained reactive oxygen species generation, and induction of immunogenic cell death, as evidenced by calreticulin exposure. Taken together, these results indicate that palladium(II) metalloporphyrins are promising photosensitizers for photodynamic applications in different types of cancer.

Keywords: Photosensitizer, Metalloporphyrins, Photodynamic Therapy, Skin Cancer, Pancreatic Cancer.

Capítulo 1

Introdução

O câncer é uma doença com uma longa história, e o primeiro relato remonta ao manuscrito do médico egípcio *Imhotep*, datado de 2500 a.C., conforme mencionado pelo oncologista indo-americano Siddhartha Mukherjee em seu livro "O Imperador de Todos os Males: Uma Biografia do Câncer". Nesse antigo documento, *Imhotep* descreveu o câncer como uma "massa saliente no peito, fria, dura, densa como uma fruta e espalhando-se debaixo da pele" [1].

A definição contemporânea do câncer, frequentemente simplificada como uma doença que abrange mais de 100 tipos diferentes de malignidades e caracterizada pelo crescimento desordenado das células, é útil em sua generalidade, mas não captura toda a complexidade dos mecanismos biológicos e moleculares que sustentam a carcinogênese [2].

Os marcos do câncer (*hallmarks of cancer*), inicialmente propostos por Hanahan e Weinberg em 2000 [3], representaram um avanço conceitual na compreensão da carcinogênese, ao organizar as principais capacidades biológicas adquiridas pelas células tumorais. Esse modelo descreve como células normais evoluem progressivamente para um fenótipo maligno por meio da aquisição de características funcionais que sustentam o crescimento tumoral, a sobrevivência e a disseminação metastática. Desde então, com base em evidências experimentais e observações clínicas acumuladas ao longo das últimas décadas, esse arcabouço conceitual foi ampliado e refinado, incorporando novos mecanismos que refletem a complexidade dinâmica do câncer, conforme ilustrado na Figura 1 [3–5].

Entre essas capacidades fundamentais destacam-se a manutenção de sinais proliferativos contínuos, a evasão de supressores de crescimento, a resistência à morte celular programada e a aquisição de imortalidade replicativa [3–5]. Paralelamente, as células tumorais desenvolvem a habilidade de induzir ou explorar a angiogênese, reprogramar o metabolismo celular e ativar processos de invasão e metástase, permitindo sua expansão para tecidos distantes [3–5]. Mais recentemente, aspectos adicionais

passaram a ser reconhecidos como componentes centrais da progressão tumoral, incluindo a instabilidade genômica, a reprogramação epigenética não mutacional, a inflamação promotora de tumor, a influência de microbiomas polimórficos e a capacidade de escapar da vigilância do sistema imune [3–5].

Adicionalmente, conceitos emergentes, como a plasticidade fenotípica e a presença de células senescentes no microambiente tumoral, reforçam a noção de que o câncer não é apenas uma doença genética, mas um sistema adaptativo complexo, fortemente influenciado por interações celulares, ambientais e imunológicas [3–5]. Esse conjunto de características explica, em grande parte, a elevada heterogeneidade tumoral, a resistência a terapias convencionais e a recorrência da doença, tornando o câncer um desafio terapêutico persistente ao longo da história da medicina [3–5].

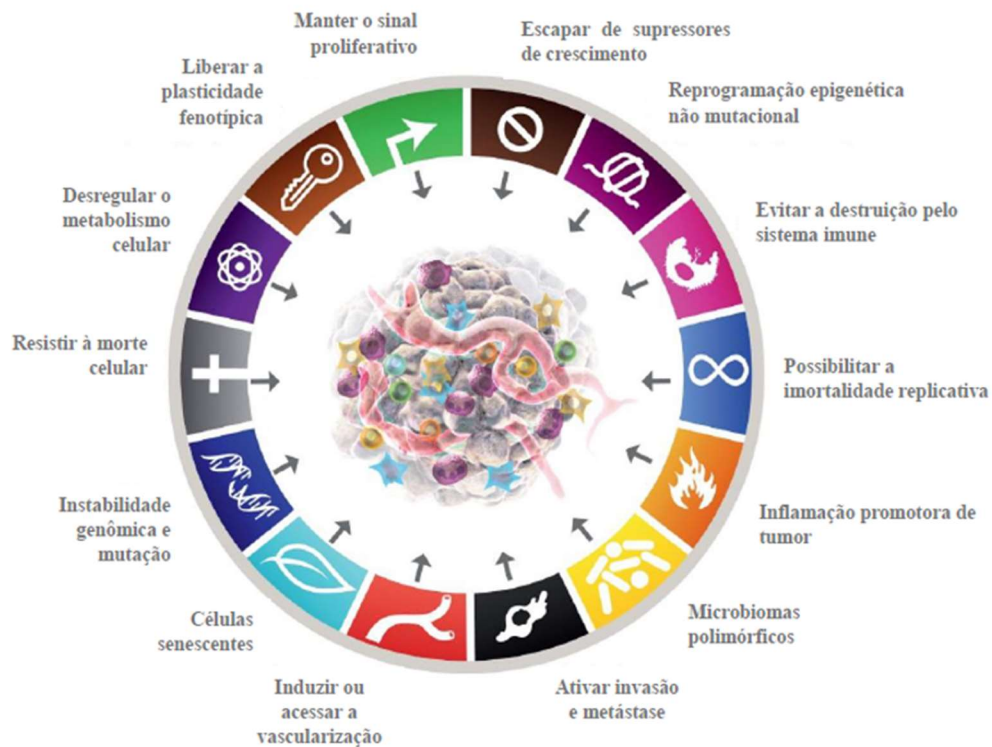


Figura 1: Marcos do Câncer — novas adições. Adaptado de Hanahan 2022 [5].

Apesar dos consideráveis avanços na compreensão da biologia do câncer, essa doença continua sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. As opções de tratamento convencionais incluem quimioterapia, excisão cirúrgica, radioterapia e imunoterapia, cada uma apresentando benefícios, mas também limitações importantes [6].

No caso do câncer de pele do tipo melanoma, por exemplo, a quimioterapia tradicional tem sido amplamente empregada; entretanto, sua eficácia é restrita pela baixa especificidade tumoral, resultando em efeitos colaterais significativos e respostas terapêuticas insatisfatórias [7,8]. A excisão cirúrgica é frequentemente utilizada como primeira linha de tratamento para melanomas primários e pode ser curativa em estágios iniciais [7,8]. No entanto, sua efetividade diminui drasticamente em casos metastáticos. Já a radioterapia, embora útil no controle local do tumor, acarreta danos aos tecidos saudáveis circundantes e não oferece solução definitiva para melanomas disseminados [7,8].

De maneira semelhante, o câncer de pâncreas, em especial o adenocarcinoma ductal pancreático (*PDAC*, do inglês *Pancreatic ductal adenocarcinoma*), representa um dos maiores desafios oncológicos da atualidade [9]. Trata-se de uma neoplasia extremamente agressiva e refratária aos tratamentos convencionais. Até o momento, não existe uma terapia realmente eficaz estabelecida para esta doença. A cirurgia, quando viável, permanece como a principal opção curativa; contudo, apenas uma pequena fração dos pacientes é diagnosticada em estágio ressecável [9].

A quimioterapia convencional para o câncer pancreático baseia-se principalmente no uso de gemcitabina, um fármaco que atua impedindo a multiplicação das células tumorais ao bloquear a formação do *DNA*, processo essencial para a divisão celular. Em casos mais avançados, são empregados esquemas combinados mais intensivos, como o *FOLFIRINOX*, que associa 5-fluorouracil, leucovorina, irinotecano e oxaliplatina [9].

O 5-fluorouracil (5-FU) interfere na produção do *DNA* das células cancerígenas, dificultando sua divisão e crescimento [10]. A leucovorina não possui ação anticâncer direta, mas é utilizada para potencializar e prolongar o efeito do 5-FU [10]. O irinotecano bloqueia uma enzima necessária para o correto desenrolamento do *DNA* durante a divisão celular, levando a erros na replicação e à morte das células tumorais [9].

Já a oxaliplatina, um composto à base de platina, liga-se ao *DNA* e provoca lesões químicas que impedem sua leitura adequada, comprometendo a sobrevivência celular [11]. Embora essa combinação terapêutica aumente a eficácia do tratamento ao atacar o tumor por diferentes vias simultaneamente, ela também afeta células saudáveis, sendo frequentemente associada a elevada toxicidade sistêmica, o que limita as doses administráveis e impacta significativamente a qualidade de vida dos pacientes [9].

A radioterapia pode ser utilizada como adjuvante ou paliativa, porém sua eficácia é limitada [12]. Mais recentemente, abordagens de imunoterapia, incluindo inibidores de

checkpoint imunológico tem sido usada [13,14]. Os checkpoints imunológicos consistem em mecanismos regulatórios essenciais para o controle da resposta imune e prevenindo processos autoimunes [13,14]. Em condições fisiológicas, esses sistemas asseguram que a resposta imune seja direcionada contra agentes patogênicos ou células anormais, sem causar danos aos tecidos saudáveis. No entanto, células tumorais exploram esses mesmos mecanismos ao expressar ligantes inibitórios que suprimem a atividade do sistema imune, promovendo evasão da vigilância imunológica [13,14].

Nesse contexto, os inibidores de checkpoint imunológico surgem como uma estratégia terapêutica promissora, ao bloquearem essas vias regulatórias e restaurarem a resposta imune antitumoral [13,14]. Apesar disso, no adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), a eficácia dessa abordagem é limitada pelo microambiente tumoral altamente desmoplásico, caracterizado por uma matriz extracelular densa e imunossupressora, que restringe a penetração de fármacos e a ativação efetiva da resposta imune [13,14].

No entanto, o microambiente tumoral altamente desmoplásico do *PDAC*, caracterizado por uma matriz extracelular densa, rica em componentes fibróticos e fibroblastos associados ao câncer, atua como uma barreira física e imunológica, restringindo a penetração de fármacos e a ativação efetiva da resposta imune [13,14].

Nesse cenário, a Terapia Fotodinâmica (*PDT*, do inglês *Photodynamic Therapy*) emerge como uma estratégia promissora na oncologia, representando uma abordagem inovadora para o tratamento de diversas neoplasias. A *PDT* baseia-se na ativação de um fotossensibilizador por luz, levando à geração de espécies reativas de oxigênio, os quais desencadeiam respostas biológicas e bioquímicas responsáveis pelo efeito terapêutico que irá culminar na morte celular do alvo biológico [15,16].

Estudos recentes destacam que a *PDT* é eficaz em casos de câncer de pulmão, cabeça e pescoço, câncer de pele não melanoma, câncer de próstata e câncer de mama [17]. Em particular, no câncer de pulmão, o uso de fotossensibilizadores (do inglês, *photosensitizers -FSs*) como porfímero de sódio e clorina e6 tem mostrado resultados promissores tanto em estudos pré-clínicos quanto em ensaios clínicos [17]. A *PDT* também tem sido eficaz como tratamento adjuvante em cânceres de cabeça e pescoço, e em estágios iniciais de câncer de laringe e recidivas de carcinoma [17].

Além da oncologia, a *PDT* possui aplicações não oncológicas em diferentes áreas médicas, como dermatologia (acne, psoríase, fotoenvelhecimento, alopecia), oftalmologia, cardiologia (aterosclerose, varizes esofágicas), odontologia, neurologia (Alzheimer), reumatologia (artrite reumatoide) e gastroenterologia [18]. Uma extensão

da *PDT* é a inativação fotodinâmica de microrganismos (*PDI*, do inglês *Photodynamic Inactivation*), para eliminar vírus, bactérias, fungos e leveduras. A *PDI* é considerada uma alternativa promissora aos antibióticos e antivirais, já que não induz resistência [18].

Apesar de ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de tumores, é importante destacar que a *PDT*, tal como qualquer outra abordagem, sozinha pode não ser capaz de resolver o problema do câncer. No entanto, a *PDT* pode também ser empregada como tratamento adjuvante em alguns tipos de câncer. Quando utilizada em conjunto com outros tratamentos, a *PDT* pode reduzir o risco de recorrência e eliminar células cancerígenas remanescentes, melhorando assim os resultados a longo prazo dos pacientes [19].

A *PDT* como abordagem anticâncer foi aprovada em 1995 pela *Food and Drug Administration (FDA)* [20]. No ano de 2023, no Brasil, ela recebeu aprovação do Comitê de Avaliação de Tecnologias em Saúde (Conitec) para ser incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS) pelo Ministério da Saúde [21]. Essa incorporação oferece uma nova opção de tratamento para pacientes com câncer de pele do tipo basocelular superficial e nodular, o tipo mais comum no país. Destaca-se que essa é a primeira vez que uma tecnologia é incorporada no SUS a partir de uma iniciativa de uma universidade pública, neste caso, a Universidade de São Paulo (USP), representando um notável caso de sucesso na inovação tecnológica nacional.

A escolha do fotossensibilizador (FS) é essencial para o sucesso da *PDT*. Entre os diversos agentes fotossensibilizadores estudados para *PDT*, as porfirinas e seus derivados têm se destacado devido às suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas favoráveis. Esses macrociclos aromáticos exibem forte absorção na região do visível, geração eficiente de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, e afinidade preferencial por tecidos tumorais. A versatilidade estrutural das porfirinas permite modificações químicas que potencializam sua solubilidade, seletividade e eficiência fotodinâmica, tornando-as candidatas promissoras para aplicação clínica em diferentes tipos de câncer [22].

Complexos metálicos de porfirina, especialmente aqueles contendo íons metálicos com propriedades catalíticas ou habilidades específicas de coordenação, têm sido foco de intensa pesquisa [23,24]. Nesse contexto, porfirinas complexadas com paládio (Pd^{2+}) e grupos periféricos contendo ligantes fosfínicos têm despertado interesse crescente na *PDT*. A introdução do íon Pd(II) na estrutura porfirínica induz alterações nas propriedades eletrônicas e fotofísicas do composto [25–27]. Além disso, o paládio apresenta

semelhança química com a platina, amplamente conhecida por sua atividade antitumoral em compostos como a cisplatina [28,29]. Essa analogia contribui para a possível ação citotóxica independente de irradiação, possibilitando uma combinação com ação fotodinâmica.

Adicionalmente, o paládio exibe propriedades eletrocatalíticas relevantes, capazes de converter peróxido de hidrogênio, um metabólito abundantemente produzido no microambiente tumoral, em água e oxigênio [30]. Essa conversão contribui diretamente para a mitigação da hipóxia tumoral, condição que frequentemente limita a eficácia da *PDT*. A presença de ligantes fosfínicos nos grupos periféricos da porfirina pode melhorar a solubilidade em meio aquoso e promover um perfil de direcionamento molecular mais favorável [27].

Há alguns anos, nosso grupo de pesquisa sintetizou uma série de fotossensibilizadores à base de metaloporfirinas – porfirinas *meso*-tetrapiridil coordenadas com paládio(II)/difenílfosfinas – que demonstraram atividade anticâncer intrínseca na ausência de luz [27], bem como propriedades de inativação fotodinâmica contra cepas bacterianas multirresistentes isoladas de casos de mastite bovina [31]. No presente estudo, avaliamos o potencial fotodinâmico desses compostos, em modelos bidimensionais (2D) de câncer de pele (melanoma) e tridimensionais (3D) (homogêneos e heterogêneos) de câncer pancreático. Em conjunto, os resultados destacam a versatilidade terapêutica dessas metaloporfirinas e reforçam seu potencial como candidatas ao desenvolvimento de estratégias inovadoras de tratamento direcionadas ao câncer.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o potencial fotodinâmico de complexos de paládio(II) coordenados à *meso*-tetra(4-piridil)porfirina (TPyP) em modelos tumorais *in vitro*.

Objetivos Específicos

- ✓ Estudar as propriedades fotofísicas dos complexos de paládio(II) coordenados à TPyP, com ênfase no rendimento do estado tripleto e oxigênio singleto.
- ✓ Determinar a viabilidade celular das linhagens de melanoma (A375 e B16-F10) e pele normal (Hacat) em modelo 2D frente aos compostos precursores e complexos porfirínicos. na ausência de luz com e após o tratamento com *PDT* com os complexos porfirínicos;
- ✓ Avaliar as células de A375 tratadas com os compostos quanto à morfologia celular, capacidade de migração, sobrevivência clonogênica e produção de *ROS*, na ausência e presença de luz;
- ✓ Investigar a interação dos compostos com a proteína albumina de soro bovino, a fim de compreender seus mecanismos de transporte e biodisponibilidade;
- ✓ Determinar a viabilidade celular das linhagens de câncer de pâncreas em modelos 3D homogêneos e heterogêneos tratados com os complexos na ausência e presença de luz;
- ✓ Analisar nas células de câncer de pâncreas a produção de *ROS*, danos a organelas subcelulares, capacidade de internalização celular e exposição de calreticulina, marcador associado à morte celular imunogênica após tratamento com *PDT*.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

2.1 Uma breve história da PDT

As civilizações antigas foram as primeiras a descobrir que a luz era um dos três componentes essenciais para fototerapia. No Egito Antigo, por volta de 3000 a.C., a luz solar era utilizada para tratar doenças de pele como o vitiligo. Durante séculos, acreditava-se que a luz solar por si só era o único agente terapêutico, mas no final do século XIX, essa visão começou a mudar com a descoberta de outro componente importante: o fotossensibilizador [32,33]

Entre 1897 e 1898, o estudante *Oscar Raab*, enquanto trabalhava no laboratório do Professor *Hermann von Tappeiner*, observou que o corante acridina era muito mais tóxico para paramécios quando exposto à luz, em comparação com sua toxicidade em condições normais. A partir dessa observação, surgiu a ideia de que um corante, ao ser ativado pela luz, poderia funcionar como um fotossensibilizador, um agente fundamental para a *PDT* [32,33].

No entanto, a descoberta de uma substância que desempenharia um papel crucial na *PDT* ocorreu em 1841, quando *Scherer* produziu pela primeira vez a hematoporfirina (HP), ao separar o ferro do sangue seco usando ácido sulfúrico. Em 1867, *Thudichum* observou pela primeira vez a fluorescência desse composto, e em 1871, *Hoppe-Seyler* deu-lhe o nome de HP. No início do século XX, entre 1908 e 1913, começaram os estudos sobre as propriedades fotodinâmicas da HP, que foram testadas em paramécios, eritrócitos, camundongos e até em humanos, após exposição à luz solar [32,33]

O conceito de "Ação Fotodinâmica" foi formalizado pelo Professor *Hermann von Tappeiner* em 1904, para descrever os efeitos terapêuticos da combinação de luz com substâncias químicas. Entre 1903 e 1905, von *Tappeiner* e sua equipe investigaram a eficácia da *PDT* no tratamento de tumores e doenças de pele, como o lúpus cutâneo, utilizando corantes como eosina e fluoresceína. Durante esses estudos, eles fizeram uma descoberta fundamental: além da luz e do fotossensibilizador, o oxigênio também era necessário para que a *PDT* ocorresse. Essa revelação completou o trio de componentes essenciais para o sucesso da terapia [32,33]

Em 1942, *Auler e Banzer* demonstraram que a HP se acumulava seletivamente em tumores. Eles injetaram HP em ratos com tumores e, ao expô-los à luz, observaram efeitos terapêuticos significativos. Na década de 1960, Schwartz aprimorou a HP, separando-a em derivados chamados derivados da hematoporfirina (*hematoporphyrin derivatives* –

HpD), que se mostraram ainda mais eficazes e seletivos para a destruição tumoral [32,33].

A era moderna da Terapia Fotodinâmica teve início na década de 1970, com o trabalho inovador de Thomas Dougherty e seus colaboradores no *Roswell Park Memorial Cancer Institute*, em Buffalo. Dougherty foi responsável por purificar os *HpD*, removendo os monômeros e aumentando a eficácia da *PDT*. Além disso, ele introduziu o uso de lasers em vez de lâmpadas de arco, permitindo um controle mais preciso da luz e o uso de fibras ópticas flexíveis, o que facilitou o tratamento de áreas de difícil acesso e tornou o procedimento menos invasivo. Em 1978, Dougherty utilizou com sucesso o *HpD* para tratar cânceres cutâneos e subcutâneos. A partir desse momento, a *PDT* começou a ser amplamente aplicada no tratamento de diversos tipos de câncer, além de doenças dermatológicas e oftalmológicas [32,33].

A partir do sucesso inicial com *HpD/Photofrin*, a *PDT* consolidou-se clinicamente nas décadas de 1980–1990, com avanços decisivos em padronização de protocolos, dosimetria e dispositivos de entrega de luz [34]. Nos anos 2000, ocorreu uma transição relevante do uso predominante de FS de “primeira geração” para FS mais seletivos e protocolos mais adaptados ao tecido-alvo. Em dermatologia, a introdução e consolidação da *PDT* baseada em precursores de porfirina, especialmente o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e seus derivados, ampliou o uso para lesões superficiais com excelente resultado cosmético [34].

Em paralelo, a *PDT* expandiu-se também para a oftalmologia, com a aprovação do verteporfina (*Visudyne*) pelo *FDA* em 12 de abril de 2000 para degeneração macular relacionada à idade em casos selecionados [35]. Ainda nesse período, fotossensibilizadores de “segunda geração” com melhor absorção no vermelho, maior eficiência fotodinâmica e perfis farmacocinéticos mais favoráveis ganharam espaço; por exemplo, o temoporfin (*Foscan*) recebeu autorização europeia em 24 de outubro de 2001 para tratamento paliativo de carcinoma espinocelular avançado de cabeça e pescoço.

De 2010 em diante, as evoluções mais impactantes passaram a incluir: (i) novos FS e estratégias de direcionamento, (ii) plataformas nanoestruturadas, (iii) otimização de fontes de luz e (iv) combinações racionais com terapias consagradas [36]. Revisões recentes apontam que a nanotecnologia tem permitido aumentar a seletividade tumoral, melhorar solubilidade/estabilidade do FS e reduzir fototoxicidade sistêmica, acelerando a translação de formulações “nanoassistidas” e FS de “terceira geração” [36].

Em paralelo, a última década consolidou a *PDT* como uma estratégia com elevado potencial adjuvante no tratamento do câncer, principalmente por sua capacidade de induzir dano tumoral localizado e de modular o microambiente tumoral. Nesse contexto, tem ganhado destaque sua associação com a imunoterapia, em especial com bloqueadores de *checkpoint* imunológico, como os anticorpos anti-proteína 1 de morte celular programada (*Programmed Cell Death Protein 1, PD-1*), anti-ligante 1 da morte celular programada (*Programmed Death-Ligand 1, PD-L1*) e anti-antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4, CTLA-4*) [37].

As células cancerígenas exploram essas vias principalmente por meio da superexpressão de *PD-L1* em sua superfície, o qual se liga ao receptor *PD-1* expresso nos linfócitos T, desencadeando sinais inibitórios que suprimem a proliferação celular, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a atividade citotóxica desses linfócitos. De forma complementar, a ativação da via *CTLA-4* reduz a coestimulação necessária para a ativação plena das células T [37].

O bloqueio terapêutico desses checkpoints impede essa sinalização inibitória, restaurando a função efetora dos linfócitos T e a vigilância imunológica antitumoral. Quando combinada à *PDT*, essa estratégia evita que a resposta imune induzida pela morte celular imunogênica, associada à liberação de sinais de perigo e ao aumento da apresentação antigênica, seja neutralizada por mecanismos de evasão tumoral, favorecendo a infiltração e ativação de linfócitos T no tecido tumoral [37].

Adicionalmente, combinações com radioterapia (RT) têm sido exploradas para contornar limitações de penetração de luz e potencializar respostas em tumores mais profundos, com evidências clínicas/traslacionais do eixo RT+*PDT* [38]. Por fim, estratégias integrando a *PDT* a cirurgia (ex.: controle de margens e redução de recorrência local) e a quimioterapia/terapias alvo, frequentemente mediadas por sistemas de entrega e protocolos de combinação, compõem o panorama moderno da *PDT* como terapia localizada e modular, com impacto crescente [39].

2.2 Princípios fundamentais da Terapia Fotodinâmica

A *PDT* baseia-se na combinação da luz, um composto fotossensibilizador e oxigênio molecular. O procedimento começa com a administração do fotossensibilizador, uma substância sensível à luz. Em seguida, a área a ser tratada é exposta a uma luz de

comprimento de onda específico que seja absorvido pelo fotossensibilizador identificado meio do seu espectro de absorção UV-Vis[15,16].

2.2.1 Processos fotofísicos e fotoquímicos

Inicialmente, a molécula fotossensibilizadora possui elétrons emparelhados, caracterizando um *spin* total de $S = 0$ e uma multiplicidade de *spin* (M) igual a 1, conhecida como estado singleto (Equação 1) [15,16].

$$M = 2S + 1 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

S é a soma vetorial dos spins dos elétrons presentes na molécula. Os elétrons têm um spin intrínseco, que pode ser $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$. Quando os elétrons estão emparelhados, um tem *spin* $+\frac{1}{2}$ e o outro $-\frac{1}{2}$, resultando em um spin total de zero ($S=0$), resultando em multiplicidade igual a 1.

De acordo com o modelo de níveis de energia proposto pelo físico polonês Aleksander Jabłoński (1933), ilustrado na figura 2, após a absorção de um fóton, um elétron sofre transição do estado fundamental (S_0) para um estado de maior energia. A transição do elétron para um estado singleto excitado S_x (com $x=1,2, 3, \dots$, em ordem crescente de energia) depende da quantidade de energia absorvida do fóton incidente. Além disso, cada estado eletrônico é subdividido em níveis vibracionais de energia crescente, que são indicados por linhas mais finas [15,16].

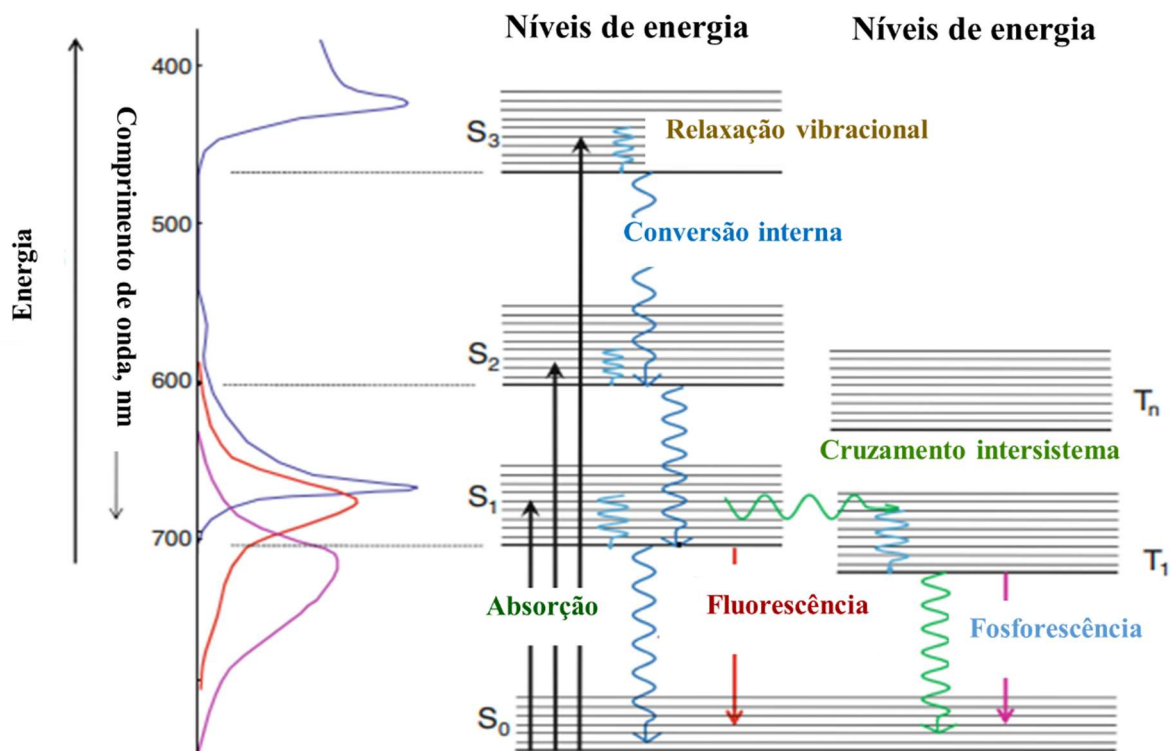


Figura 2: Diagrama de Jablonski representando os processos de absorção de energia, relaxação vibracional, fluorescência, fosforescência e conversão intersistêmica entre os estados excitados singlete e tripleto de uma molécula. Na esquerda da figura, temos a representação espectros de absorção (linha azul), fluorescência (linha vermelha) e fosforescência (linha roxa). Adaptado de Abdel (2014) [17].

Os estados excitados são energeticamente menos estáveis que o estado fundamental, portanto, os elétrons tendem a perder o excesso de energia e retornar para os estados de menor energia após um breve intervalo de tempo por diversos mecanismos, conforme representado na tabela 1:

- i. Em um estado eletrônico qualquer, singlete ou tripleto (S_i ou T_j), o elétron em um nível vibracional de maior energia relaxa para o estado vibracional de menor energia, convertendo a energia absorvida em forma de calor. Esse processo é chamado de *relaxação vibracional (RV)*.
- ii. Quando a transição ocorre entre diferentes níveis eletrônicos de mesmo spin ($S_i \rightarrow S_{i-1}$ ou $T_j \rightarrow T_{j-1}$), sem a emissão de radiação, ela é denominada conversão interna (CI), onde a energia também é convertida em calor.

- iii. Por outro lado, o elétron em um estado excitado pode relaxar para um estado de menor energia ($S_1 \rightarrow S_0$), emitindo fótons, processo denominado de *fluorescência*. De acordo com a Regra de Kasha, a fluorescência sempre começa do nível vibracional mais baixo de S_1 , com apenas algumas raras exceções. Conseqüentemente, forma geral do espectro de emissão não depende do comprimento de onda da luz usada para a excitação.
- iv. Outro processo fotofísico que pode ocorrer é o *cruzamento intersistemas* (CIS). No CIS, um elétron em um estado singleto excitado realiza uma transição não radiativa para um estado tripleto. O CIS envolve uma mudança na multiplicidade de spin, o que significa que o spin do elétron deve inverter para que ele passe de um estado singleto (onde os spins dos elétrons são antiparalelos) para um estado tripleto (onde dois elétrons têm spins paralelos). A maioria dos fotossensibilizadores tem alta eficiência quântica para essa transição.
- v. Após o cruzamento intersistema ($S_x \rightarrow T_x$) o elétron também pode relaxar para o estado fundamental por meio de um novo processo de CIS seguido pela rápida *relaxação vibracional* ou ainda por meio da emissão de luz, denominada de *fosforescência*. Vale mencionar que em uma solução à temperatura ambiente a fosforescência é desprezível.

Tabela 1: Reações fotofísicas e seus respectivos tempos característicos. Adaptado de Plaetzer et al, (2009).

Processo	Reação	Tempo (s)
Absorção	$h\nu + S_0 \rightarrow S_1, S_2, \dots, S_x$	$\sim 10^{-15} - 10^{-12}$
Conversão interna	$S_x, \dots, S_2 \rightarrow S_1 + \text{calor}$	$\sim 10^{-13} - 10^{-10}$
Conversão interna	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$	$\sim 10^{-13}$
Fluorescência	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{Fluor}}$	$\sim 10^{-11} - 10^{-8}$
Cruzamento intersistema	$S_1 \rightarrow T_1 + \text{calor}$	$\sim 10^{-7}$
Cruzamento intersistema	$T_1 \rightarrow S_0 + \text{calor}$	$\sim 10^{-2} - 10^2$
Fosforescência	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{Fosfor}}$	$> 10^{-6}$

As moléculas no estado tripleto, devido a seu maior tempo de vida, ver tabela 1, têm a capacidade de desencadear alterações químicas em moléculas vizinhas por meio de duas vias principais, conhecidas como reações fotodinâmicas do tipo I e tipo II.

Na reação fotodinâmica do tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage com substratos biológicos por meio de reações de transferência de elétrons ou de hidrogênio, levando à formação de espécies de radicais, como ânions ou cátions radicais. Esses intermediários reativos podem reagir subsequentemente com o oxigênio molecular, resultando na geração de diferentes espécies reativas de oxigênio (*ROS*, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), incluindo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$). O ânion superóxido pode sofrer reações, formando peróxido de hidrogênio, o qual, devido à sua elevada capacidade de difusão através de membranas biológicas, pode atuar como precursor da formação de radicais hidroxila altamente reativos, responsáveis por danos extensivos a biomoléculas, como lipídios, proteínas e *DNA* [15,16].

Na reação fotodinâmica tipo II, ocorre a transferência de energia para o oxigênio molecular, excitando-o do estado tripleto para o estado singleto. No estado fundamental, o oxigênio molecular possui dois elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons que estão em orbitais separados e têm spins paralelos (ambos com o mesmo sentido). Esses orbitais têm a mesma energia (são orbitais degenerados), resultando em uma multiplicidade de spin tripleto. Por outro lado, o oxigênio singleto possui uma energia de aproximadamente 94,5 kJ/mol acima do estado fundamental, o que corresponde a um comprimento de onda de cerca de 1270 nm. O oxigênio singleto é altamente reativo devido à sua configuração eletrônica e pode reagir rapidamente com biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos celulares [15,16].

O oxigênio singleto tem um tempo de vida curta ($< 0,04 \mu s$) e um raio de difusão restrito (cerca de $0,02 \mu m$). Como resultado, o dano tecidual é extremamente localizado nas vizinhanças das células-alvo, com mínimo impacto no tecido circundante. Outro ponto positivo dessa reação é a capacidade do oxigênio singleto de interagir de forma inespecífica com qualquer macromolécula dentro de uma célula, o que dificulta o desenvolvimento de resistência às fotossensibilizações. Consequentemente, não há risco de toxicidade cumulativa nos tecidos, permitindo que a *PDT* possa ser readministrada várias vezes [15,16].

Estas reações tipo I e tipo II acontecem de forma simultânea, sendo a proporção entre elas influenciada por diversos parâmetros, com o tipo de fotossensibilizador empregado

e a concentração de oxigênio desempenhando papéis cruciais. Em muitos casos, especialmente com os fotossensibilizadores mais comuns utilizados na *PDT*, a reação tipo II predomina na maioria das situações [15,16,32].

2.3 Fotossensibilizadores em *PDT*

Os fotossensibilizadores desempenham um papel fundamental *PDT*, sendo projetados para atender a algumas características essenciais no uso clínico. Entre as propriedades desejáveis estão a baixa toxicidade no escuro, a seletividade para células tumorais, a rápida eliminação do organismo e uma alta eficiência na geração de *ROS* após a ativação pela luz [17,40]. Para o tratamento de tumores mais profundos, a eficácia de um fotossensibilizador também depende de sua capacidade de absorver luz em comprimentos de onda dentro da janela terapêutica ($\approx 600\text{--}800\text{ nm}$), o que permite maior penetração da luz nos tecidos biológicos.

Embora a *PDT* não seja aplicável a todos os tipos de câncer, o desenvolvimento de uma ampla variedade de fotossensibilizadores permite a adaptação dessa abordagem a diferentes contextos tumorais, possibilitando a seleção do fotossensibilizador mais adequado de acordo com o tipo de tumor, sua localização e as características do tecido alvo.

As principais classes estruturais de *FSs* incluem porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas ilustrados na figura 3 [17,40].

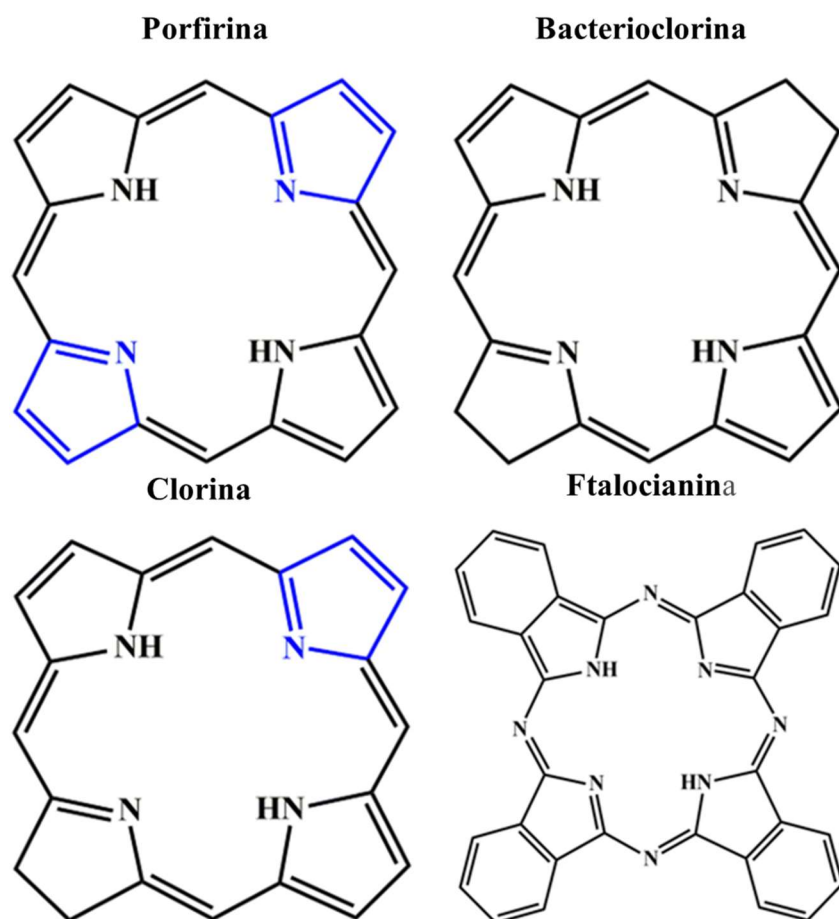


Figura 3: Estrutura básica dos FSs: Porphirina, bacterioclorina, clorina e ftalocianina. Adaptado de Baskaran, R., Lee, J., & Yang, S. G. (2018)[40].

Ao longo dos anos, os FSs evoluíram em diferentes gerações, com cada nova fase trazendo melhorias em termos de seletividade, eficiência fotodinâmica e segurança no tratamento [17,32,40]

Primeira Geração

Os FSs de primeira geração foram os primeiros a serem utilizados clinicamente na PDT. O principal exemplo é o *Photofrin* (Porfímero sódico), aprovado em 1995 para o tratamento de cânceres obstrutivos, como no esôfago, pulmão e bexiga [17,40]. Apesar de representar um grande avanço no tratamento de cânceres, o *Photofrin* apresenta algumas limitações:

- Acúmulo em tecidos normais, resultando em toxicidade fotossensível prolongada.

- Absorção em comprimentos de onda fora da janela terapêutica, o que limita a penetração da luz em tecidos mais profundos.

Segunda Geração

Os *FSs* de segunda geração foram desenvolvidos para resolver as limitações de seletividade e fototoxicidade da primeira geração. Estes fotossensibilizadores são mais puros, absorvem luz em comprimentos de onda dentro da janela terapêutica e são eliminados mais rapidamente do corpo, reduzindo o risco de fotossensibilidade prolongada. Entre os *FSs* de segunda geração, destacam-se [17,40]:

- ✓ *Foscan* (Temoporfin): Usado no tratamento de câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama e câncer de pâncreas. Foscan é clinicamente aprovado e demonstrou resultados promissores em ensaios clínicos, especialmente em pacientes com câncer de próstata.
- ✓ *Lutex* (Motexafin lutécio): Utilizado para câncer de próstata e pulmão, atualmente em ensaios clínicos.
- ✓ *Tookad* (Bacteriofeoforbida de paládio): Utilizado em ensaios clínicos de fase II e III para câncer de próstata. *Tookad* tem rápida eliminação do organismo e alta seletividade para os vasos sanguíneos tumorais.
- ✓ *Visudyne* (Verteporfina): Usado amplamente no tratamento de doenças oculares, como a degeneração macular relacionada à idade, além de ser eficaz em tratamentos de câncer pancreático.
- ✓ *Purlytin* (Estanho etil etiopurpurina): Atualmente em ensaios clínicos de fase II/III, mostrou eficácia no tratamento de câncer de mama e sarcoma.

Terceira Geração

Os *FSs* de terceira geração estão em desenvolvimento e buscam superar ainda mais as limitações das gerações anteriores, como a baixa solubilidade em água e a falta de seletividade tumoral. Esses fotossensibilizadores estão sendo projetados para serem conjugados a anticorpos, lipossomas ou nanopartículas, o que permite um direcionamento mais preciso às células tumorais, melhorando a eficácia do tratamento e minimizando os efeitos colaterais [17,40].

2.3.1 Porfirinas e o efeito do Átomo Pesado

As porfirinas constituem uma classe de macrociclos aromáticos caracterizados por quatro unidades pirrólicas, formando uma estrutura plana conhecida como anel porfirínico. Na estrutura básica da porfina, os carbonos do macrociclo são numerados de 1 a 20, enquanto os quatro nitrogênios internos ocupam as posições 21–24 (Figura 4a). Os nitrogênios nas posições 21 e 23 estão protonados e se projetam para o interior do anel. Além disso, diversos substituintes podem ser introduzidos nas posições β e *meso* (Figura 4b), embora esses grupos estejam ausentes na estrutura mais simples da porfina [41]

Na natureza, as porfirinas aparecem em sistemas biológicos fundamentais: nas clorofilas, são responsáveis tanto pela captura de energia luminosa quanto pela participação direta nas reações fotoquímicas primárias da fotossíntese, atuando como antenas moleculares e centros de separação de carga; já nos grupos hemes, presentes na hemoglobina, mioglobina e diversas enzimas, desempenham papéis cruciais no transporte e armazenamento de oxigênio, bem como em processos catalíticos de oxirredução. A relevância biológica dessas moléculas é tamanha que sua presença pode ser considerada indispensável para a manutenção da vida na Terra [42].

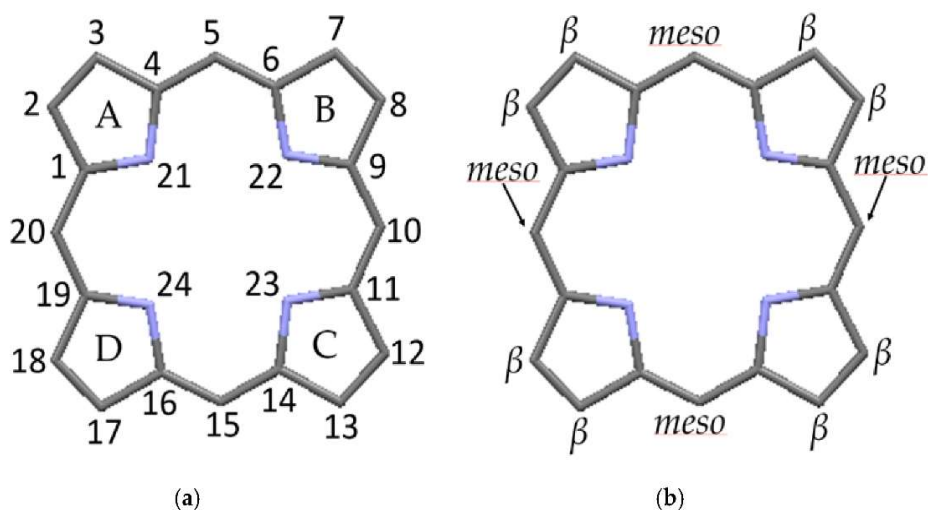


Figura 4: Nomenclatura das posições atômicas do macrociclo: designação numérica e designação do sítio Fonte [41].

Do ponto de vista espectroscópico, as porfirinas apresentam regiões características de absorção no espectro eletrônico. A mais intensa é a banda de *Soret*,

localizada entre 400 e 500 nm (Figura 5), atribuída a transições eletrônicas do estado fundamental (S_0) para o segundo estado excitado (S_2). Já as bandas Q, menos intensas e situadas entre 500 e 650 nm (Figura4), resultam de transições do S_0 para o primeiro estado excitado (S_1) [41].

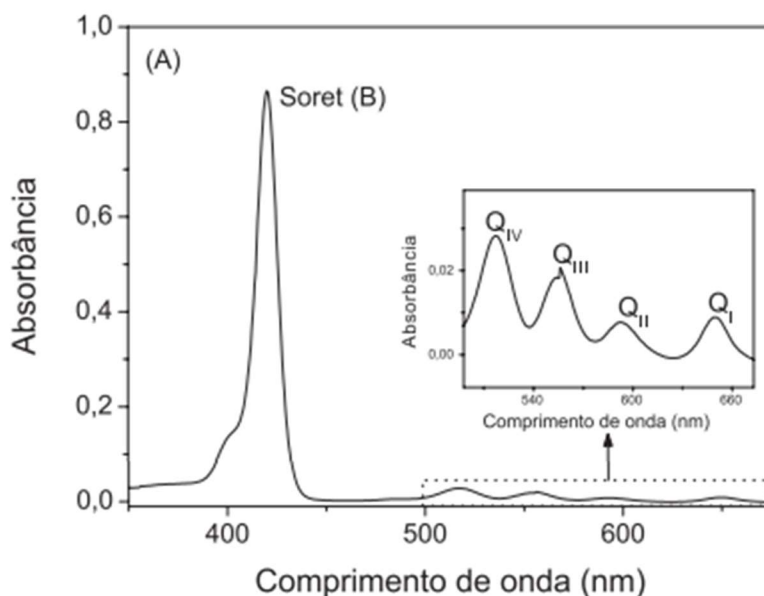


Figura 5: Espectro de absorção UV-Vis porfirínico, evidenciando a banda intensa de Soret (B) e as bandas Q [43]

Um aspecto estrutural fundamental das porfirinas é a presença de quatro átomos de nitrogênio no núcleo do anel, capazes de coordenar diferentes íons metálicos e originar as chamadas metaloporfirinas (Figura 4). A metalização pode ocorrer de duas maneiras principais: no centro do anel macrocíclico, por coordenação direta aos nitrogênios pirrólicos, ou em posições periféricas, associando-se a grupos funcionais ligados ao macrociclo [41].

No primeiro caso, em que o metal ocupa o núcleo da porfirina (ex.: Zn^{2+} , Pd^{2+} , Ru^{2+}), há alterações profundas nas propriedades eletrônicas e espectroscópicas. Isso inclui mudanças no número e na intensidade das bandas Q, bem como em parâmetros fotofísicos críticos, como o tempo de vida do estado tripleto e o rendimento de oxigênio singleto (1O_2). [41].

Na metalização periférica, por sua vez, o íon metálico coordena-se a grupos funcionais como ligantes fosfínicos, cadeias alquilas ou halogênios. Essa modificação altera propriedades fundamentais - como solubilidade, lipofilicidade e interação com biomoléculas - influenciando diretamente a biodistribuição e a eficiência de

internalização celular, o que pode trazer propriedades adicionais anticancerígenas intrínsecas [41].

A presença de metais pode reforçar o chamado efeito do átomo pesado, intensificando o acoplamento spin-órbita. O acoplamento spin-órbita decorre da interação entre o movimento orbital dos elétrons e o seu spin intrínseco, sendo mais pronunciado em metais pesados. Esse fenômeno facilita o cruzamento intersistemas, processo responsável pela conversão eficiente do estado singleto excitado (S_1) para o estado tripleto (T_1), uma importante etapa no ciclo fotofísico que leva à formação de oxigênio singleto, um dos principais responsáveis pelo processo fotodinâmico [44].

Por exemplo, Khisa et al. (2021) [45] avaliaram as propriedades espectroscópicas e fotofísicas da porfirina base livre H_2TPyP e do complexo metalado $InClTPyP$. Os resultados mostraram que a H_2TPyP apresenta uma banda de Soret intensa em 431 nm acompanhada de quatro bandas Q características. Após a inserção do íon índio, o espectro sofreu modificações significativas, com a redução do número de bandas Q observadas e um leve deslocamento em seus comprimentos de onda. No estudo de fluorescência, também foi evidenciada uma redução drástica no rendimento quântico: de 0,131 para a base livre para apenas 0,017 no complexo de índio. Essa diminuição foi atribuída ao efeito do átomo pesado, que favorece processos não radiativos, como o cruzamento intersistema, em detrimento da emissão de fluorescência. Embora a fluorescência seja reduzida, esse processo aumenta a população do estado tripleto e, conseqüentemente, favorece a formação de oxigênio singleto [45].

A introdução de um centro metálico não apenas intensifica o CIS, mas também pode originar novas configurações eletrônicas de estado excitado. Além das transições tradicionais do tipo intra-ligante, surgem estados centrados no metal, em que a excitação envolve orbitais d do íon metálico, e diferentes processos de transferência de carga. Esses processos podem ocorrer do metal para o ligante, do ligante para o metal, dentro de um mesmo ligante ou ainda entre ligantes distintos [46].

2.3.2 Propriedades de Complexos de Paládio e Relevância Oncológica

O sucesso da cisplatina, um complexo de platina(II), consolidou o papel dos metais de transição na terapia oncológica e abriu caminho para a investigação de compostos alternativos, incluindo complexos de paládio(II). O paládio pertence ao mesmo grupo da platina, apresentando semelhanças estruturais e eletrônicas. Entretanto,

destaca-se pela maior labilidade, o que pode representar tanto uma vantagem quanto um desafio: enquanto facilita modificações estruturais e a formação de complexos com diferentes ligantes, também aumenta a tendência à desativação em meio biológico, pela interação rápida com proteínas plasmáticas antes de alcançar alvos intracelulares [47]

Nosso grupo contribuiu nesse campo com o estudo de Alves (2020) [27], no qual foram sintetizados derivados de *meso*-tetra(4-piridil)porfirinas funcionalizados com complexos Pd(II)/fosfinas. Observou-se que a introdução de Pd(II) e de ligantes fosfinicos aumentou a estabilidade e a lipofilicidade dos complexos, ao mesmo tempo em que potencializou de forma significativa sua atividade fotodinâmica. Os ensaios biológicos revelaram efeitos citotóxicos comparáveis aos da cisplatina em células tumorais, embora acompanhados de reduzida seletividade, com citotoxicidade também detectada em células não tumorais.

Além das propriedades citotóxicas intrínsecas, compostos de paládio podem otimizar atividade fototóxica. Um exemplo é o estudo de Deng et al. (2020) [26], no qual porfirinas complexadas a Pd(II) (Pd-Monopor, Pd-Dipor e Pd-Tripor) apresentaram eficiência fotodinâmica significativamente superior em comparação às porfirinas livres, com redução dos valores de IC_{50} sob irradiação e maior geração de ROS.

Trentin et al. (2024) [48] sintetizaram e avaliaram *meso*-tetra(4-piridil)porfirinas funcionalizadas com Pd(II)-bipiridil, frente às linhagens A375 (melanoma humano), B16-F10 (melanoma murino) e fibroblastos L929 como controle não tumoral. Os resultados demonstraram elevada eficácia fotodinâmica, com valores de IC_{50} (0,43 μ M para A375 e 0,51 μ M para B16-F10), consideravelmente mais baixos do que os observados em fibroblastos, evidenciando seletividade tumoral.

O potencial terapêutico desses complexos extrapola a oncologia. Lima et al. (2021) [49] relataram a atividade fotodinâmica de uma porfirina de origem natural complexada a Pd contra *Leishmania*, explorando o efeito pró-oxidante em patógenos. Da mesma forma, Pucelik et al. (2024) [50] descreveram um derivado Pd-porfirínico com elevado rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta} = 0,93$) e eficácia antimicrobiana frente a bactérias.

Recentemente, nosso grupo avaliou a aplicação de porfirinas *meso*-tetrapiridil complexadas com paládio(II)/difosfinas como fotossensibilizadores em fotoativação antimicrobiana (PDI, do inglês *Photodynamic Inactivation*) de cepas multirresistentes associadas à mastite bovina. Observou-se ainda que o tratamento combinado de Pd-porfirinas e sulfonamidas resultou na restauração da suscetibilidade antibiótica em cepas

de *E. coli* multirresistentes, indicando uma possível interação sinérgica entre *PDT* e antibióticos [31].

2.4 Processos fotobiológicos em Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica causa danos às células tumorais principalmente através da geração de *ROS*. Esses danos podem ser classificados em: danos diretos e indiretos, que induzem morte e danos ao microambiente tumoral. Esses mecanismos não só eliminam as células cancerígenas, mas também podem estimular uma resposta imunológica contra o tumor, tornando a *PDT* uma abordagem terapêutica multifacetada e eficaz, apresentados na figura 6 [51].

2.4.1 Danos diretos em *PDT*

Os danos diretos induzidos pela *PDT* decorrem da interação imediata das *ROS*, em especial o oxigênio singlete, com componentes celulares essenciais, como lipídios de membrana, proteínas estruturais e funcionais e ácidos nucleicos. Considerando que o oxigênio singlete apresenta tempo de vida curto e alcance espacial limitado, o local subcelular de geração das *ROS* depende fortemente da localização do fotossensibilizador, sendo esse um fator determinante para a organela inicialmente danificada e, conseqüentemente, para o mecanismo predominante de morte celular induzido pela *PDT* [51].

Por exemplo, quando o fotossensibilizador se acumula preferencialmente nas mitocôndrias, a geração localizada de *ROS* promove oxidação das membranas mitocondriais interna e externa, levando à perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esses eventos culminam na ativação da cascata de caspases e na indução de *apoptose*, um processo de morte celular programada e pouco inflamatório, frequentemente observado em regimes de dose moderada de *PDT* [50,51,52].

Em contraste, quando o dano fotodinâmico ocorre predominantemente na membrana plasmática, geralmente associado a altas concentrações de fotossensibilizador ou doses elevadas de luz, a oxidação lipídica compromete a integridade da membrana celular, resultando em desequilíbrio osmótico, ruptura celular e liberação do conteúdo intracelular no meio extracelular. Esse processo caracteriza a *necrose*, um tipo de morte

celular descontrolada e altamente inflamatória, capaz de induzir respostas adversas no microambiente [50,53].

Além disso, fotossensibilizadores que se localizam nos lisossomos podem induzir permeabilização da membrana lisossomal após a irradiação, levando à liberação de catépsinas para o citosol. Esse evento pode ativar vias apoptóticas mitocondriais secundárias ou desencadear *autofagia associada à morte celular*. Embora a autofagia atue inicialmente como um mecanismo citoprotetor, promovendo a remoção de organelas danificadas, sua ativação excessiva ou desregulada após a *PDT* pode contribuir diretamente para a morte celular [50,53].

A *PDT* também pode induzir morte celular associada à *autofagia*, um processo catabólico altamente regulado no qual a célula degrada componentes citoplasmáticos e organelas danificadas por meio da formação de autofagossomos e posterior fusão com lisossomos [50,54]. Em condições fisiológicas, a autofagia atua como um mecanismo de sobrevivência e adaptação ao estresse; entretanto, quando ativada de forma excessiva ou desregulada, pode culminar em morte celular autofágica, caracterizada por intensa vacuolização citoplasmática e degradação progressiva de estruturas essenciais [50,54].

Dessa forma, a *PDT* não está associada a um único mecanismo de morte celular, mas sim a um espectro de respostas biológicas, moduladas pela localização subcelular do fotossensibilizador, concentração do *FS*, dose de luz e estado fisiológico da célula.

2.4.2 Danos indiretos em *PDT*

Em contraste aos efeitos diretos da *PDT*, que se caracterizam pela destruição imediata das células tumorais devido à ação citotóxica das *ROS* os danos indiretos estão associados a modificações secundárias no microambiente tumoral, desempenhando papel crucial na eficácia terapêutica a longo prazo. Entre esses efeitos, destacam-se a destruição da vasculatura tumoral e a ativação da resposta imune antitumoral.

Assim como as células neoplásicas, as células endoteliais da rede vascular também acumulam *FSs*. Quando ativados por luz em comprimentos de onda adequados, esses *FSs* induzem a produção de *ROS* capazes de comprometer a integridade das paredes vasculares, resultando em aumento da permeabilidade vascular, vasoconstrição e formação de trombos [32,51]. Como consequência, ocorre o colapso da rede vascular tumoral, com interrupção do suprimento de oxigênio e nutrientes, culminando em morte celular predominantemente por hipóxia e necrose. A literatura demonstra que o efeito

vascular da Terapia Fotodinâmica é particularmente pronunciado quando se utiliza um intervalo curto entre a administração do fotossensibilizador e a irradiação luminosa [32,51]. Nessa condição, o fotossensibilizador permanece majoritariamente confinado ao compartimento intravascular, favorecendo a fotodano seletivo do endotélio tumoral. Essa abordagem potencializa a eficácia terapêutica e, simultaneamente, minimiza efeitos colaterais sistêmicos ao poupar tecidos saudáveis adjacentes [32,51].

Além da destruição vascular, a *PDT* é capaz de induzir morte celular imunogênica (*ICD*, do inglês *Immunogenic Cell Death*), processo de grande relevância para a imunologia tumoral [32,51]. Diferentemente da apoptose ou necrose convencionais, a *ICD* promove a liberação e/ou exposição de padrões moleculares associados a dano (*DAMPs*, do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*), como a calreticulina (*CRT*, do inglês *Calreticulin*), exposta na membrana plasmática, e a proteína de grupo de alta mobilidade 1 (*HMGB1*, High-Mobility Group Box 1), liberada para o meio extracelular [32,51]. Esses sinais de perigo são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (*APCs*, do inglês *Antigen-Presenting Cells*), que capturam e processam os antígenos tumorais, apresentando-os a células T efetoras. O resultado é a ativação da imunidade adaptativa, com a geração de uma resposta sistêmica capaz de atacar células tumorais remanescentes e até mesmo metástases distantes [32,51].

Essa capacidade da *PDT* de remodelar o microambiente tumoral e estimular a resposta imune tem impulsionado o desenvolvimento de abordagens combinatórias [32,51]. Um exemplo promissor é o *priming* fotodinâmico (*PDP*, do inglês *Photodynamic Priming*), que consiste no uso da *PDT* em doses subletais ou em regimes controlados para sensibilizar o tumor, facilitar a penetração de fármacos e potencializar terapias combinadas, como a imunoterapia baseada em inibidores de checkpoint imune (*anti-PD-1*, *anti-CTLA-4*) [32,51]. Estudos recentes demonstram que o *PDP* pode aumentar a infiltração de células T citotóxicas no tumor, diminuir a imunossupressão mediada por células T regulatórias e melhorar significativamente a eficácia das terapias antitumorais sistêmicas [32,51].

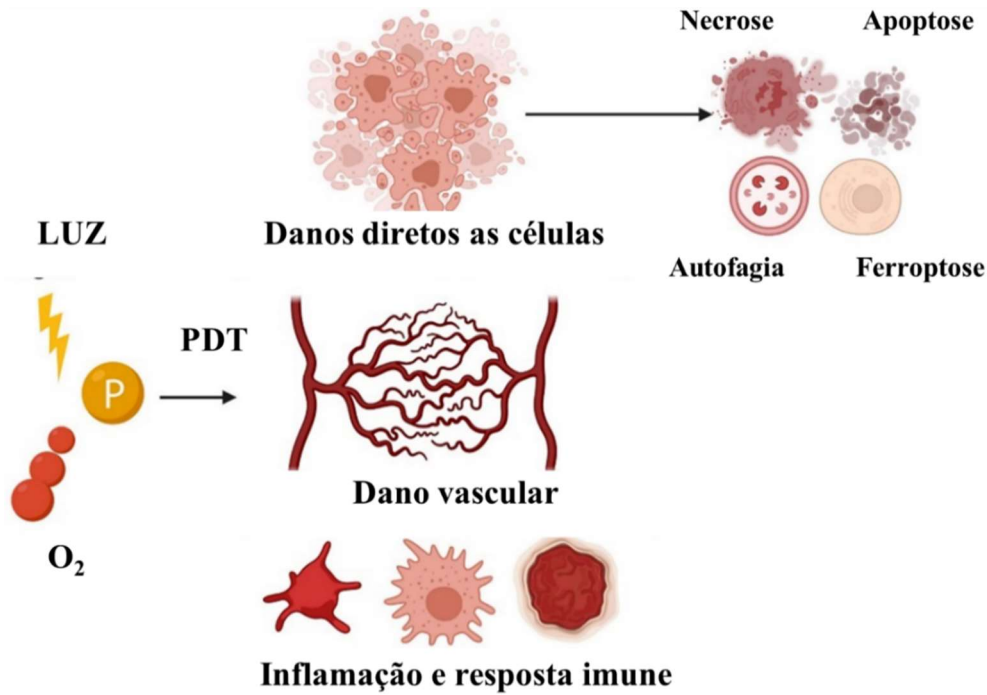


Figura 6: Ilustração esquemática do mecanismo da PDT. Três mecanismos de lesão tumoral mediada por PDT *in vivo* : danos diretos as células, dano vascular e inflamação e respostas imunes. Adaptado de Liuchang Tan et al (2022) [51].

4.2.3 PDT no Melanoma: Entre Barreiras Biológicas e Oportunidades Terapêuticas

A Terapia Fotodinâmica representa uma abordagem promissora e minimamente invasiva para o tratamento do câncer, já aprovada clinicamente para tumores de pele não melanoma. No entanto, sua aplicação no melanoma cutâneo sempre foi considerada desafiadora, em grande parte devido à presença da melanina.

O primeiro relato clínico na literatura sobre o uso da *PDT* no tratamento do melanoma foi publicado por Dougherty et al. (1978) [56]. Nesse estudo pioneiro, sete pacientes com melanoma maligno metastático, foram submetidos à *PDT* utilizando o *HPD* como agente fotossensibilizador. O *HPD* foi administrado por via intravenosa em doses, seguido de irradiação com luz vermelha.

Os resultados foram promissores: 12 de 14 lesões tratadas apresentaram resposta completa, caracterizada pela ausência de massa tumoral palpável ou necrose confirmada por biópsia, enquanto as demais tiveram resposta parcial [56]. Um caso emblemático descrito no artigo envolveu uma paciente de 33 anos com nódulo subcutâneo de 3 cm, resultando em necrose completa do tumor dentro do campo de luz até cerca de 2 cm de

profundidade. O estudo demonstrou que tumores pigmentados, como o melanoma, exigiram doses mais elevadas do fotossensibilizador para alcançar eficácia semelhante à observada em lesões não pigmentadas [56].

Apesar do sucesso de alguns casos, durante décadas, a melanina foi vista apenas como barreira: ela absorve a luz em um amplo espectro do visível competindo com os fotossensibilizadores, e possui propriedades antioxidantes capazes de neutralizar *ROS*, reduzindo a eficácia da *PDT*.

Contudo, pesquisas recentes vêm transformando esse entendimento. Hoje, a melanina não é mais considerada exclusivamente uma barreira, mas também uma oportunidade terapêutica. Há evidências de que, em determinadas condições, a feomelanina pode atuar como fotossensibilizador endógeno, gerando oxigênio singlete ou transferindo energia para fotossensibilizadores internalizados [56,58]. Além disso, alguns compostos metálicos têm mostrado capacidade de se acumular em melanossomas, explorando o pigmento como alvo terapêutico direto [58]. As bacterioclorinas sintéticas estudadas por Mroz et al. (2010) [58] além de superar a absorção da melanina usando luz *NIR* (730 nm), também danificaram melanossomas, potencializando o efeito fotodinâmico e resultando em regressão tumoral em modelos murinos.

Layla et al. (2024) [59], utilizando pulsos de femtossegundos no infravermelho próximo, demonstraram que a melanina é capaz de absorver múltiplos fótons e transferir essa energia para o fotossensibilizador, ampliando a geração de espécies reativas de oxigênio. O estudo confirmou esse efeito em linhagens de melanoma murino pigmentado e amelanótico *in vitro*, e em modelo *in vivo* de melanoma, no qual foi observada regressão tumoral completa [59]. Os autores compararam a eficácia fotodinâmica de um fotossensibilizador clínico (*Visudyne*) e de um dímero de porfírina (*Oxdime*). De forma inesperada, enquanto a *PDT* convencional (1 fóton) produziu efeitos semelhantes nas duas linhagens, mostrou-se muito mais potente em eliminar células pigmentadas do que amelanóticas [59].

Outro ponto positivo para o uso da *PDT* no melanoma é sua capacidade de atuar como um potente modulador do sistema imunológico. O melanoma é frequentemente classificado como um “tumor quente”, isto é, um tumor caracterizado por elevada infiltração de células do sistema imune, como linfócitos T citotóxicos, o que o torna mais responsivo a estratégias terapêuticas que estimulam ou modulam a imunidade antitumoral [60,61].

Nesse contexto, a *PDT* tem se destacado por sua habilidade de induzir *ICD*, um tipo específico de morte celular que não apenas elimina as células tumorais, mas também ativa o sistema imune. A *ICD* é caracterizada pela exposição de calreticulina na superfície da célula tumoral, um sinal que funciona como um “marcador de fagocitose”, e pela liberação de moléculas conhecidas como sinais de perigo, como a proteína *HMGB1* e o *ATP* extracelular. Esses sinais promovem a ativação de células dendríticas, que são responsáveis por capturar antígenos tumorais e apresentá-los aos linfócitos T, iniciando uma resposta imune adaptativa [62].

Lobo et al. (2023) [62] demonstraram que a *PDT* mediada por redaporfin em células de melanoma murino B16F10 promove um aumento significativo na expressão da molécula *CD80*, uma proteína coestimuladora expressa em células apresentadoras de antígeno. A presença de *CD80* é fundamental para a ativação eficiente dos linfócitos T *CD8+*, uma vez que fornece o segundo sinal necessário para sua ativação completa. Além disso, o aumento da razão *CD80/PD-L1* favorece um microambiente tumoral mais imunorreativo, reduzindo os sinais inibitórios associados à evasão tumoral e potencializando a eficácia de terapias baseadas em bloqueadores de checkpoint imunológico.

Dentre os fotossensibilizadores usados, as porfirinas constituem uma das classes mais investigadas, apresentando amplo espectro de absorção na região do visível, com uma banda intensa no azul e bandas menos intensas na região do vermelho e verde. Apesar da baixa profundidade de penetração da luz azul (1,5–2 mm) e da forte absorção pela melanina, estudos têm mostrado resultados animadores no uso dessa faixa espectral para o tratamento do melanoma [63].

Akasov et al. (2019) [63] demonstraram que a riboflavina (vitamina B2) apresentou acúmulo seletivo em células de melanoma (A375, Mel IL e Mel Z) e, quando fotoativada por luz azul, levou à morte celular predominantemente apoptótica *in vitro*, com valores de IC_{50} entre 10–30 μ M. De forma ainda mais relevante, a aplicação *in vivo* da terapia fotodinâmica mediada por riboflavina e irradiação na região azul do espectro resultou em regressão significativa de tumores de melanoma em camundongos, alcançando 85–90% de inibição tumoral após o tratamento.

4.2.4 *PDT no Adenocarcinoma Ductal Pancreático: Remodelando o Microambiente Tumoral*

O adenocarcinoma ductal é uma forma agressiva de câncer pancreático, conhecido por sua alta letalidade e que representa um dos maiores desafios no campo da oncologia. Apesar dos progressos recentes, as terapias convencionais ainda encontram limitações significativas na obtenção de respostas clínicas expressivas e na melhoria da sobrevivência dos pacientes com *PDAC* [64]. Nesse contexto, a compreensão do papel do microambiente tumoral tornou-se fundamental para explicar a resistência característica dessa neoplasia.

Diversos estudos apontam a desmoplasia como um fator central na promoção e manutenção do *PDAC*, uma vez que estimula a proliferação de células cancerígenas, incentiva propriedades invasivas e, ao mesmo tempo, suprime a resposta imune antitumoral. De fato, a desmoplasia pode compor até 90% do volume tumoral, englobando matriz extracelular (*ECM*, do inglês *Extracellular Matrix*), células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e fibroblastos associados ao câncer (*CAFs*, do inglês *Cancer-Associated Fibroblasts*), predominantemente derivados das células estreladas pancreáticas (*FSCs*, do inglês *Pancreatic Stellate Cells*). Quando ativadas, as *FSCs* passam a expressar a proteína miofibroblástica α -actina de músculo liso e a secretar fatores que promovem crescimento, sobrevivência celular e metástase [65,66].

Esse processo leva a uma produção exacerbada de *MEC*, que não apenas funciona como barreira física à penetração de fármacos, mas também contribui bioquimicamente para a resistência a medicamentos, reforçando a agressividade do *PDAC* [65,66]. Assim, as complexas interações entre tumor e estroma evidenciam a necessidade de estratégias terapêuticas inovadoras e personalizadas que consigam superar as limitações impostas por esse microambiente.

É nesse ponto que a *PDT* surge como uma ferramenta aliada às terapias convencionais, especialmente em sua modalidade *PDP*. Huang et al. (2017) [67] demonstraram que o *PDP* pode atenuar a resistência quimioterápica em *PDAC*, aumentando a penetração do irinotecano lipossomal no tumor. Mais recentemente, Bano et al. (2024) [68] mostraram que a combinação de minociclina e *PDP* em esferoides heterotípicos de *PDAC* resultou em maior eficácia da quimioterapia, destacando o papel do *PDP* em modular tanto a permeabilidade tumoral quanto as respostas adaptativas do microambiente.

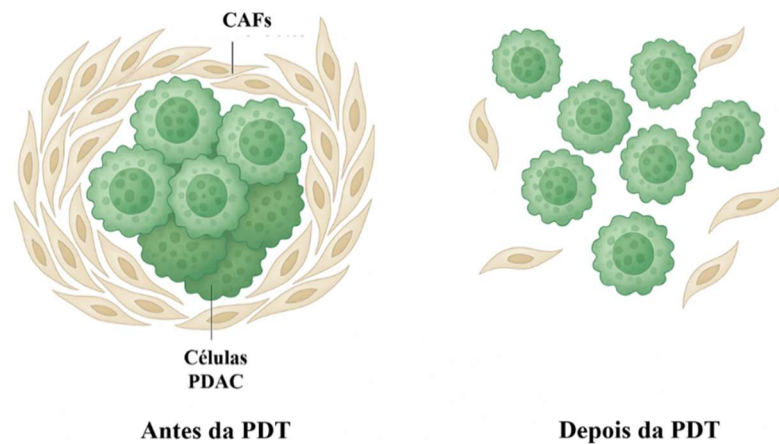


Figura 7: Representação esquemática do microambiente tumoral de adenocarcinoma ductal pancreático antes e após a Terapia Fotodinâmica (Fonte: autor próprio).

A figura 7 mostra a representação esquemática do microambiente tumoral de PDAC antes e após PDT. Antes da PDT, as células tumorais de PDAC encontram-se circundadas por CAFs, que formam uma barreira desmoplásica protetora. Após a PDT, observa-se a desagregação dessa barreira estromal, resultando em maior exposição e dispersão das células tumorais.

O papel imunomodulador da Terapia Fotodinâmica torna-se particularmente relevante quando integrado às estratégias de imunoterapia, especialmente aos inibidores de *checkpoints* imunológicos. Esses *checkpoints* representam mecanismos fisiológicos de regulação envolvidos no equilíbrio entre ativação e tolerância do sistema imune, prevenindo respostas excessivas ou autoimunes [69,70]. No contexto do câncer, porém, diversas neoplasias exploram esses mecanismos, como *PD-1/PD-L1* e *CTLA-4*, para escapar da vigilância imunológica, contribuindo para o estabelecimento de um microambiente tumoral profundamente imunossupressivo, favorecendo a progressão da doença e a resistência terapêutica [71].

A importância desse eixo de regulação ficou amplamente demonstrada pelos trabalhos de James P. Allison e Tasuku Honjo, laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2018, ao elucidar como o bloqueio de *CTLA-4* [72] e *PD-1* [73] pode restaurar a atividade de linfócitos T citotóxicos e permitir respostas antitumorais mais robustas. Desde então, os inibidores de *checkpoints* transformaram o tratamento oncológico, mas sua eficácia permanece limitada em tumores caracterizados por imunossupressão profunda ou baixa inflamação basal.

É justamente nesse ponto que a *PDT* adquire relevância estratégica, ao induzir morte celular imunogênica, liberação de *DAMPs* (como calreticulina e HMGB1) e remodelação do microambiente tumoral, a *PDT* pode aumentar a infiltração de células T, reverter fenótipos “*cold tumors*” e potencializar significativamente a resposta aos inibidores de checkpoints. De Silva et al. (2025) relataram que o *PDP* com luz vermelha em modelo murino de *PDAC* induziu um aumento na infiltração de células T CD8+ e modulou a expressão de checkpoints imunológicos como *PD-1* [74]. Assim, a combinação *PDT* com a imunoterapia representa uma abordagem altamente promissora para superar resistência terapêutica e alcançar respostas sistêmicas mais duradouras.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1 Complexos porfirínicos: $\{TPyP[PdCl(P-P)]_4\}(PF_6)_4$

As amostras analisadas foram obtidas conforme protocolos de síntese previamente descritos na literatura [27]. Elas correspondem a uma classe de compostos derivados das *meso*-tetrapiridilporfirinas (TPyP), nas quais foram coordenados quatro periféricos de paládio(II) (Figura 8): 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (dppp), 1,4-bis(difenilfosfino)butano (dppb) e 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf). Para simplificação, os complexos resultantes são denominados Porf@dpe, Porf@dppp, Porf@dppb e Porf@dppf, respectivamente. Suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 9.

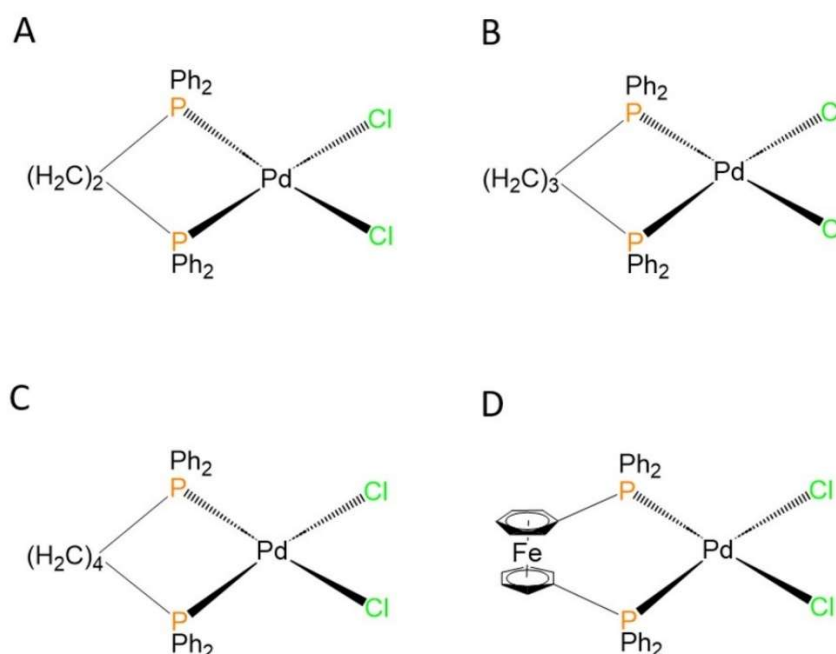


Figura 8: Representação das estruturas químicas dos precursores de paládio: (a) $PdCl_2(dppe)$, (b) $PdCl_2(dppp)$, (c) $PdCl_2(dppb)$ e (d) $PdCl_2(dppf)$

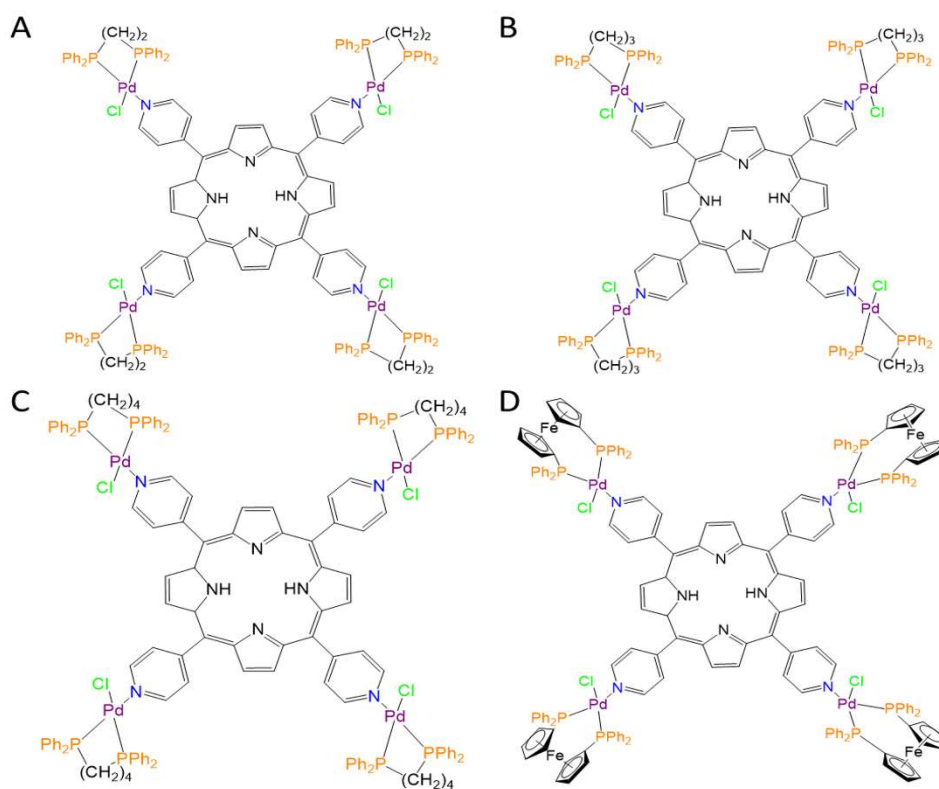


Figura 9: Estruturas químicas dos complexos de paládio(II) derivados da porfirina meso-tetra(4-piridil) (TPyP): A) *Porf@dppe*, B) *Porf@dppp*, C) *Porf@dppb* e D) *Porf@dppf*.

3.2 Fotofísica e fotoquímica

3.2.1 Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis

Os espectros de absorção foram coletados utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi™, modelo U2900), disponível no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física da UFG. As medições foram realizadas na faixa espectral de 400 a 700 nm, com os compostos solubilizados em *Dimethyl sulfoxide* (DMSO). A absorvância foi medida em cubetas de vidro com caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.2 Medições dos estados tripleto

Os estados excitados tripleto dos complexos foram investigados utilizando um sistema de *Laser Flash Photolysis* (LFP) instalado no laboratório. A excitação foi realizada com comprimento de onda e 532 nm de um laser Nd:YAG, operando a 10 Hz,

com duração de pulso de aproximadamente 6 ns. O decaimento do estado tripleto foi monitorado ortogonalmente por absorção tripleto–tripleto em 470 nm, utilizando um monocromador Sciencetech acoplado a um fotomultiplicador Hamamatsu.

As medições foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 cm², e a potência do laser foi monitorada com um medidor Thorlabs (PM100A) equipado com sensor térmico (S470C). A análise dos dados foi conduzida no software OriginPro 8, sendo os valores finais obtidos a partir da média de três experimentos independentes.

Os rendimentos quânticos de estado tripleto (Φ_T) foram determinados conforme metodologia previamente descrita [75]. Esse procedimento consiste na obtenção das curvas de decaimento do estado tripleto em diferentes energias do pulso para as amostras estudadas e para um composto padrão de rendimento quântico conhecido. A *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) foi utilizado como padrão, apresentando $\Phi_T = 0,85$ em *DMSO* [76]. Os valores de Φ_T dos complexos foram calculados de acordo com a Equação 2:

$$\phi_T = \frac{\Delta A_0 A_{ex}^S C_0 \Delta A_{max}^S}{\Delta A_0^S A_{ex} C_0^S \Delta A_{max}} \phi_T^S \quad Eq. 2$$

Nesta equação, ΔA_0 representa a amplitude das curvas de decaimento do estado tripleto medida imediatamente após o término do pulso de excitação. A_{ex} denota o valor de absorbância no comprimento de onda de excitação, C_0 indica a concentração molar, e ΔA_{max} corresponde ao valor máximo de ΔA_0 , obtido em níveis mais elevados de energia do pulso de laser (E), indicando que a população eletrônica no estado tripleto atingiu seu valor máximo. O sobrescrito “S” refere-se aos valores do composto padrão.

3.2.3 Determinação de rendimento de formação de oxigênio singleto: método direto

O método direto de determinação do oxigênio singleto é baseado na detecção da emissão de fosforescência característica do ¹O₂ quando ele retorna ao seu estado fundamental. Essa fosforescência ocorre na região do infravermelho próximo, com um pico típico em torno de 1270 nm. A intensidade da fosforescência do ¹O₂ é diretamente proporcional à quantidade de oxigênio singleto gerado. Além do mais, a detecção do ¹O₂ se faz necessária a presença de moléculas de oxigênio disponíveis para a sua formação, e pensando nisso, as soluções dos compostos foram enriquecimento do gás O₂ por 30 min.

A Equação 3 apresenta a formulação matemática utilizada para a estimativa do rendimento quântico de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), a qual se baseia na comparação dos dados experimentais com um fotossensibilizador padrão de rendimento conhecido. Neste trabalho, foi utilizada a *TPP* como padrão (Figura 8), uma vez que apresenta rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ bem estabelecido na literatura, igual a 0,52 quando solubilizada em *DMSO* [77].

$$\phi_{\Delta} = \frac{I_{fos}}{A} * \frac{A_0}{I_{fos}} * \phi_{\Delta 0} \quad Eq. 3$$

Onde, I_{fos} representa a integral da curva de emissão da fosforescência da amostra em estudo, A o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação e ϕ_{Δ} corresponde ao rendimento de oxigênio singlete. O subscrito “0” em cada termo se refere aos dados do composto padrão.

Os espectros de fosforescência do $^1\text{O}_2$ foram medidos em um espectrômetro IHR320, da Horiba utilizando como fonte de excitação um módulo laser contínuo iZI-LaserLine (532 nm, ~60mW).

3.3 *Investigação biológica*

3.3.1 *Estudo de interação com BSA*

Os estudos de interação entre a albumina sérica bovina (da Sigma-Aldrich) e os complexos Porf@dppb e Porf@dppf foram realizados por meio de experimentos de supressão de fluorescência, nos quais a concentração de BSA em tampão (4,5 mM Tris-HCl, 0,5 mM NaOH e 50 mM NaCl) a pH 7,4 foi mantida constante (2,5 μM), enquanto a concentração dos complexos foi aumentada de 0,031 a 4,0 μM .

A extinção da intensidade de emissão dos resíduos de triptofano da *BSA* a 320 nm (comprimento de onda de excitação de 270 nm) foi monitorada nas temperaturas de 298, 303 e 310 K. A análise quantitativa da supressão da fluorescência foi realizada empregando a equação de Stern–Volmer (Equação 4) [78]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad Eq. 4$$

em que F_0 e F representam, respectivamente, as intensidades de fluorescência da *BSA* na ausência e na presença do agente supressor; K_{SV} corresponde à constante de Stern–Volmer; k_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de vida médio da fluorescência da *BSA* no estado fundamental (6,2 ns); e $[Q]$ é a concentração do complexo (agente supressor). Além disso, a constante de ligação K_b e o número de sítios de ligação n foram determinados utilizando a Equação 5:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad Eq. 5$$

3.3.2 Câncer de pele tipo melanoma

3.3.2.1 Condições de cultivo celular

Células de melanoma murino (B16-F10), células de melanoma humano (A375) e queratinócitos humanos (Hacat) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (*DMEM*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂. O *DMEM* e o *FBS* foram obtidos, respectivamente, da Vitrocell Brasil (Campinas, SP, Brasil) e da Gibco Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA).

3.3.2.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (*MTT*). As linhagens celulares de melanoma humano (A375), melanoma murino (B16F10) e queratinócitos humanos (Hacat) foram utilizadas nesses experimentos. As células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço, e incubadas durante a noite até atingirem 80–90% de confluência. Soluções estoque dos fotossensibilizadores foram preparadas em DMSO e diluídas conforme necessário.

Para a avaliação da citotoxicidade, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos precursores (0,4 a 50 μM) e dos complexos finais (0,003 a 12,5 μM). Após 48 h de tratamento, adicionou-se 50 μL de solução de *MTT* (1 mg/mL) em cada poço, e as células foram incubadas por mais 4 h. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em 150 μL de *DMSO*. A absorbância foi medida em 540 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Epoch, BioTek). Os valores de IC_{50} foram calculados no software GraphPad Prism 8.0.2. O Índice de Seletividade (IS) foi determinado pela razão entre os valores de IC_{50} obtidos para as linhagens não tumorais (Hacat) e tumorais (B16-F10) sob as mesmas condições experimentais.

3.3.2.3 *Ensaio de fototoxicidade*

Nos experimentos de fotocitotoxicidade, as células foram tratadas com concentrações crescentes dos complexos (0,00019 a 0,00312 μM) e incubadas por 90 minutos para permitir a internalização. Após o tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco sem vermelho de fenol, e as células foram irradiadas utilizando uma fonte de luz *LED* de 415 nm, com irradiância de 30 mW/cm² durante 1 minuto, correspondendo a uma dose de luz de 1,8 J/cm². Após a irradiação, adicionou-se *MTT* (1 mg/mL) e as células foram incubadas por 3 horas a 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em 150 μL de *DMSO*. A absorbância foi medida em 540 nm, e a viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao controle negativo (0,5% *DMSO*). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos independentemente três vezes. O Índice de Fototoxicidade (IF) foi calculado para cada composto como a razão entre as concentrações inibitórias médias (IC_{50}) determinadas no escuro e após a irradiação.

3.3.2.4 *Ensaio morfológico*

O efeito dos complexos Porf@dppb e Porf@dppf sobre a morfologia das células A375 foi avaliado utilizando 1×10^5 células por poço em placas de 12 poços. Após 24 h da semeadura, as células foram expostas às concentrações correspondentes a IC_{50} e 2IC_{50} , conforme determinado no ensaio clonogênico. Após 90 minutos de incubação para permitir a internalização, o meio foi substituído por meio sem vermelho de fenol e sem

soro, e as células foram irradiadas com uma dose de luz de 1,8 J/cm². As culturas foram então mantidas em condições padrão por 48 h. As alterações morfológicas foram avaliadas nos tempos de 0 h e 48 h utilizando um microscópio óptico invertido (NIKON ECLIFSE TS100) equipado com objetiva de 10× e câmera Motcam 1SP, sendo comparadas às células controle tratadas apenas com *DMSO*.

3.3.2.5 Determinação dos níveis intracelulares de ROS

A produção intracelular ROS foi avaliada em células de melanoma humano A375 utilizando a sonda fluorescente *H₂DCFDA*. As células foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço, em *DMEM* (10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina) e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Em seguida, as culturas foram tratadas com os fotossensibilizadores Porf@dppb e Porf@dppf nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{4}$ IC₅₀ e IC₅₀ (*DMSO* ≤ 0,5% v/v) e incubadas por 1 h e 30 min no escuro.

Após a incubação, o meio foi substituído por meio sem vermelho de fenol e sem soro, e as células foram irradiadas com *LED* de 415 nm, correspondendo a uma dose de luz de 1,8 J/cm². Após a irradiação, o meio foi removido, e as células foram incubadas com *H₂DCFDA* (10 μM) por 30 min no escuro a 37 °C. Em seguida, a sonda foi descartada, as células foram lavadas uma vez com *PBS* 1× frio, e adicionaram-se 200 μL de tampão de lise RIPA em cada poço, seguido de incubação no gelo por 5 min. As células foram removidas com raspador estéril, transferidas para microtubos e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para uma placa preta de 96 poços, e a fluorescência da *DCF* foi medida em leitor de microplacas (excitação 485 ± 10 nm, emissão 535 ± 15 nm).

3.3.2.6 Ensaio clonogênico

Para o ensaio clonogênico, células de melanoma A375 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 500 células por poço. Após 24 h de incubação, os fotossensibilizadores Porf@dppb e Porf@dppf foram adicionados em concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ e 2IC₅₀, previamente determinadas nos ensaios de fotocitotoxicidade. As células foram incubadas com cada fotossensibilizador por 90 minutos para permitir a internalização; em seguida, o meio foi substituído por meio fresco

sem vermelho de fenol e sem soro. As placas foram então irradiadas com uma dose de luz de 1,8 J/cm² e posteriormente incubadas por mais 7 dias para permitir a formação das colônias. Ao final desse período, as colônias foram fixadas com cristal violeta a 0,5% em metanol por 30 minutos, lavadas com água destilada e deixadas para secar à temperatura ambiente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A sobrevivência relativa foi determinada utilizando o software ImageJ.

3.3.2.7 Ensaio de migração celular

Para avaliar a capacidade de inibição da migração celular, foi realizado um ensaio de cicatrização (“*wound healing assay*”). Células de melanoma humano A375 foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de $0,5 \times 10^5$ células por poço, e mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 24 h. Após a incubação, uma “ferida” foi criada utilizando uma ponteira estéril de 200 µL. O meio de cultura foi então substituído por meio fresco sem vermelho de fenol e sem soro, e as células foram tratadas com os fotossensibilizadores Porf@dppb e Porf@dppf nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{8}IC_{50}$ e $\frac{1}{2}IC_{50}$. Após 90 minutos de incubação para permitir a internalização, o meio foi substituído e as células foram irradiadas com uma dose de luz de 1,8 J/cm². As placas foram então mantidas em condições padrão de cultura, e imagens do fechamento da “ferida” foram capturadas nos tempos de 0 e 48 h utilizando o sistema de imagem digital CELENA S (Logos Biosystems). A área da ferida foi quantificada utilizando o software ImageJ.

3.3.3 Câncer Pancreático

3.3.3.1 Fotobiologia em modelo 3D de câncer pancreático

Para avaliar o potencial fototóxico dos compostos Porf@dppf e Porf@dppb, iniciamos os experimentos em esferóides 3D homogêneos compostos exclusivamente por células MIA PaCa-2. Este modelo simplificado permitiu uma análise preliminar da eficácia dos compostos frente a uma linhagem de adenocarcinoma ductal pancreático conhecida por sua elevada resistência às terapias convencionais.

Com base nos resultados obtidos o composto Porf@dppf foi posteriormente testado em um modelo heterogêneo, que simula de forma mais fiel a complexidade do microambiente tumoral pancreático. Este modelo incorpora fibroblastos associados ao câncer em diferentes proporções, reproduzindo as características desmoplásticas típicas do tumor. Todos os ensaios de fototoxicidade foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por Saad (2022).

3.3.3.2 Esferóides 3D homogêneo

As células MIA PaCa-2, cultivadas em frascos de 75 mm, foram trisinizadas, contadas e semeadas em microplacas de 96 poços *CellCarrier Spheroid ULA* (6055330, PerkinElmer, Waltham, MA) para formar esferóides 3D, com um total de 5.000 células por poço. Esses esferóides foram tratados com os compostos Porf@dppf e Porf@dppb por 90 minutos, em concentrações finais de 1 μ M, 2 μ M e 3 μ M. Após a incubação, o meio contendo os FSs foi cuidadosamente removido, e os esferóides foram lavados três vezes com meio de cultura livre de FSs. Esse procedimento garantiu que apenas os compostos internalizados nas células contribuíssem para o tratamento.

3.3.3.3 Esferóides 3D: simulação de desmoplasia

As células MIA PaCa-2 e *PCAFs* foram semeadas em microplacas de 96 poços *CellCarrier Spheroid ULA* (6055330, PerkinElmer, Waltham, MA), utilizando meio de cultura DMEM alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor e 1% de solução antibiótica de penicilina (100 U/mL). Manteve-se a proporção de *PCAFs* em 90%, enquanto o número total de células foi mantido constante em 5.000 células por poço.

3.3.3.4 Parâmetros de irradiação

A irradiação foi realizada de forma vertical, pela base das microplacas, utilizando uma fonte de laser de diodo com comprimento de onda de 635 nm e irradiância de 150 mW/cm². As doses totais de luz administradas foram de 1,5, 3, 6 e 10 J/cm². Após a irradiação, as placas foram incubadas por 72 horas, em condições controladas de 37 °C e

5% de CO₂, para permitir o desenvolvimento completo dos processos de morte celular induzida pela *PDT*.

3.3.3.5 *Análise de Viabilidade*

Após o período de incubação, os esferóides foram analisados utilizando o sistema Operetta CLS (*Perkin Elmer*, configuração *LIVE*). A fluorescência de *mCherry* (ex/em: 550/570–650 nm) foi capturada por excitação com *LED* a 550 nm e para o *EGFP* (ex/em: 475/500–570 nm) foi coletada por excitação com *LED* a 475 nm. As imagens coletadas foram analisadas utilizando o *software ImageJ* para extrair a intensidade de fluorescência e posteriormente o cálculo da viabilidade foi realizado usando o *Prisma*. A viabilidade relativa foi calculada normalizando a intensidade de fluorescência de *MIA PaCa-2-mCherry* e *PCAF-EGFP* dos esferóides tratados pela intensidade correspondente dos esferóides não tratados (controle).

3.3.3.6 *Medição de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)*

A geração intracelular de *ROS* foi avaliada utilizando o kit 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (*DCFDA*) – *Cellular ROS Assay Kit* (ab113851, *Abcam*, Cambridge, UK). O *DCFDA* é um corante fluorogênico amplamente utilizado para medir a atividade de hidroxilas, peróxidos e outras *ROS* no ambiente intracelular. Em contato com as *ROS*, esse composto é oxidado, resultando na formação do 2',7'-dichlorofluorescein (*DCF*), um fluoróforo que permanece dentro das células.

As células da linhagem *PAC-2* foram semeadas em placas *Black* de 96 poços. No dia seguinte, as células foram incubadas com 3 µM de *FS* por 90 minutos. Após a incubação, o meio foi removido, e as células foram lavadas com *PBS* para eliminar o excesso de *FS* não internalizado. Em seguida, 5 µL de *DCFDA* foram adicionados a cada poço.

Posteriormente, as células foram então submetidas a doses de luz de 1,5; 3; 6 e 10 J/cm². A geração de *ROS* foi avaliada nos tempos de 0, 1 e 2 horas após a aplicação da *PDT*, através da medição da intensidade da fluorescência utilizando um leitor de microplacas (*Fluostar Omega*, *BMG Labtech*, Ortenberg, Alemanha), configurado com comprimentos de onda de excitação em 485 nm e de emissão em 535 nm.

3.3.3.7 Uptake por Citometria de Fluxo

O ensaio de internalização do Porf@dppfe Porf@dppb foram realizado utilizando células MIA PaCa-2 cultivadas como esferóides 3D em placas Corning® Costar® de 24 poços com superfície de baixa adesão (REF 3473, Corning Inc.). Os esferóides foram incubados com os compostos (3 µM, 90 minutos, 37 °C, 5% de CO₂). Após a incubação, o meio foi removido e os esferóides foram lavados com PBS. Em seguida, os esferóides foram dissociados utilizando o *Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free* (Gibco, REF 13151-014) por 15 minutos a 37 °C, seguido de centrifugação a 300 × g por 5 minutos. O pellet celular resultante foi ressuspensão em FACS Buffer para análise em um citômetro de fluxo BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A fluorescência dos fotossensibilizadores foi detectada no canal APC (excitação: 650 nm, emissão: 660 nm), e os dados foram processados utilizando o software FlowJo.

3.3.3.8 Detecção de Calreticulina

Após o tratamento com 3 µM do fotossensibilizador e irradiação nas fluências de 1,5 e 10 J/cm², as células foram coletadas, lavadas e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%. Para a detecção de calreticulina, foi seguido o protocolo fornecido pelo fabricante do anticorpo anti-calreticulina conjugado ao Alexa Fluor® 488 (Cell Signaling Technology, XP Rabbit, Cat. #12238S), incluindo as etapas de permeabilização, incubação com o anticorpo e lavagens subsequentes. A aquisição da fluorescência foi realizada em um citômetro de fluxo BD FACSAria II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), com detecção da fluorescência da calreticulina no canal Alexa Fluor® 488 (excitação: 499 nm, emissão: 520 nm). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo v10.8.

3.3.3.9 Avaliação de Danos Organelares

Os danos em organelas foram avaliados 24 horas após o tratamento. Para análise mitocondrial, as células foram incubadas com *MitoTracker Red* (Thermo Fisher Scientific) na concentração final de 100 nM em PBS, por 30 minutos a 37 °C no escuro. Para marcação lisossomal, as células foram incubadas com *LysoTracke* (Thermo Fisher Scientific) na concentração final de 50 nM, também por 30 minutos a 37 °C no escuro. As células foram analisadas por microscopia confocal, com detecção de fluorescência nas

faixas de excitação/emissão de 561/580 nm para o *MitoTracke Red* e 488/510 nm para o *LysoTracker*. As imagens foram adquiridas e processadas utilizando o software *ImageJ*, e a integridade mitocondrial e lisossomal foi avaliada com base na intensidade da fluorescência e na morfologia das organelas.

3.3.3.10 Análise estatística

O programa *GraphPad Prism* foi utilizado para analisar os dados estatísticos obtidos no experimento. Os dados foram avaliados por meio de análise de variância (*ANOVA*), e as diferenças entre as médias foram comparadas utilizando o método de *Tukey*. Os resultados foram apresentados como média acompanhada do respectivo desvio padrão. Considerou-se um nível de significância de $P < 0,05$ para determinar a relevância estatística das diferenças observadas.

Capítulo 4

Propriedades fotofísicas e interação com biomoléculas

*Os resultados deste capítulo foram publicados no artigo: PIRES, Luiz Henrique Barbosa et al. Breaking antibiotic resistance: Porphyrin-driven photoinactivation and priming effect on mastitis-related MDR bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 113246, 2025.*

•
•

4.1 Propriedades fotofísicas dos FS

4.1.1 Espectros de absorbância

A técnica de espectroscopia UV-Vis foi empregada para monitorar as transições eletrônicas. Os espectros de absorbância dos compostos foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 400 a 700 nm, conforme apresentado na Figura 10. Os espectros de absorbância apresentaram as bandas características das porfirinas, com a banda de *Soret* em 416 nm e as bandas Q em 512, 544, 586 e 640 nm. A introdução do metal não promoveu alterações significativas nas posições dessas bandas, preservando o perfil espectral típico dessa classe de compostos.

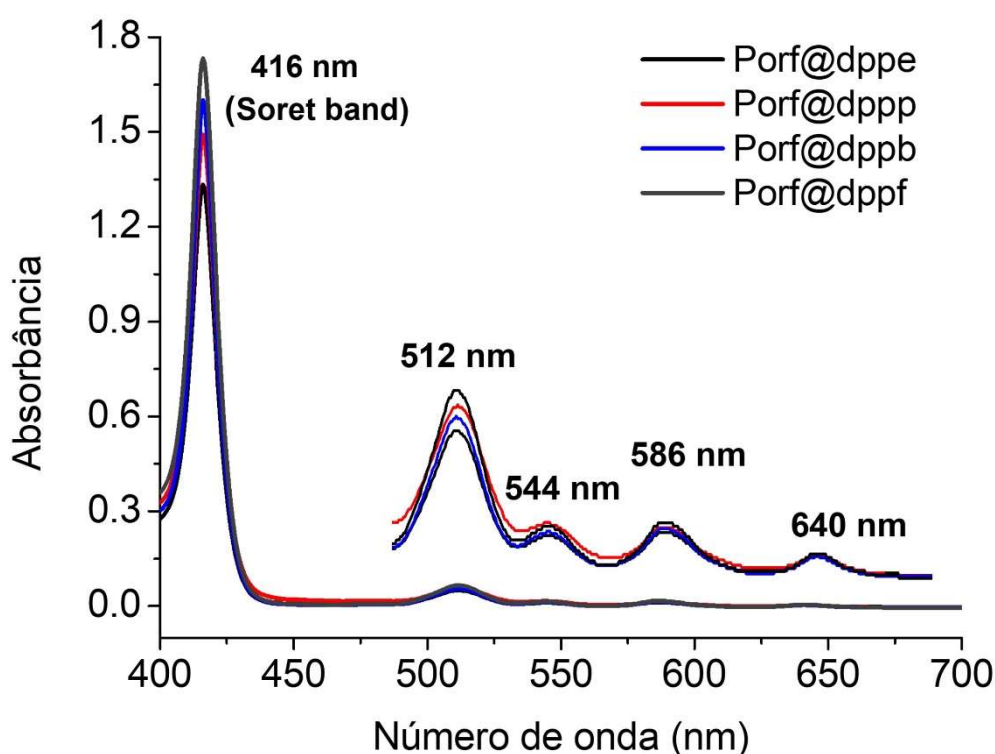


Figura 10: Espectros apresentaram picos característicos dos complexos de porfirinas

4.1.2 Rendimento quântico de formação de estados tripleto e oxigênio singleto

Os valores de rendimento quântico de estado tripleto (Φ_T) e de oxigênio singleto (Φ_Δ) para os complexos estudados e estão apresentados na Tabela 3. As curvas de decaimento de ΔA em função da energia encontra-se nas Figura 11 e as curvas de espectro de emissão do oxigênio singleto encontra-se na Figura 12. Os complexos Porf@dppb,

Porf@dppp e Porf@dpe exibiram valores elevados e próximos ($\Phi_T \approx 0,72-0,93$; $\Phi_\Delta \approx 0,62-0,67$), indicando boa eficiência na formação do estado tripleto e subsequente transferência de energia para o oxigênio molecular. Em contraste, o complexo Porf@dppf, contendo unidade ferrocênica, apresentou valores significativamente menores ($\Phi_T \approx 0,46$; $\Phi_\Delta \approx 0,42$).

De acordo com a Tabela 3, observa-se que os compostos Porf@dpe, Porf@dppp e Porf@dppb apresentam valores semelhantes de rendimento quântico do estado tripleto, produção de oxigênio singlete e coeficiente de lipofilicidade (LogP). Diante disso, optou-se por selecionar apenas os complexos Porf@dppb e Porf@dppf para os ensaios de interação com albumina, bem como para uma investigação mais aprofundada nos estudos celulares.

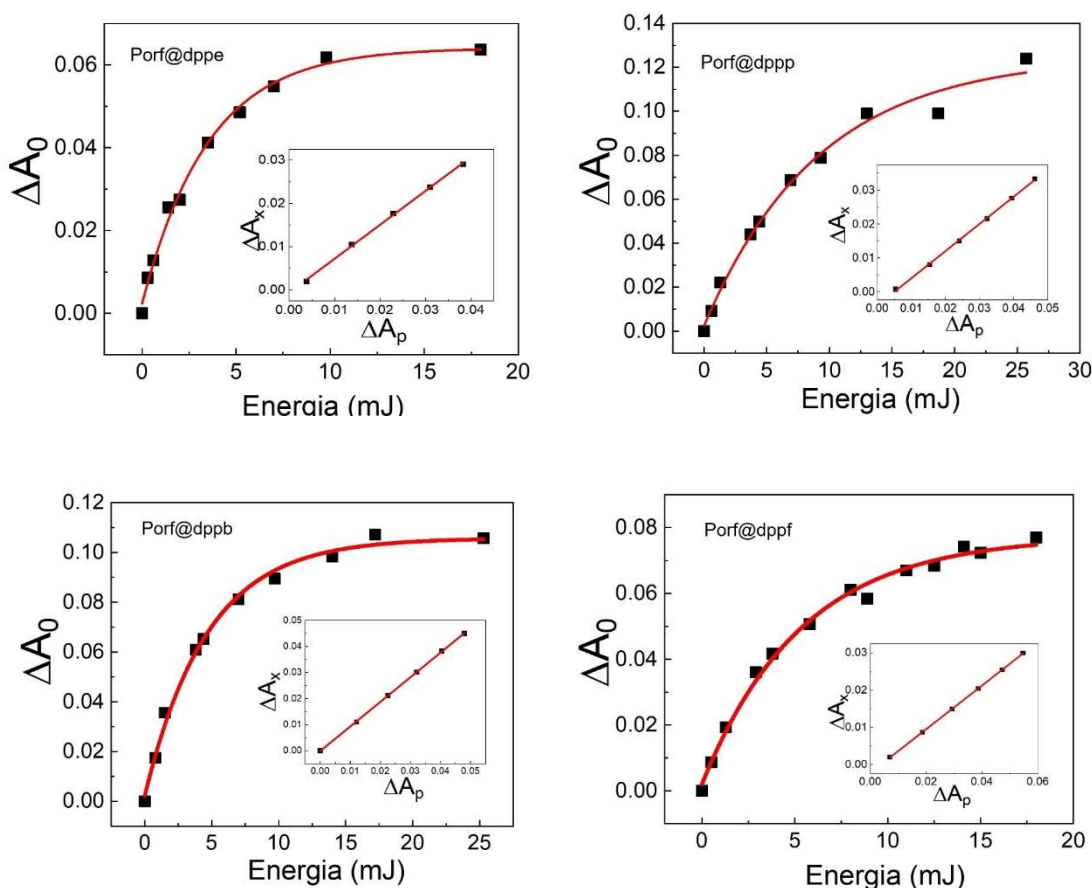


Figura 11: Curvas de decaimento de ΔA_0 em função da energia dos compostos.

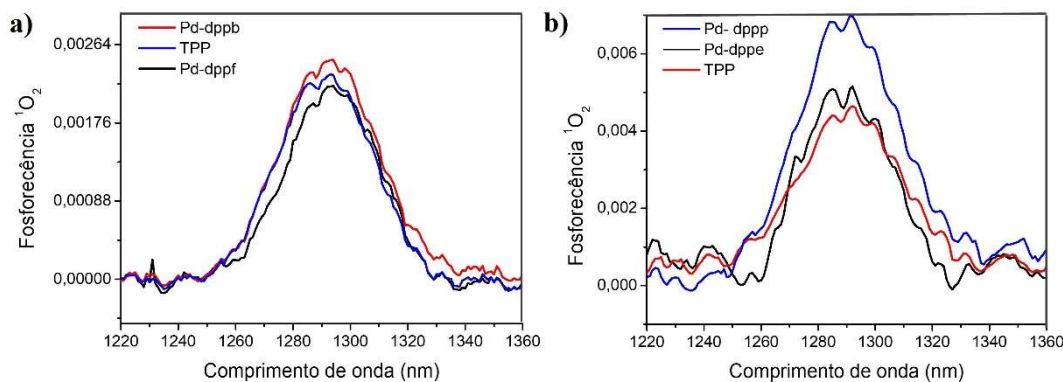


Figura 12: Espectro fosforescência do oxigênio singlete

Tabela 2: Rendimentos quânticos de estado tripleto (Φ_T) e de oxigênio singlete (Φ_A) dos complexos.

Composto	Φ_T	Φ_A	LogP*
Porf@dpppe	$0,82 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$	2,15
Porf@dppp	$0,72 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,02$	2,20
Porf@dppb	$0,83 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,05$	2,56
Porf@dppf	$0,46 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,04$	3,10

*Veja Ref [27]

4.2 Interação com biomoléculas

4.2 Interação com BSA

A BSA foi utilizada como proteína modelo devido à sua elevada homologia estrutural com a albumina sérica humana e por representar a principal proteína transportadora plasmática, desempenhando papel fundamental no transporte e distribuição de fármacos, modulando sua biodisponibilidade e tempo de circulação sistêmica. A interação dos complexos porfirínicos com a BSA foi avaliada por espectroscopia de fluorescência, explorando a supressão da emissão do resíduo de triptofano.

Na figura 13, observa-se que a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu progressivamente de maneira dependente da concentração após a adição dos complexos, sem deslocamentos significativos no máximo de emissão. A análise de Stern–Volmer (Tabela 4 e Figuras 14A e 14B) demonstrou que todos os complexos interagiram eficientemente com a BSA, com constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) na ordem de 10^5 . As constantes biomoleculares de supressão ($k_q \sim 10^{13} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) excederam o limite controlado

por difusão para biopolímeros ($7,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), sugerindo um processo de supressão não colisional [36]. Além disso, os valores de K_{sv} não apresentaram dependência significativa da temperatura. As constantes de ligação (K_b) também ficaram na ordem de $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando afinidade moderada entre os complexos e a albumina [37,38]. O composto Porf@dppf apresentou o menor valor de K_b ($1,25 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 298 K), enquanto os demais complexos exibiram valores intermediários. O número de sítios de ligação (n) foi aproximadamente 1, sugerindo uma estequiometria de ligação 1:1. Os parâmetros termodinâmicos revelaram valores de energia livre de Gibbs (ΔG) entre $-29,1$ e $-32,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, confirmando a espontaneidade da interação. A entropia (ΔS) aumentou de $85,9 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ para Porf@dppf até $95,7 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ para Porf@dppb, enquanto a entalpia (ΔH) tornou-se menos negativa com o aumento da cadeia ($-14,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Porf@dppf e $-2,33 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Porf@dppb).

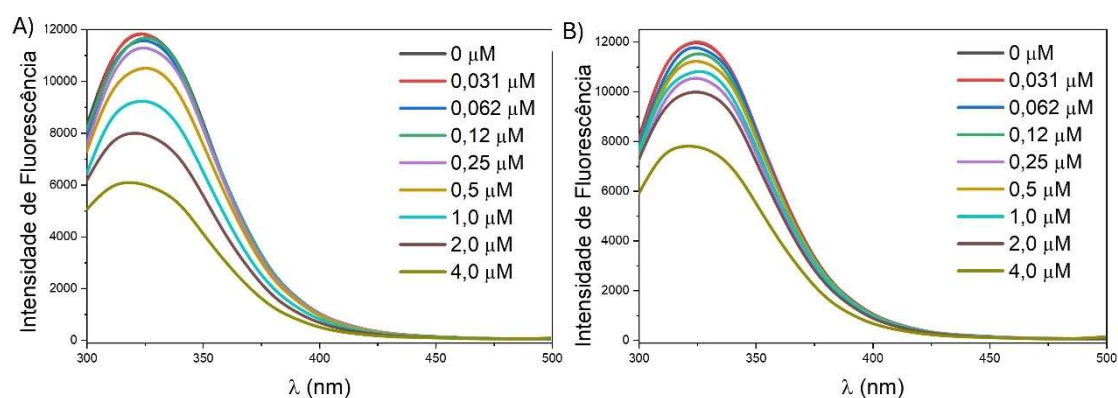


Figura 13: Espectros de fluorescência da solução de BSA ($2,5 \mu\text{M}$) em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ M NaCl}$, $\text{pH } 7,4$) na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos (A) Porf@dppb, (B) Porf@dppf a 298 K.

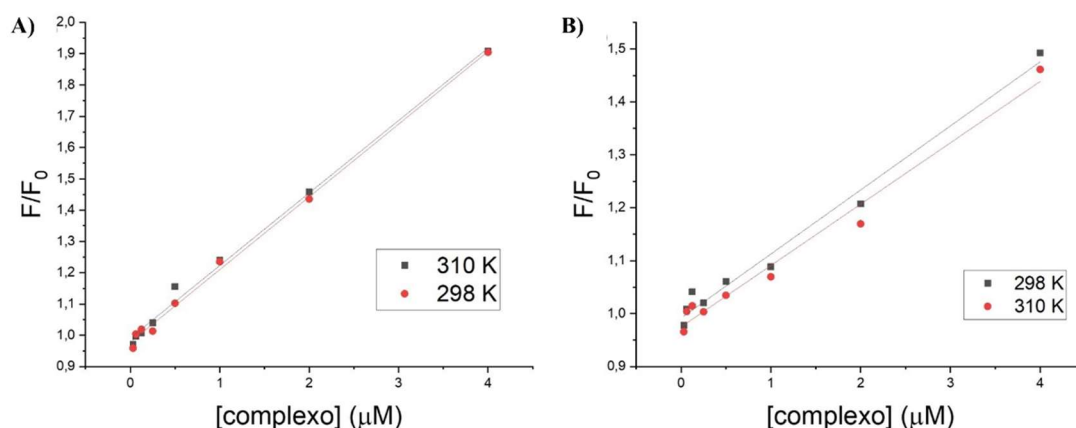


Figura 14: Gráfico de Stern–Volmer para o apagamento da fluorescência da BSA complexo (A) Porf@dppb e (B) Porf@dppf.

Tabela 3: Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (kq), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) para o sistema composto-HSA.

Composto	T (K)	K_{sv} (10^5)	K_q (10^{13})	K_b (10^5)	N	ΔH°	ΔS°	ΔG°
Porf@dppb	298	$2,32 \pm 0,02$	3,74	$2,57 \pm 0,17$	0,94	-2,33	95,7	-30,9
	310	$2,19 \pm 0,10$	3,53	$2,48 \pm 0,30$	0,85		95,7	-32,0
Porf@dppf	298	$1,17 \pm 0,07$	1,89	$1,25 \pm 0,28$	0,97	-3,46	85,9	-29,1
	310	$1,18 \pm 0,03$	1,90	$1,18 \pm 0,41$	0,87		85,9	-30,1

4.3 Discussão

Os elevados e similares valores de Φ_T e Φ_Δ observados para os complexos Porf@dppb, Porf@dppp e Porf@dppe ($\Phi_T \approx 0,72\text{--}0,93$; $\Phi_\Delta \approx 0,62\text{--}0,67$) indicam uma eficiente população do estado tripleto, favorecida pelo efeito de átomo pesado do paládio, bem como uma transferência de energia eficaz para o oxigênio molecular, resultando em elevada produção de oxigênio singleto.

Em contraste, o complexo Porf@dppf, que contém uma unidade ferrocênica, apresentou valores significativamente menores ($\Phi_T \approx 0,46$; $\Phi_\Delta \approx 0,42$). Essa redução acentuada sugere fortemente a ocorrência de um efeito de extinção promovido pelo ferroceno [79]. Isso ocorre porque o ferroceno pode abrir caminhos alternativos de desativação não radiativa, como processos de transferência de elétrons ou transferência de energia, reduzindo a estabilidade do estado excitado [80, 81]. Além disso, o grau dessa supressão depende de fatores estruturais, como o número de unidades ferrocênicas ligadas

e sua proximidade espacial em relação ao cromóforo, sendo mais pronunciada em sistemas com múltiplos substituintes ferrocênicos [80, 81].

Os mecanismos de interação entre Porf@dpf , Porf@dppb e *BSA* forneceram informações importantes sobre o potencial de transporte e biodistribuição desses compostos em sistemas biológicos. Como a albumina é a principal proteína carreadora do plasma, sua interação com fotossensibilizadores influencia diretamente sua biodisponibilidade, estabilidade e eficiência de direcionamento tumoral na *PDT* [81].

A acentuada supressão de fluorescência observado indica a formação de um complexo estável no estado fundamental entre a *BSA* e os fotossensibilizadores, característico de supressão estático. As constantes de taxa de supressão extremamente altas ($k_q \approx 10^{13} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e a ausência de dependência com a temperatura sustentam esse mecanismo, descartando o supressão colisional [82,83]. As constantes de ligação ($K_b \approx 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) indicam afinidade moderada, consistente com uma interação eficaz, porém reversível, propriedade desejável para o transporte eficiente do fármaco e liberação controlada no sítio-alvo [84,85]. A estequiometria de ligação 1:1 sugere que cada molécula do complexo interage com um único sítio de alta afinidade na *BSA* [21,86].

Os parâmetros termodinâmicos revelaram valores negativos de energia livre de Gibbs (ΔG), confirmando a espontaneidade do processo de ligação. Os valores positivos de entropia (ΔS) e levemente negativos de entalpia (ΔH) indicam que interações eletrostáticas estabilizam predominantemente o complexo, com contribuições menores de forças hidrofóbicas [87].

Capítulo 5

Atividade fotodinâmica em modelo 2D de câncer de pele tipo melanoma

5.1 Avaliação citotóxica

Primeiramente, a citotoxicidade *in vitro* das metaloporfirinas de paládio(II) e de seus respectivos precursores foi avaliada nas linhagens celulares A375 (melanoma humano), B16-F10 (melanoma murino) e HacaT (queratinócitos não tumorais) na ausência da luz, conforme descrito na seção 3.3.2.2. As curvas de viabilidade estão apresentadas na Figura 15, e os valores correspondentes de IC_{50} estão resumidos na Tabela 5.

Considerando os precursores de paládio, apenas $PdCl_2(dppf)$ exibiu citotoxicidade significativa, com valores de IC_{50} variando de 3,1 a 6,3 μM . Em contraste, $PdCl_2(dppe)$, $PdCl_2(dppp)$ e $PdCl_2(dppb)$ não apresentaram citotoxicidade na concentração máxima testada ($IC_{50} > 50 \mu M$).

Entre os complexos metaloporfirínicos, $Porf@dppf$ apresentou a maior citotoxicidade, com valores de IC_{50} de $0,9 \pm 0,1 \mu M$ e $1,6 \pm 0,1 \mu M$ para as células A375 e B16-F10, respectivamente. Apesar do efeito promissor sobre as células cancerígenas, os resultados obtidos para HacaT (IC_{50} : $0,6 \pm 0,1 \mu M$) revelaram falta de seletividade para esse complexo, com índice de seletividade (IS) inferior a 1, indicando baixa discriminação entre células tumorais e não tumorais. Por outro lado, $Porf@dppb$ apresentou a menor citotoxicidade, com valores de IC_{50} de $8,5 \pm 0,6 \mu M$ (HacaT), $5,1 \pm 0,3 \mu M$ (A375) e $8,4 \pm 1,1 \mu M$ (B16-F10), exibindo valores de IS ligeiramente mais altos (1,6 e 1,0).

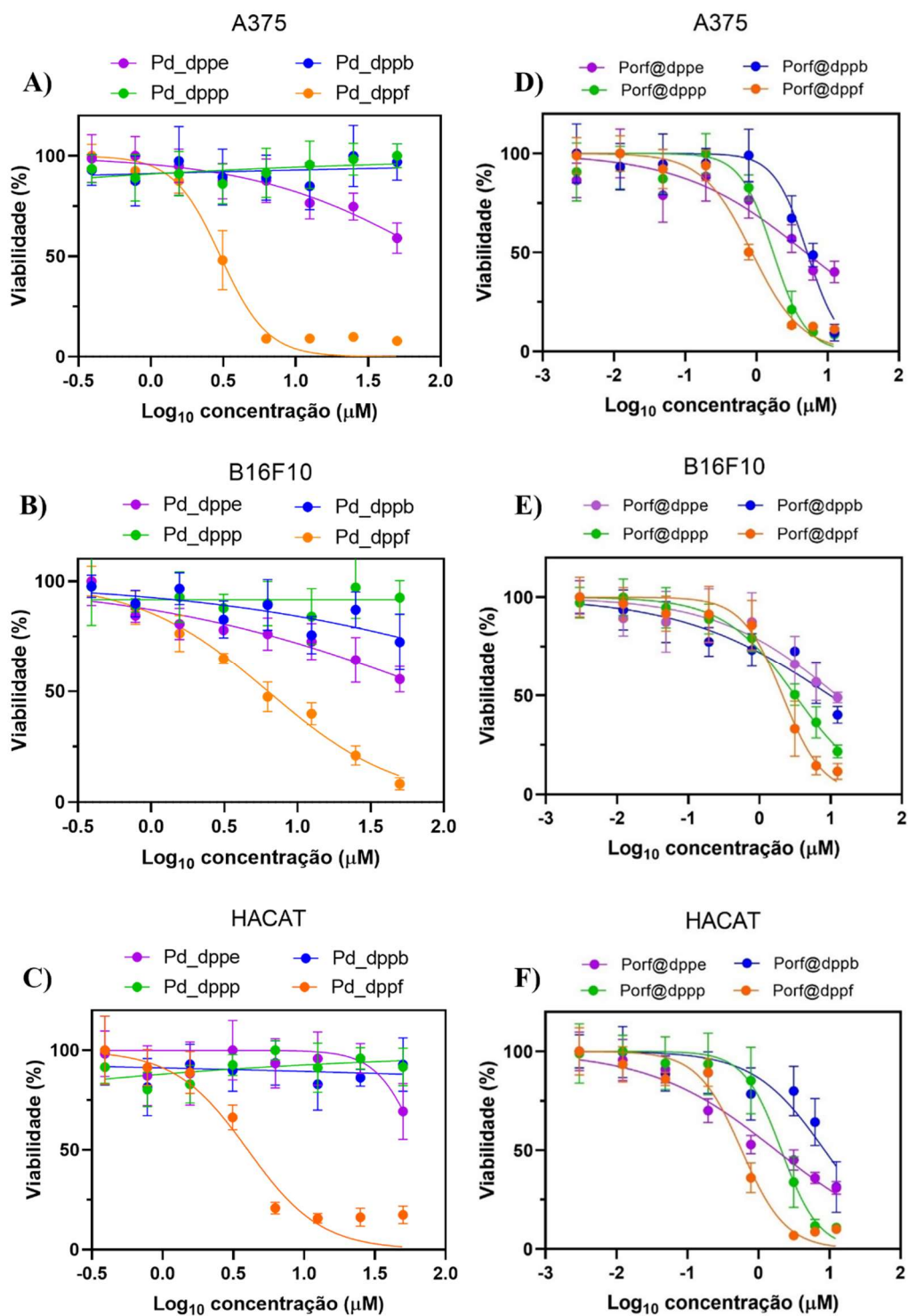


Figura 15: Viabilidade celular de (A) A375, (B) B16F10 e (C) Hacat tratadas com os precursores na ausência de luz. Viabilidade celular de (D) A375, (E) B16F10 e (F) HACAT complexos porfirínicos na ausência de luz.

Tabela 4: Valores de IC_{50} (μM) obtidos para os complexos precursores de paládio e seus complexos porfirínicos na ausência da luz. Os índices de seletividade ($IS1 = Hacat/A375$; $IS2 = Hacat/B16F10$) foram calculados a partir dos valores de IC_{50} correspondentes.

Composto	IC_{50} (μM)				
	Hacat	A375	B16F10	IS1	IS2
Pd_dppf	4,2 +0,2	3,1+0,3	6,3+0,6	1,3	0,7
Pd_dppp	>50	>50	>50	-	-
Pd_dppe	>50	>50	>50	-	-
Pd_dppb	>50	>50	>50	-	-
Porf@dppf	0,6+0,1	0,9+0,1	1,6+0,1	0,7	0,4
Porf@dppp	2,2+0,3	1,8+0,1	3,2 + 0,3	1,2	0,7
Porf@dppe	1,7+0,1	4,3+0,6	8,6+0,9	0,4	0,2
Porf@dppb	8,5+0,6	5,1+0,3	8,4+1,1	1,6	1,0

5.2 Avaliação fototóxica dos complexos

Em seguida, investigou-se a citotoxicidade dos compostos porfirínicos sob irradiação, conforme descrito na seção 3.3.2.3. Os resultados mostraram que todos os complexos apresentaram redução significativa nos valores de IC_{50} após a exposição à luz, variando de 1 a 27 nM, alcançando, portanto, a faixa nanomolar em todas as linhagens celulares (Tabela 6). As curvas de viabilidade correspondentes estão apresentadas na Figura 16.

O índice de fototoxicidade (IF) foi calculado como a razão $IC_{50}^{dark}/IC_{50}^{light}$, obtida para a mesma linhagem celular. O IF indica a potência de um fotofármaco em relação à sua toxicidade intrínseca no escuro. Na linhagem B16-F10, o complexo Porf@dppb apresentou um valor excepcionalmente alto ($IF = 8400,0$). Por outro lado, na linhagem tumoral A375, o maior valor de PI foi observado para o complexo Porf@dppp, com $IF = 330,7$.

Embora os ensaios iniciais de citotoxicidade e fototoxicidade tenham sido realizados em três linhagens celulares (A375, B16-F10 e Hacat), os experimentos mais detalhados, incluindo geração de ROS, migração, clonogenicidade, morfologia e interação com BSA, foram conduzidos exclusivamente em células de melanoma humano

A375, com os complexos Porf@dppb e Porf@dppf, que apresentaram seletividade e citotoxicidade promissoras. A escolha da linhagem A375 foi baseada na relevância translacional como modelo de melanoma humano.

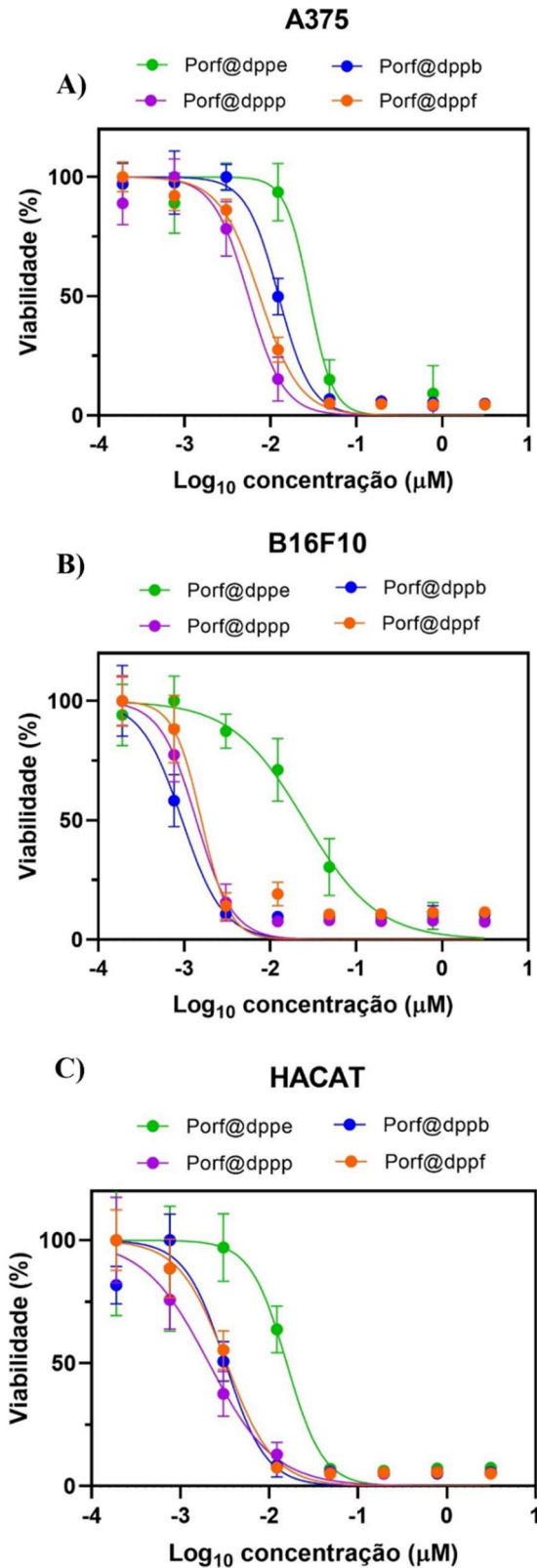


Figura 16: Viabilidade celular de (A) A375, (B) B16F10 e (C) Hacat tratadas com complexos porfirínicos na presença de luz.

Tabela 5: Valores de IC_{50} (μM) obtidos para os complexos porfirínicos na presença da luz. IF1 refere-se às células Hacat, IF2 às células A375, e IF3 às células B16-F10.

Composto	Dose de luz 2 J/cm ²					
	IC50 (nM)					
	Hacat	A375	B16F10	IF 1	IF 2	IF 3
Porf@dppf	3,3 ± 0,2	7,4 ± 0,9	5,0 ± 0,4	181,8	121,6	320
Porf@dpppe	15,0 ± 3,0	13,0 ± 2,0	25,0 ± 4,0	113,3	330,7	344,0
Porf@dppp	2,1 ± 0,1	5,5 ± 0,7	1,4 ± 0,3	1047,6	327,3	2285,7
Porf@dppb	3,2 ± 0,2	27,0 ± 4,0	1,0 ± 0,2	2656,2	188,9	8400,0

5.3 Mudanças morfológicas

Após os estudos de citotoxicidade, a morfologia das células A375 foi analisada na ausência e na presença das metaloporfirinas Porf@dppb e Porf@dppf. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul), enquanto o iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*) (vermelho) foi utilizado para identificar perda de integridade de membrana associada à morte celular (detalhes na seção 3.3.2.4).

No grupo controle, composto apenas por células não tratadas, as células A375 exibiram morfologia típica, formando uma monocamada confluenta com células bem aderidas, núcleos condensados corados com *Hoechst* e baixa intensidade de fluorescência do corante *PI*, confirmando alta viabilidade celular e integridade preservada da membrana plasmática (Figura 17).

Na concentração de IC_{50} sob irradiação luminosa, ambos os complexos induziram alterações morfológicas evidentes após 48 h, incluindo redução da confluência, presença de células arredondadas, perda de adesão e sinais de inchaço celular. A coloração com Hoechst revelou núcleos fragmentados, enquanto a intensidade de fluorescência do *PI* indicou danos à membrana em parte da população celular (Figura 16).

Na concentração de $2 \times IC_{50}$, esses efeitos foram ainda mais intensificados. As imagens em campo claro mostraram colapso quase completo da monocamada, com pequenos fragmentos celulares apoptóticos. A análise nuclear revelou predomínio de núcleos fragmentados, e a intensidade de fluorescência de *PI* aumentou significativamente, indicando perda generalizada da viabilidade celular (Figura 17).

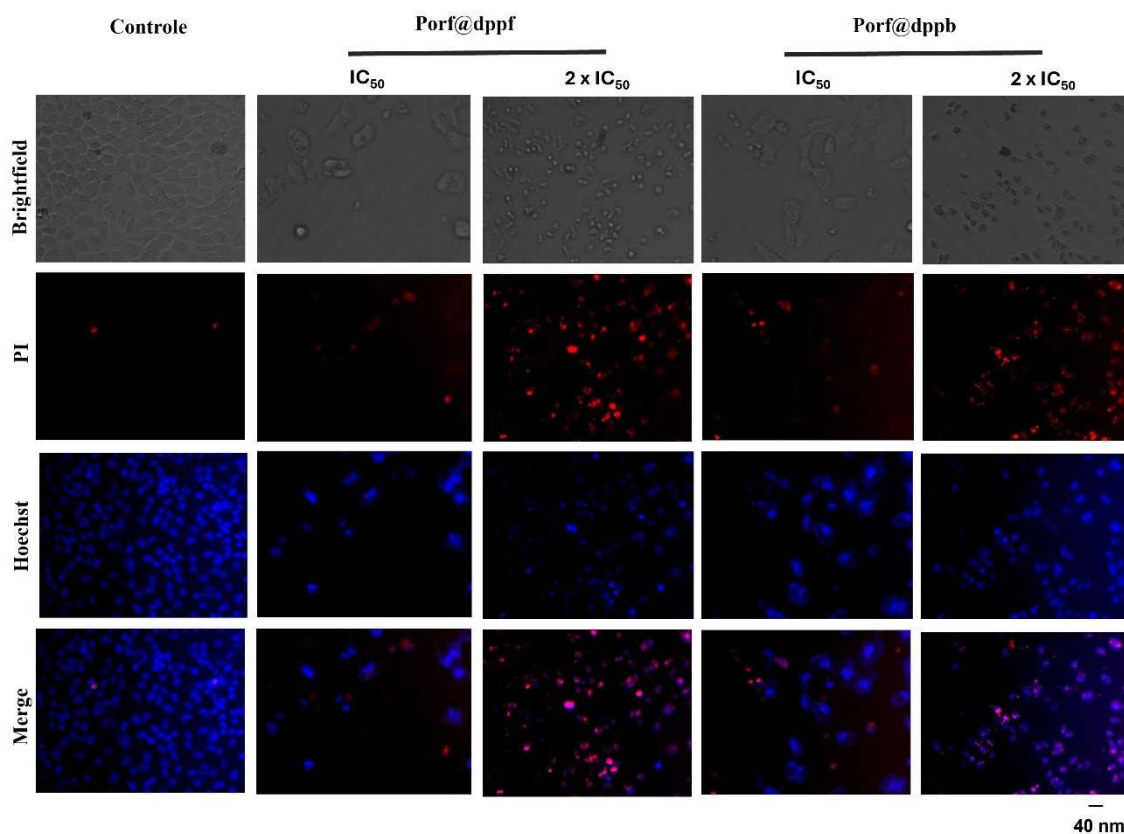


Figura 17: Análise morfológica de células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm²). Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul), enquanto o iodeto de propídio (PI) (vermelho) foi utilizado para identificar perda de integridade de membrana associada à morte celular.

5.4 Resposta Clonogênica

As propriedades antiproliferativas dos complexos Porf@dppb e Porf@dppf foram investigadas em células A375 por meio do ensaio clonogênico. Esse experimento permite determinar a capacidade de uma única célula formar colônias (detalhes na seção 3.3.2.5).

A Figura 18 apresenta a avaliação do efeito fotodinâmico dos complexos Porf@dppf e Porf@dppb sobre a capacidade clonogênica das células de melanoma humano A375. As imagens representativas mostradas no painel superior ilustram a distribuição e a densidade das colônias formadas após o tratamento, evidenciando que o grupo controle apresentou colônias maiores e mais compactas, refletindo elevada capacidade proliferativa. Em contraste, as células tratadas com os complexos na concentração correspondente ao IC₅₀ exibiram colônias visivelmente menores e mais dispersas, indicando comprometimento da sobrevivência clonogênica após a irradiação.

O painel inferior apresenta a quantificação da área normalizada das colônias (%) em função da concentração dos complexos ($1/2 IC_{50}$, IC_{50} e $2 \times IC_{50}$). Observa-se que ambos os complexos promoveram uma redução significativa e dependente da concentração da área das colônias quando comparados ao controle, confirmando o efeito fotodinâmico sobre a capacidade proliferativa celular. A redução foi mais pronunciada nas concentrações correspondentes a IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. Além disso, o complexo Porf@dppf apresentou valores consistentemente menores de área clonogênica em comparação ao Porf@dppb, indicando uma maior inibição da capacidade proliferativa.

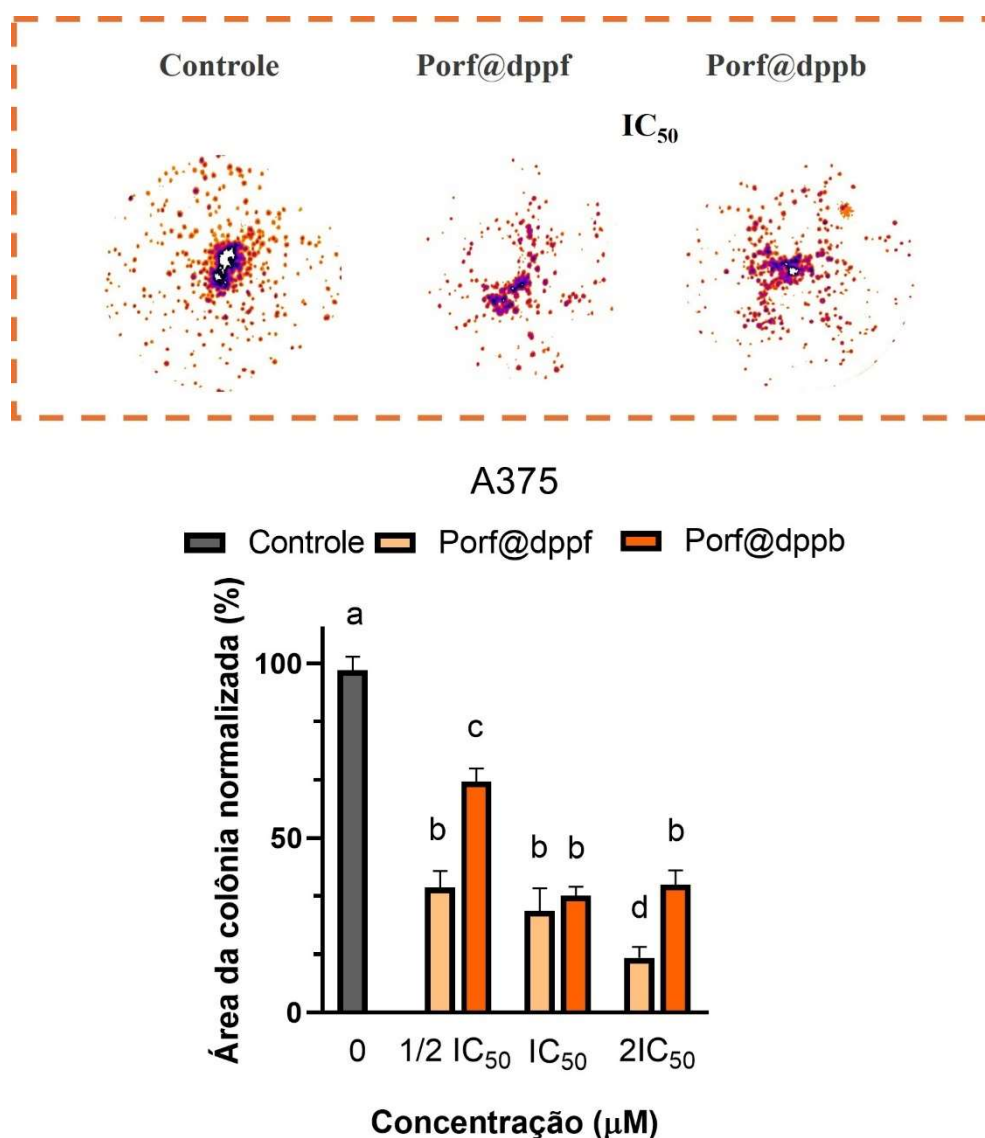


Figura 18: Análise do ensaio clonogênico em células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de $1,8 J/cm^2$). (a) Imagens representativas das colônias clonogênicas formadas após a PDT com os fotossensibilizadores testados. (b) Análise quantitativa da eficiência de formação de

colônias em relação ao grupo controle (não irradiado). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

5.5 Inibição da Migração

A migração celular é uma etapa fundamental envolvida no processo de metástase do câncer. Nesse contexto, investigou-se o efeito dos complexos Porf@dppb e Porf@dppf sobre o processo migratório das células A375 ao longo de 24 h. Para isso, foi realizado um ensaio de cicatrização (“*wound healing assay*”), na ausência e na presença das metaloporfirinas, sob irradiação luminosa (detalhes na seção 3.3.2.6).

A Figura 19 apresenta a avaliação do efeito fotodinâmico dos complexos Porf@dppf e Porf@dppb sobre a migração celular por meio do ensaio de *wound healing*. O painel (a) mostra imagens representativas das áreas de ferida imediatamente após o risco e após o período de incubação, para o grupo controle e para as células tratadas com os complexos nas concentrações correspondentes a $1/8 IC_{50}$ e $1/2 IC_{50}$, após irradiação luminosa. Observa-se que, no grupo controle, ocorre um fechamento da ferida, indicando elevada capacidade migratória das células. Em contraste, os grupos tratados exibem uma redução visível na migração celular, evidenciada pela maior área remanescente da ferida.

Os painéis (b) e (c) na Figura 19 apresentam a quantificação do percentual de fechamento da ferida para os tratamentos com Porf@dppf e Porf@dppb, respectivamente. Ambos os complexos promoveram uma inibição da migração celular após a irradiação, de forma dependente da concentração. O efeito inibitório foi mais pronunciado para o complexo Porf@dppf, que apresentou, na concentração correspondente a $1/2 IC_{50}$, um percentual de fechamento da ferida de aproximadamente 18%, enquanto o complexo Porf@dppb apresentou cerca de 28%. Em comparação, o grupo controle exibiu um fechamento da ferida em torno de 76%, confirmando a elevada eficácia fotodinâmica dos complexos na inibição da migração celular.

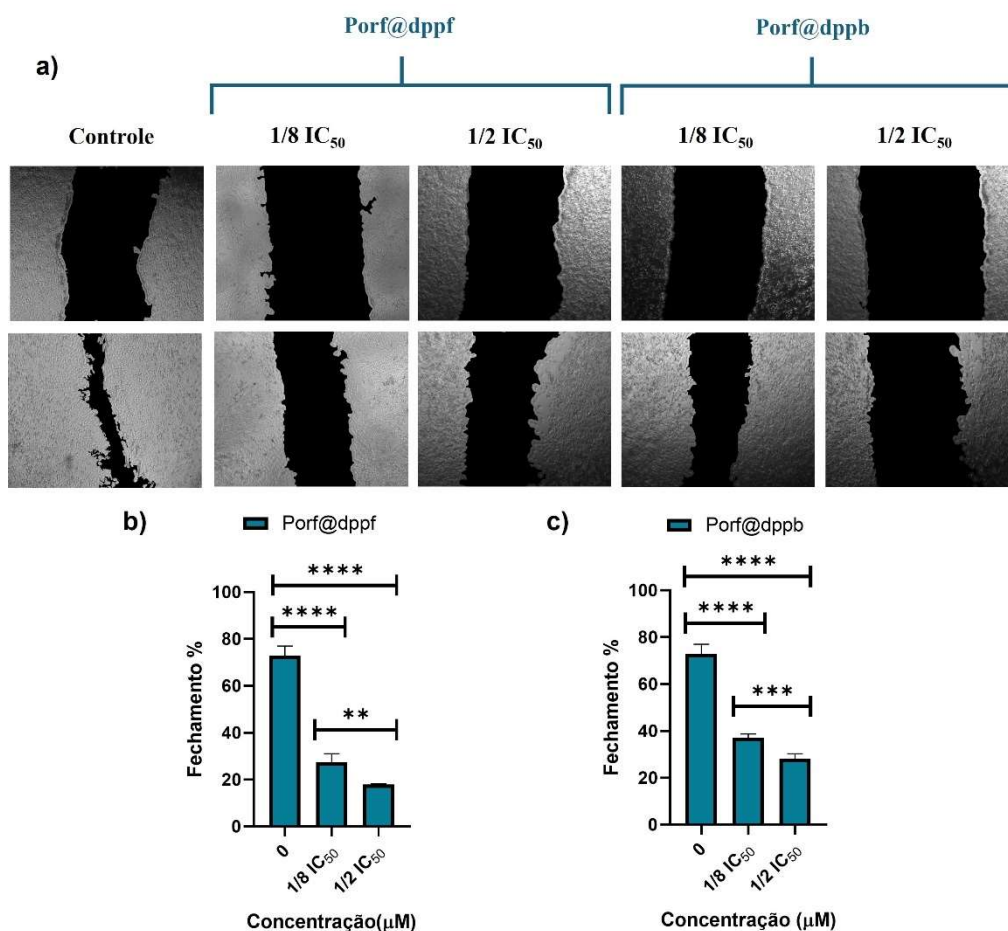


Figura 19: Ensaio de migração de células de melanoma A375 tratadas com Porf@dppf e Porf@dppb após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm²). (a) Imagens representativas do ensaio de cicatrização (“wound healing”), mostrando a migração celular para a área do risco 24 h após o tratamento. (b) Análise quantitativa do fechamento da ferida (%) para células tratadas com Porf@dppf. (c) Análise quantitativa do fechamento da ferida (%) para células tratadas com Porf@dppb. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. ns = não significativo ($p > 0,05$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

5.6 Análise da Geração de ROS

A produção intracelular de ROS foi avaliada para investigar o potencial de ativação fotodinâmica dos fotossensibilizadores. Esse experimento mede o estresse oxidativo gerado dentro das células após a irradiação luminosa, um dos principais mecanismos responsáveis pela eficácia da PDT (detalhes na seção 3.3.2.7).

Nas células de melanoma A375, a produção intracelular de ROS aumentou cerca de 150% em relação ao controle após o tratamento fotodinâmico com os complexos Porf@dppb e Porf@dppf, avaliados em suas respectivas concentrações de IC₅₀. Observou-se que a produção de ROS aumentou de forma dose dependente à concentração dos compostos, sem diferenças relevantes entre eles (Figura 20).

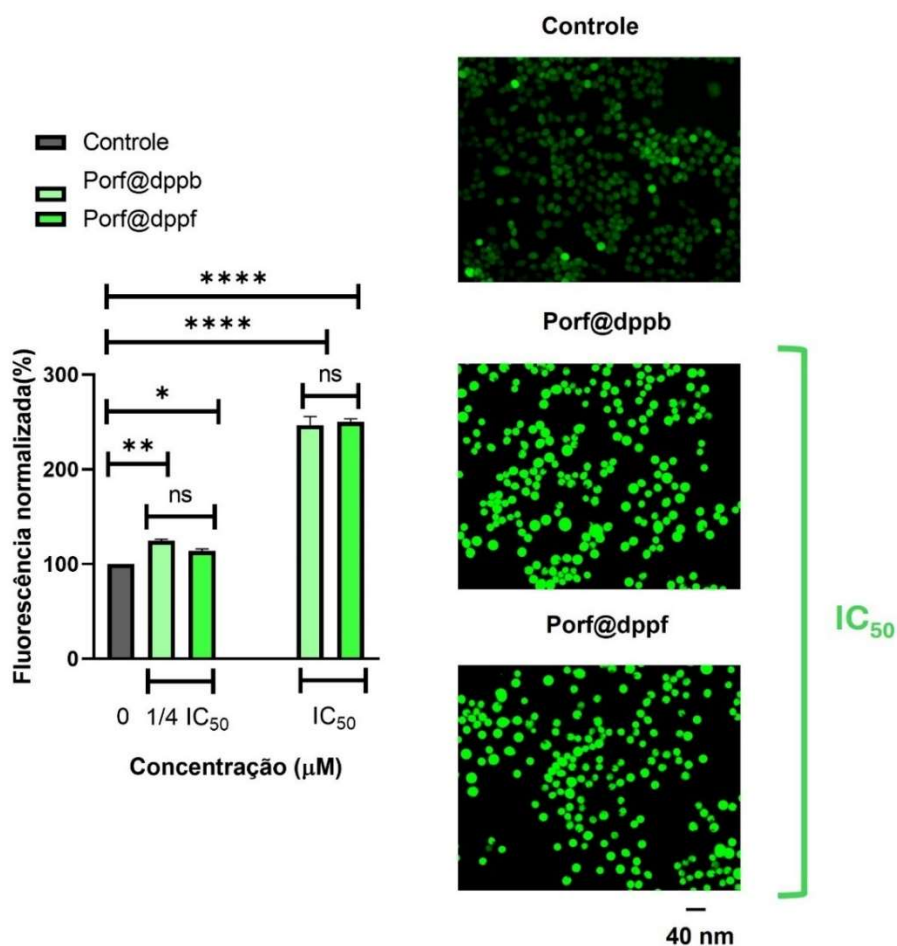


Figura 20: Geração intracelular de ROS em células de melanoma A375 tratadas com os complexos Porf@dppb e Porf@dppf após PDT (LED 415 nm, dose de luz de 1,8 J/cm²). Os níveis de ROS foram detectados utilizando a sonda fluorescente DCFH-DA. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. ns = não significativo ($p > 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.7 Discussão

A complexação da meso-tetra(4-piridil)porfirina (TPyP) com diferentes ligantes periféricos de paládio(II)-fosfina modulou as propriedades biológicas, tanto em termos de citotoxicidade (no escuro) quanto de fototoxicidade sob irradiação (415 nm, 1,8

$\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$). Na ausência de luz, três dos quatro precursores, $\text{PdCl}_2(\text{dppe})$, $\text{PdCl}_2(\text{dppp})$ e $\text{PdCl}_2(\text{dppb})$, apresentaram valores de IC_{50} superiores a $50\ \mu\text{M}$ em todas as linhagens celulares testadas. Em contraste, o precursor $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ exibiu citotoxicidade significativamente maior no escuro, com IC_{50} variando de $4,2$ a $6,3\ \mu\text{M}$.

Essa maior atividade citotóxica pode ser atribuída à presença do grupo ferroceno, cujos íons de ferro podem participar de reações redox intracelulares, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio de reações do tipo Fenton. Esse processo gera radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), espécies altamente reativas e citotóxicas que intensificam o estresse oxidativo e contribuem para a morte celular [88].

Considerando que o melanoma é um câncer cutâneo de localização superficial, utilizou-se uma fonte de luz *LED* de $415\ \text{nm}$ para a irradiação. Esse comprimento de onda é amplamente utilizado em estudos de melanoma devido à sua forte sobreposição com a banda Soret das porfirinas e à sua comprovada eficiência na ativação fotodinâmica sob luz azul. Akasov et al. (2019) [63] demonstraram que a irradiação com luz azul ($\sim 450\ \text{nm}$ e $5\ \text{J}/\text{cm}^2$), na presença de flavina mononucleotídeo, promoveu regressão tumoral significativa ($\sim 85\text{--}90\%$) em um modelo murino de melanoma e reduziu a viabilidade celular ($\text{IC}_{50} = 10\text{--}30\ \mu\text{M}$) em células humanas de melanoma A375, confirmando a efetividade da luz azul mesmo na presença de pigmentação melânica.

Embora a melanina seja frequentemente considerada uma das principais barreiras à Terapia Fotodinâmica, os compostos avaliados neste trabalho foram capazes de induzir potentes efeitos fotodinâmicos na faixa nanomolar. Quando irradiados a $415\ \text{nm}$, todos os complexos exibiram acentuada redução dos valores de IC_{50} ($1\text{--}27\ \text{nM}$), demonstrando sua capacidade de superar limitações ópticas relacionadas à melanina e confirmando sua elevada eficiência na geração de *ROS* e forte potencial fototóxico.

Enquanto isso, sistemas porfirínicos estruturalmente semelhantes recentemente relatados na literatura têm apresentado valores de IC_{50} na faixa micromolar. Martin et al. (2024) [89] reportaram IC_{50} de $0,47 \pm 0,12\ \mu\text{M}$ contra a linhagem B16-F10 sob irradiação a $415\ \text{nm}$ ($4\ \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), atribuídos à liberação combinada de NO e geração de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta} = 0,29$). De modo semelhante, Trentin et al. (2024) [48] investigaram duas porfirinas de paládio(II), 3-PdTPyP e 4-PdTPyP, que exibiram forte fototoxicidade ($\text{IC}_{50} = 0,43\ \mu\text{M}$ para A375 e $0,51\ \mu\text{M}$ para B16-F10) sob irradiação com *LED* ($50\ \text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, $90\ \text{min}$, $270\ \text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Entre os complexos avaliados neste estudo, o $\text{Porf}@\text{dppf}$ apresentou a maior citotoxicidade, consistente com o caráter redox-ativo do ligante ferroceno, enquanto o

Porf@dppb se destacou por sua maior seletividade. O Porf@dppb apresentou o maior índice fototóxico. Um fator relevante que contribui para a fotocitotoxicidade do Porf@dppf é sua maior lipofilicidade conferida pela unidade ferroceno, a qual aumenta a permeabilidade de membranas celulares e a acumulação intracelular do fotossensibilizador [27]. A elevada acumulação em organelas críticas, como mitocôndrias e lisossomos, amplifica o dano oxidativo mesmo sob condições de rendimento quântico reduzido de oxigênio singlete [90].

Embora os compostos avaliados não apresentem índices de seletividade elevados, o que limita seu uso em abordagens sistêmicas, como a administração intravenosa, essa limitação não inviabiliza sua aplicação em *PDT* para o tratamento de melanomas superficiais. Nesses casos, o fotossensibilizador pode ser administrado de forma localizada na região de interesse, e a ativação luminosa é restrita à área irradiada. Como consequência, o dano fotodinâmico ocorre de maneira pontual e espacialmente controlada, resultando predominantemente na destruição do tecido tumoral exposto à luz, com mínima extensão aos tecidos adjacentes.

Análises morfológicas revelaram que células A375 expostas a Porf@dppb e Porf@dppf sofreram alterações apoptóticas características, incluindo perda de adesão, fragmentação nuclear e colapso da monocamada após 48 h. Ensaio de migração (*wound healing*) e clonogenicidade confirmaram que ambos os compostos inibem a migração e a formação de colônias mesmo em baixas concentrações [91].

O aumento da produção de *ROS* sugere que a citotoxicidade está associada a danos mediados por estresse oxidativo. Resultados semelhantes, relatando a ruptura de membranas mitocondriais e acúmulo de *ROS* em células de melanoma expostas a porfirinas de Pd(II) sob luz, já foram descritos por outros autores, reforçando que a desestabilização mitocondrial e o estresse oxidativo são eventos-chave nos mecanismos de morte celular induzida por *PDT* [87].

5.8 Conclusão

A complexação da *meso*-tetra(4-piridil)porfirina (TPyP) com ligantes periféricos de paládio(II)-fosfina modulou significativamente suas propriedades fotodinâmicas. O grupo ferroceno presente em Porf@dppf conferiu maior citotoxicidade e lipofilicidade, favorecendo a captação celular e o dano oxidativo, enquanto o Porf@dppb se destacou por sua seletividade tumoral. Após irradiação, todos os complexos apresentaram forte fototoxicidade (IC_{50} na faixa nanomolar), associada à intensa geração de *ROS*, indução de apoptose, inibição da migração celular e fragmentação de *DNA*.

Capítulo 6

Atividade fotodinâmica em modelo 3D de câncer de pâncreas

Os resultados deste capítulo foram publicados no artigo: CRUZ DE MORAES, Edynara et al. Palladium (II)-Complexed meso-Tetra (4-pyridyl) porphyrin: Photodynamic Efficacy in 3D Pancreatic Cancer Models. ACS omega, v. 10, n. 44, p. 53564-53571, 2025.

6.1 Eficiência de internalização celular

Para comparar a eficiência de internalização celular dos compostos fotossensibilizadores, avaliou-se a captação dos compostos Porf@dppf e Porf@dppb pelas células cancerígenas pancreáticas (MIA PaCa-2), utilizando a intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo (detalhes na seção 3.3.3.7). Conforme ilustrado na Figura 21, a captação do composto Porf@dppf (intensidade de fluorescência de 991,3 ua) foi aproximadamente 136% superior à observada para o composto Porf@dppb (420 ua), indicando uma maior eficiência de internalização do Porf@dppf nessas células.

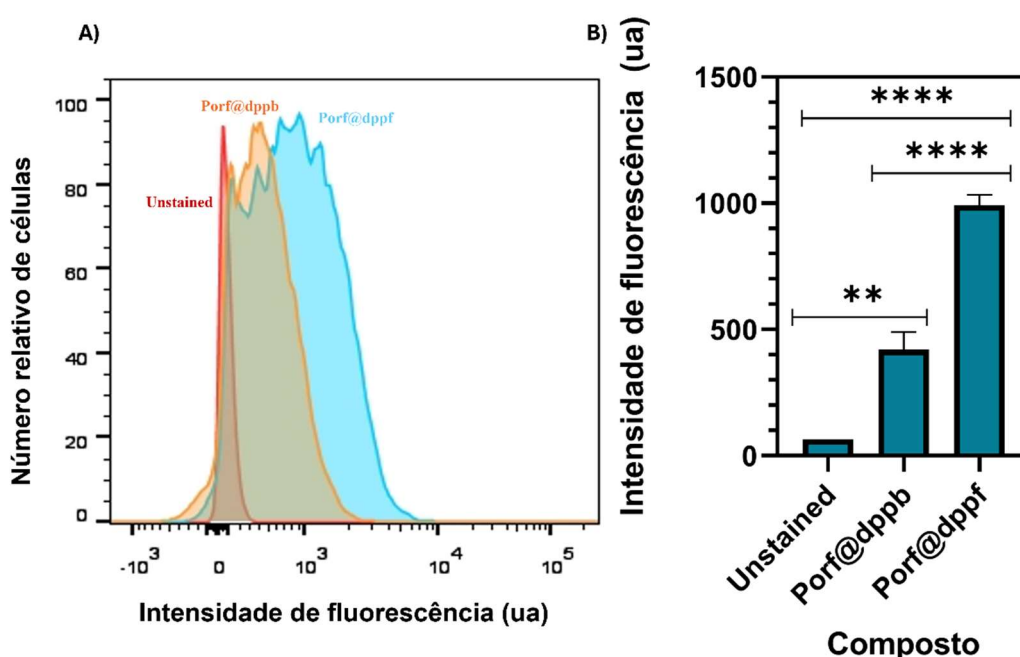


Figura 21: Captação intracelular dos compostos Porf@dppb e Porf@dppf em células MIA PaCa-2 após 90 minutos de incubação no escuro. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

6.2 Eficácia da Terapia Fotodinâmica em modelo tumoral 3D homogêneo

A eficácia da Terapia Fotodinâmica utilizando os compostos Porf@dppf e Porf@dppb foi investigada em um modelo tridimensional homogêneo de esferoides tumorais formados por células MIA PaCa-2 (detalhes na seção 3.3.3.2). Imagens de fluorescência e análises de curva dose-resposta foram realizadas três dias após a exposição à luz, com o objetivo de avaliar os efeitos fototóxicos em diferentes

concentrações dos compostos. As imagens de fluorescência e curvas dose-resposta são apresentadas na Figura 22. Nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade na ausência de luz, confirmando a ausência de toxicidade no escuro nas concentrações testadas. O composto Porf@dppf demonstrou consistentemente efeitos fototóxicos superiores em relação ao Porf@dppb em todas as concentrações testadas. Especificamente, na concentração de 3 μM , o Porf@dppf apresentou um IC_{50} de 1,3 J/cm^2 , aproximadamente 4,4 vezes menor que o IC_{50} de 5,7 J/cm^2 observado para o Porf@dppb (Tabela 7), destacando sua eficácia fotodinâmica superior neste modelo 3D.

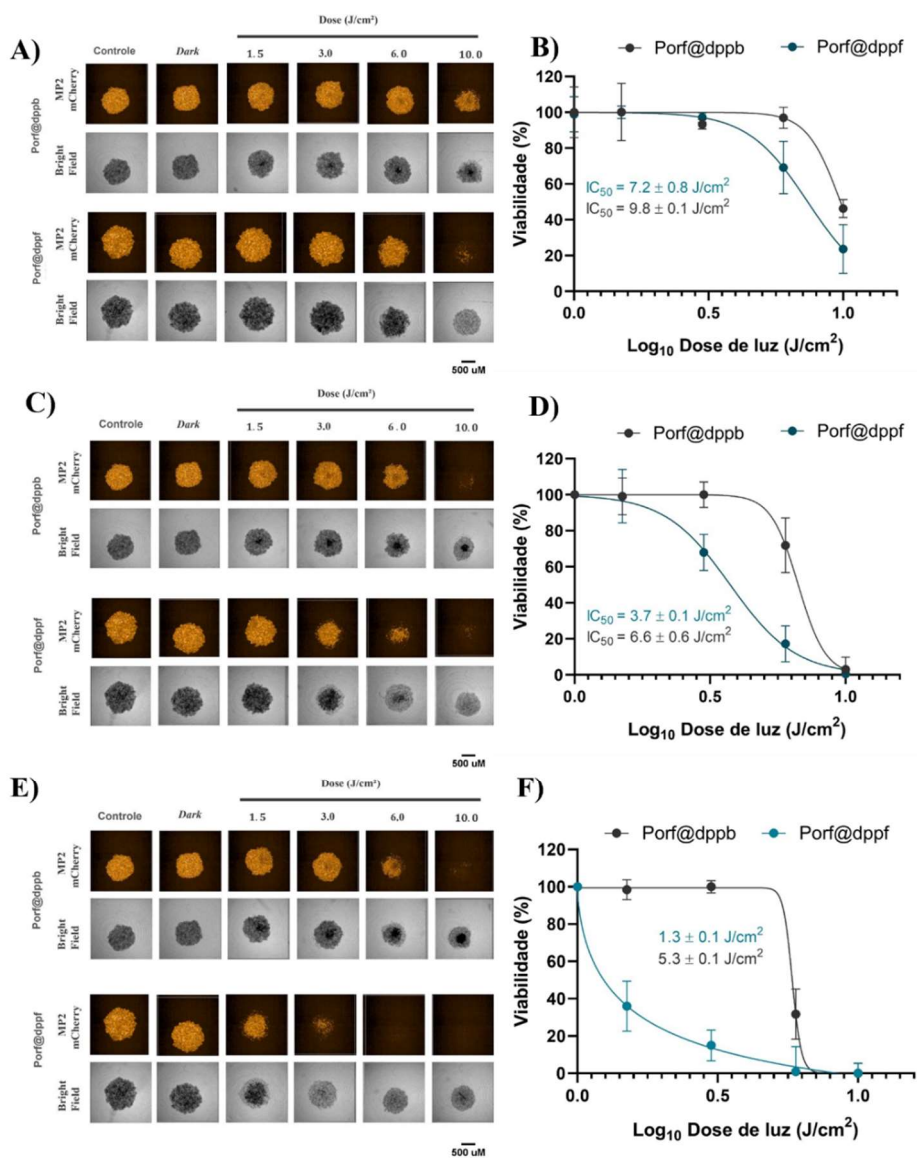


Figura 22: Imagens de fluorescência (mCherry) e curva dose-resposta da PDT de esferoides homogêneos de MIA PaCa-2 tratados com os compostos Porf@dppf e Porf@dppb na concentração de (A e B, respectivamente) 1 μM , (C e D, respectivamente) 2 μM e (E e F,) 3 μM , seguidos de irradiação com diferentes doses de luz (1,5; 3; 6 e 10 J/cm^2). Grupos controle (não tratados) e dark (tratados sem luz) foram incluídos para comparação.

Tabela 6: Valores de IC_{50} (J/cm^2) para os fotossensibilizadores *Porf@dppf* e *Porf@dppb* nas concentrações de 1, 2 e 3 μM em esferoides tumorais 3D compostos por células *mCherry-MIA PaCa-2*.

Compostos	IC_{50} (μM)		
	1 μM	2 μM	3 μM
Porf@dppf	7,2 \pm 0,8	3,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
Porf@dppb	9,8 \pm 0,1	6,6 \pm 0,6	5,7 \pm 0,1

6.3 TFD em Modelo Tumoral 3D Heterogêneo

A fototoxicidade do composto *Porf@dppf* em esferoides heterogêneos foi avaliada por meio de imagens de fluorescência e curvas dose-resposta, três dias após o protocolo de irradiação (detalhes na seção 3.3.3.3). Para a concentração de 1 μM , a imagem de fluorescência está apresentada na Figura 23A e a curva dose-resposta correspondente na Figura 23B. Para 2 μM , a imagem de fluorescência encontra-se na Figura 23C e a respectiva curva na Figura 23D.

Para 3 μM , as análises estão disponíveis na Figura 23E (imagem de fluorescência) e Figura 23F (curva dose-resposta). Nenhum dos compostos causou redução na viabilidade dos esferoides na ausência de luz, confirmando a ausência de citotoxicidade no escuro. Os resultados de IC_{50} apresentados na tabela 8 demonstram que ambos os tipos celulares responderam de forma semelhante ao tratamento, indicando que os fotossensibilizadores induzem danos fotodinâmicos com eficácia comparável tanto nas células de câncer pancreático quanto nos fibroblastos associados ao tumor. Esse efeito é particularmente evidente na concentração de 3 μM , em que os valores de IC_{50} foram de 2,3 J/cm^2 para as células *mCherry MIA PaCa-2* e de 2,6 J/cm^2 para os *EGFP-PCAFs*, respectivamente.

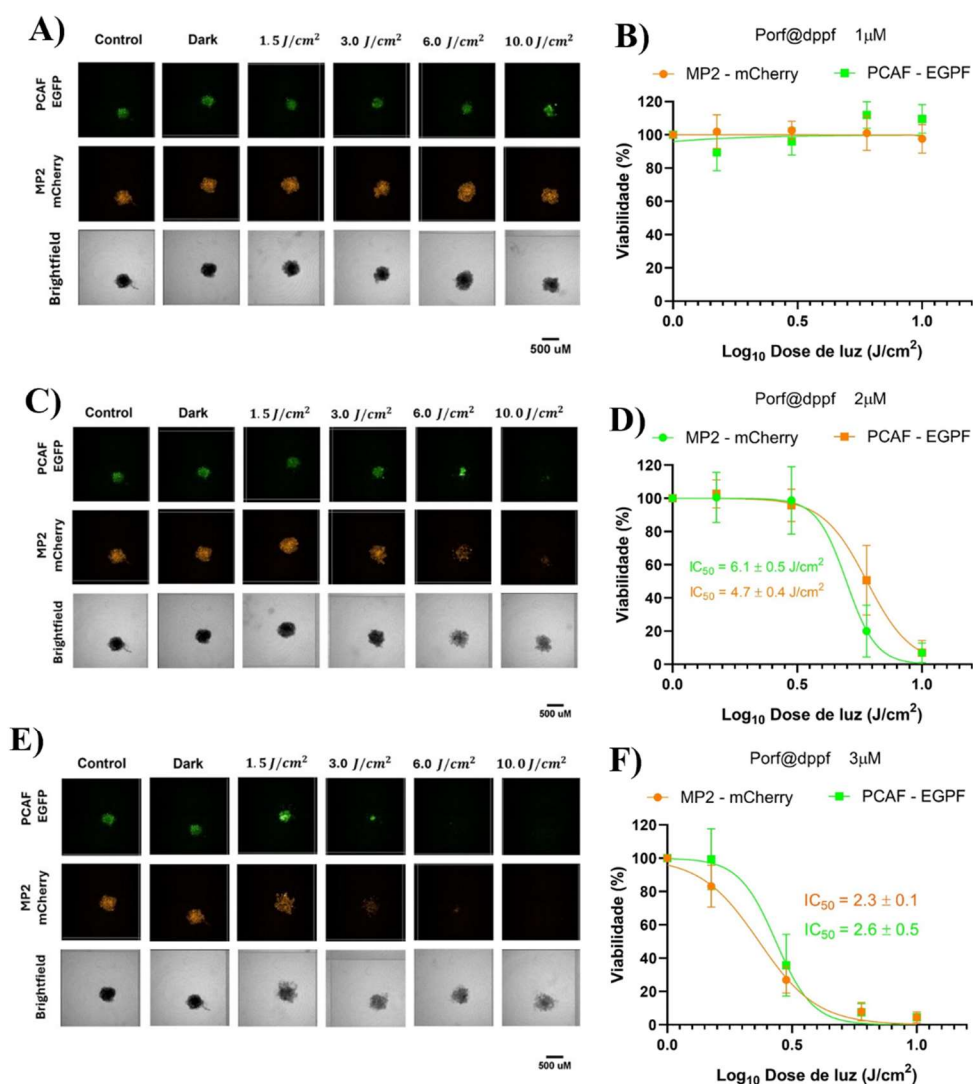


Figura 23: Curva dose-resposta da DPT. Quantificação da intensidade de fluorescência mCherry e EGFP e curva dose resposta em esferoides heterogêneos de MIA PaCa-2 cocultivados com PCAFs e tratados com Porf@dppb e Porf@dppf na concentração de (A e B, respectivamente) 1 μM, (C e D, respectivamente) 2 μM e (E e F, respectivamente) 3 μM após irradiação com doses crescentes de luz (1,5; 3; 6 e 10 J/cm²). Os valores de fluorescência foram normalizados em relação ao grupo dark.

Tabela 7: Valores de IC₅₀ (J/cm²) obtidos para o composto Porf@dppf testado em diferentes concentrações (1, 2 e 3 μM) em esferoides tumorais 3D. A viabilidade foi avaliada em duas linhagens celulares: mCherry-MIA PaCa-2 (adenocarcinoma ductal pancreático humano).

Linhagem	IC ₅₀ (μM)		
	1 μM	2 μM	3 μM
mCherry-MIA PaCa 2	10>	4,7 ± 0,4	2,3 ± 0,1
EGFP-PCAFs	10>	6,1 ± 0,5	2,6 ± 0,5

6.4 Análise Cinética da Geração de ROS Induzida

Para investigar a eficiência fotossensibilizadora e a dinâmica temporal da geração de ROS, avaliamos a resposta dependente da dose e do tempo dos complexos Porf@dppf e Porf@dppb após irradiação com luz (detalhes na seção 3.3.3.6). Essa análise teve como objetivo determinar a estabilidade e a persistência da produção de ROS ao longo do tempo, bem como comparar o desempenho fotodinâmico de ambos os compostos sob diferentes doses de luz.

O composto Porf@dppf apresentou uma resposta dose-dependente e sustentada, com aumento médio na intensidade de fluorescência em relação ao controle de aproximadamente 38%, 77%, 112% e 120% para as doses de 1,5; 3; 6 e 10 J/cm², respectivamente (Figura 24A). Esses valores mantiveram-se estáveis ao longo de 2 horas, indicando uma geração contínua e eficiente de ROS.

Em contraste, o composto Porf@dppb exibiu um perfil de resposta distinto. No tempo inicial (0h), apenas as doses mais elevadas (6 e 10 J/cm²) induziram aumentos significativos na produção de ROS, com incrementos de 47% e 68%, respectivamente, em comparação ao controle (Figura 24B). Esses níveis permaneceram constantes até 1h, com destaque para a dose de 10 J/cm², que atingiu um pico de 154% em relação ao controle. No entanto, após 2 horas, observou-se uma queda acentuada na fluorescência para todas as doses, indicando uma redução na capacidade de geração de ROS. As doses mais baixas (1,5; 3 e 6 J/cm²) passaram a apresentar valores semelhantes ao controle, enquanto a dose de 10 J/cm², embora ainda eficaz (62%), apresentou uma redução significativa em relação ao valor máximo observado (154%).

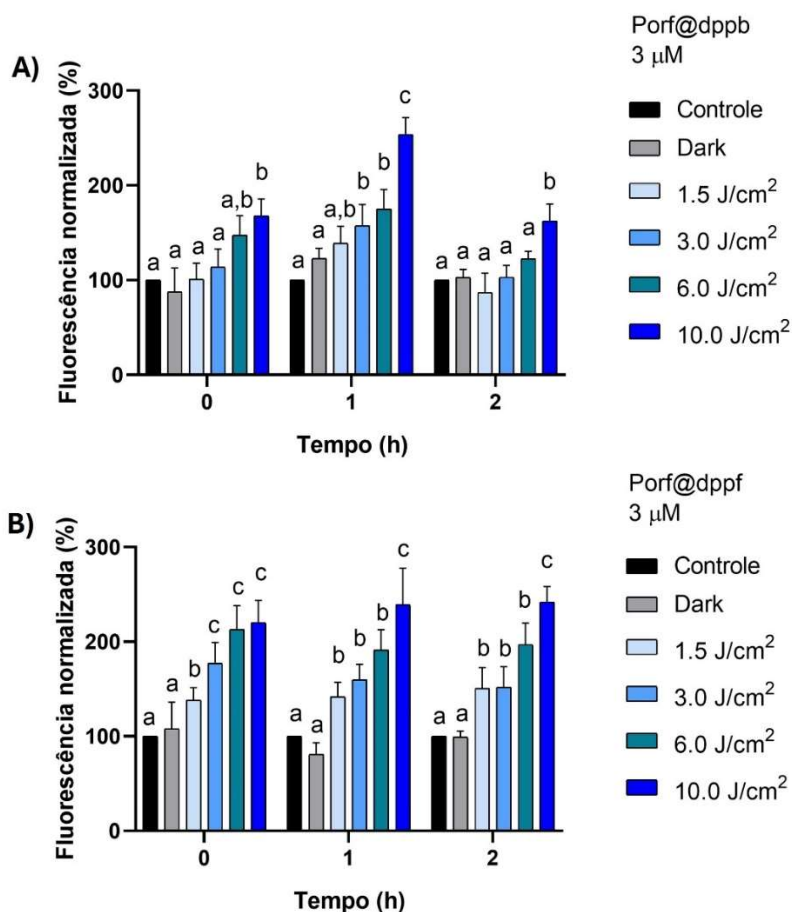


Figura 24: Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelo composto (a) *Porf@dppb* e (b) *Porf@dppf* (3 μM) em células tratadas sob diferentes condições de luz. As células foram expostas a doses de luz de 1,5; 3; 6 e 10 J/cm².

6.5 Imunogenicidade Induzida pela Terapia Fotodinâmica com *Porf@dppf*

O efeito de diferentes doses de luz sobre a exposição de calreticulina em células MIA PaCa-2, como indicador de morte celular imunogênica, foi investigado (detalhes na seção 3.3.3.8). Observou-se um aumento significativo na exposição de calreticulina em resposta à dose de luz (Figura 25A e 25B). A dose de 10 J/cm² resultou em uma intensidade de fluorescência de 5117,3 ua, representando um aumento de aproximadamente 514% em comparação ao controle não irradiado (0 J/cm²; 833 ua). Em contraste, a dose de 1,5 J/cm² (802 ua) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, indicando um efeito dependente da dose.

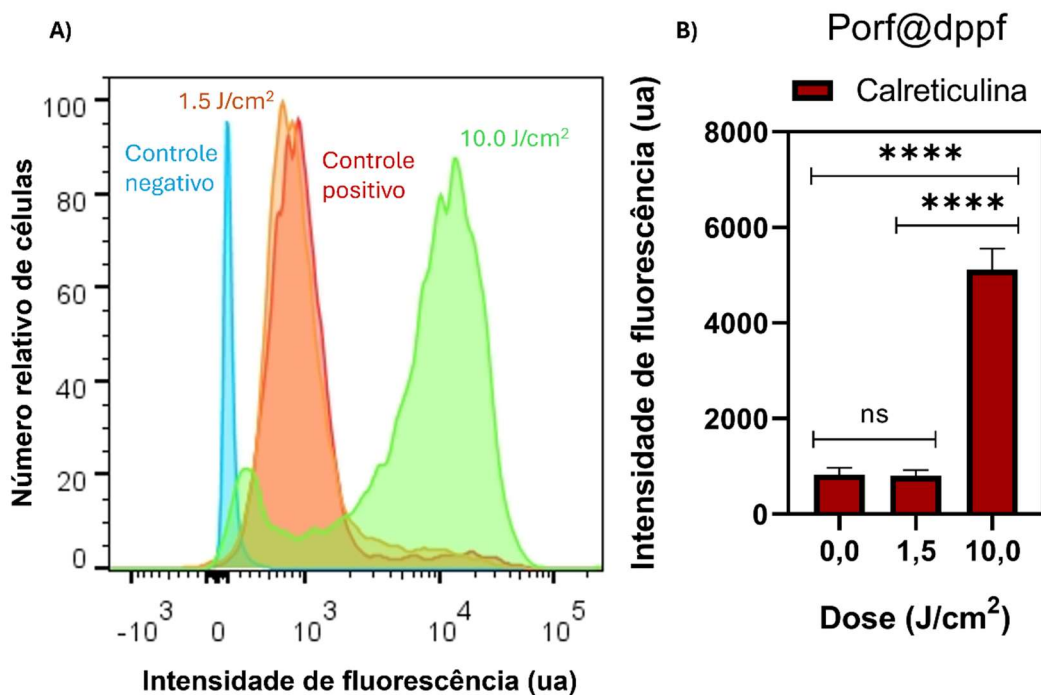


Figura 25: Exposição de calreticulina na superfície celular após tratamento com o composto Porf@dppf (3 μ M) e irradiação com doses crescentes de luz (0, 1,5 e 10 J/cm²). Observa-se uma resposta dependente da dose, com forte sinal de fluorescência na dose.

6.6 Acúmulo Subcelular de Complexos Metálicos: Efeitos em Lisossomos e Mitocôndrias

A análise por microscopia de fluorescência demonstrou que os complexos Porf@dppf e Porf@dppb apresentam padrões distintos de atividade subcelular (Figura 26) (detalhes na seção 3.3.3.9). O marcador lisossomal (*Lysotracker*, verde) revelou uma redução significativa na fluorescência nas células tratadas com ambos os complexos em comparação ao controle, sugerindo baixa retenção lisossomal ou possível comprometimento da integridade desses organelos. Em contraste, a coloração mitocondrial (*Mitotracker*, vermelho) mostrou aumento na intensidade de fluorescência nas células tratadas, especialmente com o complexo Porf@dppf.

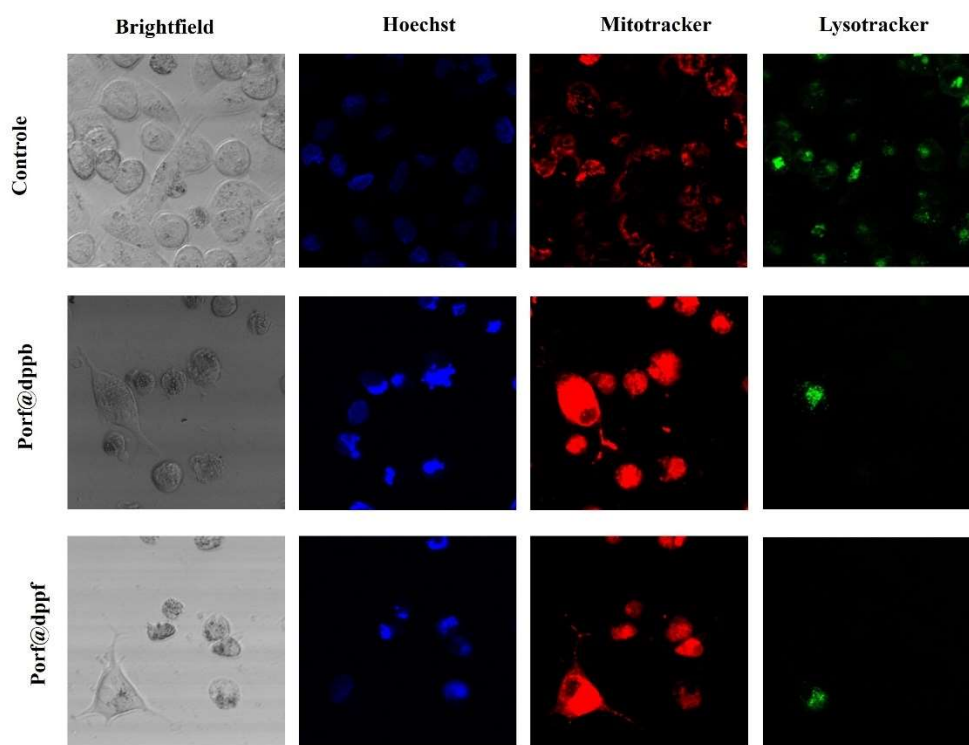


Figura 26: Análise por microscopia de fluorescência da integridade mitocondrial (vermelho), lisossomal (verde) e nuclear (azul) após tratamento com os complexos.

6.7 Discussão

O presente estudo investigou a atividade fotodinâmica de dois novos fotossensibilizadores, Porf@dppb e Porf@dppf, utilizando modelos tridimensionais homogêneos e heterogêneos de *PDAC*. Entre os compostos avaliados, o Porf@dppf demonstrou a maior eficácia fotodinâmica em todas as condições testadas. Um dos principais fatores contribuintes é a presença do grupo ferroceno, que introduz íons de ferro capazes de participar de reações redox intracelulares. Esses íons catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação de Fenton, levando à formação de radicais hidroxila ($\bullet OH$), espécies altamente reativas e citotóxicas que contribuem significativamente para o estresse oxidativo e para a morte celular [88].

Em esferoides homogêneos compostos apenas por células tumorais, o tratamento com Porf@dppf a $1 \mu M$ e $10 J/cm^2$ reduziu a viabilidade celular para aproximadamente 20%. Esse resultado é notavelmente semelhante ao relatado por Saad et al. (2022) [92], que utilizaram fotoimunoterapia com conjugados cetuximabe-BPD e obtiveram níveis comparáveis de citotoxicidade. Vale destacar que o verteporfina é um fotossensibilizador de segunda geração aprovado clinicamente, caracterizado por absorção na região do

vermelho (~690 nm), alto rendimento quântico de oxigênio singlete e rápida depuração. Quando componentes estromais foram introduzidos no sistema 3D, gerando esferoides heterogêneos contendo 90% de *PCAFs*, a eficácia do Porf@dppf tornou-se ainda mais evidente. Em 2 μM e 10 J/cm^2 , o composto induziu erradicação completa dos esferoides. Em comparação, De Silva et al. (2021) [93] relataram ~10–15% de viabilidade residual utilizando um conjugado fotoimunonotecnológico triplo-alvo carregado com verteporfirina, em 1 μM e 100 J/cm^2 , em um modelo contendo 50% de *PCAFs*. Apesar das diferenças em dose de luz, formulação do fármaco e proporção estromal, nossos resultados destacam que um fotossensibilizador não direcionado pode alcançar eficácia comparável, ou até superior, mesmo em cenários altamente desmoplásicos

Outro aspecto crucial observado foi a maior captação intracelular do Porf@dppf, possivelmente como consequência de sua maior lipofilicidade, a qual facilita a difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana plasmática. Esse comportamento pode estar relacionado à presença da unidade ferrocênica no ligante difosfínico, que confere propriedades de capazes de mimetizar, ao menos parcialmente, interações do ferro com biomoléculas. Essa característica pode ser particularmente relevante no contexto tumoral, uma vez que células cancerígenas apresentam uma demanda aumentada por ferro em comparação às células normais, frequentemente associada à superexpressão de receptores de transferrina, a proteína transportadora desse metal no plasma [94].

A análise cinética da geração de *ROS* revelou perfis fotoreativos distintos para os complexos Porf@dppf e Porf@dppb após a irradiação. O Porf@dppf exibiu uma produção de *ROS* sustentada e dependente da dose, com intensidades de fluorescência aumentando progressivamente com a dose de luz e permanecendo estáveis por um período de 2 horas. Por outro lado, o ligante difenilfosfinobutano (dppb), embora possivelmente contribuindo para a formação inicial de *ROS*, pode não sustentar a liberação prolongada de *ROS* sob exposição luminosa estendida, possivelmente devido à degradação do ligante ou à redução do tempo de vida do estado tripleto.

Nossos resultados utilizando os marcadores *MitoTracker Red* e *LysoTracker* confirmam ainda que a *PDT* induz danos as organelas celulares essenciais. O aumento acentuado da fluorescência mitocondrial após o tratamento indica perda significativa do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), refletindo disfunção mitocondrial grave característica da via intrínseca de apoptose. Simultaneamente, a diminuição da fluorescência lisossomal indica que os lisossomos foram danificados, permitindo que enzimas digestivas escapem para o citoplasma, contribuindo para processos de morte

celular. A membrana lisossomal contribui não apenas para a morte celular necrótica, mas também pode induzir respostas inflamatórias, mecanismo particularmente relevante em terapias que visam estimular a imunidade antitumoral [95–97].

A calreticulina atua como um *DAMP*, funcionando como um sinal de ‘me reconheça e me elimine’ para células apresentadoras de antígeno, promovendo o recrutamento e ativação de células dendríticas, seguido pela ativação de linfócitos T [98]. De acordo com a literatura, a liberação de *DAMPS* como a calreticulina pode induzir um efeito imunomodulador relevante ao promover a conversão de um microambiente tumoral imunologicamente ‘frio’, caracterizado por baixa imunogenicidade, em um microambiente ‘quente’, mais permissivo à infiltração e ativação de células imunológicas [99]. Esse fenômeno é particularmente importante em tumores como o *PDAC*, conhecidos por sua evasão imunológica.

Além disso, estudos demonstraram que o ferro pode influenciar a polarização de macrófagos, favorecendo o fenótipo pró-inflamatório M1, o qual promove um ambiente tumoral mais favorável à ativação de respostas imunes antitumorais [99]. Embora a exposição de calreticulina seja um marcador clássico de imunogenicidade, a indução de morte celular imunogênica por fotossensibilizadores de segunda geração tem apresentado eficácia limitada em modelos tumorais desmoplásicos, incluindo *PDAC*. Essa limitação decorre da baixa penetração tecidual e da incapacidade de sustentar níveis robustos de *ROS* necessários para acionar respostas adaptativas eficazes [95–97].

Nesse contexto, a observação de exposição de calreticulina após o tratamento com Porf@dppf sugere que esse composto oferece vantagens claras em relação aos fotossensibilizadores convencionais. Essa característica posiciona o Porf@dppf mais próximo do perfil dos ‘fotossensibilizadores de próxima geração’, nos quais a capacidade de estimular respostas imunológicas antitumorais é considerada altamente desejável, especialmente para tumores de difícil tratamento, como o *PDAC*.

6.8 Conclusão

Este estudo destaca o promissor potencial do complexo Porf@dppf como um fotossensibilizador eficaz para a Terapia Fotodinâmica contra o *PDAC*. Graças a uma combinação de propriedades físico-químicas favoráveis, especialmente a presença do grupo ferroceno e o aumento da lipofilicidade, o Porf@dppf apresentou maior captação celular, geração de *ROS* sustentada e dependente da dose e acentuada capacidade de desestabilizar mitocôndrias e lisossomos em modelos tridimensionais tumorais homogêneos e heterogêneos. Esses efeitos resultaram em significativa indução de apoptose e em sinais de morte celular imunogênica, incluindo exposição de calreticulina e danos a organelas essenciais.

Perspectivas futuras

Os achados deste trabalho indicam que estudos futuros deverão avançar para modelos *in vivo* murinos, tanto para melanoma quanto para câncer de pâncreas, com o objetivo de avaliar de forma mais realista a eficácia terapêutica dos complexos porfirínicos. No melanoma, o uso de modelos animais permitirá investigar com maior profundidade a influência da melanina na resposta fotodinâmica. Já no câncer de pâncreas, a transição para sistemas *in vivo* será essencial para compreender a capacidade da terapia em modular o microambiente tumoral, incluindo matriz extracelular, inflamação e resposta celular ao estresse oxidativo.

Referencias

- [1] M. Siddhartha, *O imperador de todos os males: uma biografia do câncer*, Companhia das Letras, 2012.
- [2] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA)., *O que é câncer*, (2025). <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, *Cell* 100 (2000) 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, *Cell* 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [5] D. Hanahan, *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*, *Cancer Discovery* 12 (2022) 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [6] A. Zafar, S. Khatoun, M.J. Khan, J. Abu, A. Naeem, *Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy*, *Discov Onc* 16 (2025) 607. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-02198-8>.
- [7] A. Fateeva, K. Eddy, S. Chen, *Current State of Melanoma Therapy and Next Steps: Battling Therapeutic Resistance*, *Cancers* 16 (2024) 1571. <https://doi.org/10.3390/cancers16081571>.
- [8] L.E. Davis, S.C. Shalin, A.J. Tackett, *Current state of melanoma diagnosis and treatment*, *Cancer Biology & Therapy* 20 (2019) 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>.
- [9] C.J. Halbrook, C.A. Lyssiottis, M. Pasca Di Magliano, A. Maitra, *Pancreatic cancer: Advances and challenges*, *Cell* 186 (2023) 1729–1754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>.
- [10] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, *5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- [11] E. Raymond, S.G. Chaney, A. Taamma, E. Cvitkovic, *Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies*, *Annals of Oncology* 9 (1998) 1053–1071. <https://doi.org/10.1023/A:1008213732429>.
- [12] T.J. Kinsella, Y. Seo, J. Willis, T.A. Stellato, C.T. Siegel, D. Harpp, J.K. Willson, J. Gibbons, J.R. Sanabria, J.M. Hardacre, J.P. Schulak, *The Impact of Resection Margin Status and Postoperative CA19-9 Levels on Survival and Patterns of Recurrence After Postoperative High-Dose Radiotherapy With 5-FU—Based*

- Concurrent Chemotherapy for Resectable Pancreatic Cancer, *American Journal of Clinical Oncology* 31 (2008) 446–453. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e318168f6c4>.
- [13] F. Zhou, J. Yang, Y. Zhang, M. Liu, M.L. Lang, M. Li, W.R. Chen, Local Phototherapy Synergizes with Immunoadjuvant for Treatment of Pancreatic Cancer through Induced Immunogenic Tumor Vaccine, *Clinical Cancer Research* 24 (2018) 5335–5346. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1126>.
- [14] G. Obaid, S. Bano, S. Mallidi, M. Broekgaarden, J. Kuriakose, Z. Silber, A.-L. Bulin, Y. Wang, Z. Mai, W. Jin, D. Simeone, T. Hasan, Impacting Pancreatic Cancer Therapy in Heterotypic *in Vitro* Organoids and *in Vivo* Tumors with Specificity-Tuned, NIR-Activable Photoimmunonanoconjugates: Towards Conquering Desmoplasia?, *Nano Lett.* 19 (2019) 7573–7587. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00859>.
- [15] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61–R109. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>.
- [16] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects, *Lasers Med Sci* 24 (2009) 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- [17] T.E. Kim, J.-E. Chang, Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials, *Pharmaceutics* 15 (2023) 2257. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092257>.
- [18] J.H. Correia, J.A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, Z. Yang, Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions, *Pharmaceutics* 13 (2021) 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.
- [19] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: An update, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2011) 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- [20] L. Zhou, H. Hu, J. Li, Y. Yang, S. Tian, Y. Niu, Y. Liu, X. Zeng, Photodynamic immunotherapy of Ruthenium(II) polypyridyl complexes: Application in the treatment of colorectal Cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry* 274 (2026) 113056. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2025.113056>.

- [21] S. Abedanzadeh, K. Karami, M. Rahimi, M. Edalati, M. Abedanzadeh, A.M. Tamaddon, M.D. Jahromi, Z. Amirghofran, J. Lipkowski, K. Lyczko, Potent cyclometallated Pd(II) antitumor complexes bearing α -amino acids: synthesis, structural characterization, DNA/BSA binding, cytotoxicity and molecular dynamics simulation, Dalton Trans. 49 (2020) 14891–14907. <https://doi.org/10.1039/D0DT02304C>.
- [22] D. Xu, Q. Duan, H. Yu, W. Dong, Photodynamic therapy based on porphyrin-based metal–organic frameworks, J. Mater. Chem. B 11 (2023) 5976–5989. <https://doi.org/10.1039/D2TB02789E>.
- [23] Z. Wang, Q. Sun, B. Liu, Y. Kuang, A. Gulzar, F. He, S. Gai, P. Yang, J. Lin, Recent advances in porphyrin-based MOFs for cancer therapy and diagnosis therapy, Coordination Chemistry Reviews 439 (2021) 213945. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213945>.
- [24] F.P. Dwyer, THE ROLE OF THE METAL IN PORPHYRIN COMPLEXES, in: Haematin Enzymes, Elsevier, 1961: pp. 19–28. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9646-6.50009-0>.
- [25] I. Tisoco, M.C. Donatoni, H.F.V. Victória, J.R. De Toledo, K. Krambrock, O.A. Chaves, K.T. De Oliveira, B.A. Iglesias, Photophysical, photooxidation, and biomolecule-interaction of *meso*-tetra(thienyl)porphyrins containing peripheral Pt(II) and Pd(II) complexes. Insights for photodynamic therapy applications, Dalton Trans. 51 (2022) 1646–1657. <https://doi.org/10.1039/D1DT03565G>.
- [26] J. Deng, H. Li, M. Yang, F. Wu, Palladium porphyrin complexes for photodynamic cancer therapy: effect of porphyrin units and metal, Photochem Photobiol Sci 19 (2020) 905–912. <https://doi.org/10.1039/c9pp00363k>.
- [27] K.M. Alves, J. Honorato, L.M. Lião, V.S. Velozo-Sa, A.P.M. Guedes, J.D.L. Dutra, A.P. Ayalla, J. Ellena, A.A. Batista, P.J. Gonçalves, *meso*-Tetra-(4-pyridyl)porphyrin/palladium(II) complexes as anticancer agents, Dalton Trans. 50 (2021) 16254–16264. <https://doi.org/10.1039/D1DT01850G>.
- [28] R. Czarnomysy, D. Radomska, O.K. Szewczyk, P. Roszczenko, K. Bielawski, Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments, IJMS 22 (2021) 8271. <https://doi.org/10.3390/ijms22158271>.
- [29] T. Scattolin, V.A. Voloshkin, F. Visentin, S.P. Nolan, A critical review of palladium organometallic anticancer agents, Cell Reports Physical Science 2 (2021) 100446. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2021.100446>.

- [30] J. Lakkakula, Y. Satam, S. Alexander, R. Bose, I. Uddin, Palladium Nanoparticles as a Platform for Cancer Diagnosis and Treatment, *BioNanoSci.* 14 (2024) 4342–4359. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01603-w>.
- [31] L.H.B. Pires, T.M. Dos Anjos Oliveira, J.C. Desordi, E.S.A. Ducas, L.S. Souza, E.C. De Moraes, A.C. Borsanelli, A.A. Batista, P.J. Gonçalves, G.R.L. De Souza, Breaking antibiotic resistance: Porphyrin-driven photoinactivation and priming effect on mastitis-related MDR bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 271 (2025) 113246. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113246>.
- [32] F.P. Sellera, C.L. Nascimento, M.S. Ribeiro, eds., *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*, Springer International Publishing, Cham, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45007-0>.
- [33] M.H. Abdel-Kader, ed., *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8>.
- [34] D. Aebisher, S. Czech, K. Dynarowicz, M. Misiótek, K. Komosińska-Vassev, A. Kawczyk-Krupka, D. Bartusik-Aebisher, *Photodynamic Therapy: Past, Current, and Future*, *IJMS* 25 (2024) 11325. <https://doi.org/10.3390/ijms252011325>.
- [35] O.D. Schein, *Photodynamic Therapy With Verteporfin: Observations on the Introduction of a New Treatment Into Clinical Practice*, *Arch Ophthalmol* 123 (2005) 58. <https://doi.org/10.1001/archophth.123.1.58>.
- [36] G. Li, C. Wang, B. Jin, T. Sun, K. Sun, S. Wang, Z. Fan, *Advances in smart nanotechnology-supported photodynamic therapy for cancer*, *Cell Death Discov.* 10 (2024) 466. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02236-4>.
- [37] D. Aebisher, A. Przygórzewska, D. Bartusik-Aebisher, *The Latest Look at PDT and Immune Checkpoints*, *CIMB* 46 (2024) 7239–7257. <https://doi.org/10.3390/cimb46070430>.
- [38] D. Viswanath, Y.-Y. Won, *Combining Radiotherapy (RT) and Photodynamic Therapy (PDT): Clinical Studies on Conventional RT-PDT Approaches and Novel Nanoparticle-Based RT-PDT Approaches under Preclinical Evaluation*, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 8 (2022) 3644–3658. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c00287>.

- [39] G. Hong, J.-E. Chang, Enhancing Cancer Treatment Through Combined Approaches: Photodynamic Therapy in Concert with Other Modalities, *Pharmaceutics* 16 (2024) 1420. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111420>.
- [40] R. Baskaran, J. Lee, S.-G. Yang, Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications, *Biomater Res* 22 (2018) 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
- [41] L.P. Cook, G. Brewer, W. Wong-Ng, Structural Aspects of Porphyrins for Functional Materials Applications, *Crystals* 7 (2017) 223. <https://doi.org/10.3390/cryst7070223>.
- [42] S. Hiroto, Y. Miyake, H. Shinokubo, Synthesis and Functionalization of Porphyrins through Organometallic Methodologies, *Chem. Rev.* 117 (2017) 2910–3043. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00427>.
- [43] G. Braga, J.L. Aparicio, B.H. Vilsinski, A.L. Tessaro, A.P. Gerola, N. Hioka, W. Caetano, SELF-AGGREGATION OF 5,10,15,20-TETRAKIS(4-METHOXYPHENYL)PORPHYRIN (TMPP): SPECTROSCOPIC STUDIES AND MULTIVARIATE ANALYZES, *Química Nova* 37 (2014). <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140105>.
- [44] E.G. Azenha, A.C. Serra, M. Pineiro, M.M. Pereira, J. Seixas De Melo, L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, A.M. d'A. Rocha Gonsalves, Heavy-atom effects on metalloporphyrins and polyhalogenated porphyrins, *Chemical Physics* 280 (2002) 177–190. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(02\)00485-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(02)00485-8).
- [45] J. Khisa, S. Derese, J. Mack, E. Amuhaya, T. Nyokong, Synthesis, photophysical properties and photodynamic antimicrobial activity of *meso* 5,10,15,20-tetra(pyren-1-yl)porphyrin and its indium(III) complex, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 25 (2021) 794–799. <https://doi.org/10.1142/S1088424621500462>.
- [46] S. Monro, K.L. Colón, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R.P. Thummel, L. Lilge, C.G. Cameron, S.A. McFarland, Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433, *Chem. Rev.* 119 (2019) 797–828. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00211>.
- [47] R. Czarnomysy, D. Radomska, O.K. Szewczyk, P. Roszczenko, K. Bielawski, Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments, *IJMS* 22 (2021) 8271. <https://doi.org/10.3390/ijms22158271>.

- [48] L.B. Trentin, A.R. Viana, S. Iwersen, B.A. Iglesias, O.A. Chaves, A.P. Schuch, Light exposure of tetra-cationic porphyrins containing peripheral Pd(II)-bipyridyl complexes and the induced effects on purified DNA molecule, fibroblast and melanoma cell lines, *Photochem & Photobiology* 101 (2025) 565–579. <https://doi.org/10.1111/php.14017>.
- [49] N.M.A. Lima, T.T. Bezerra, M.O. Almeida, N.L.D.C. Rodrigues, C.H.C. Braga, J.I.S. Miranda, V.G.P. Ribeiro, G.D.F. Guimarães, M.J. Teixeira, D. Lomonaco, G. Mele, S.E. Mazzetto, Photodynamic effect of palladium porphyrin derived from cashew nut shell liquid against promastigote forms of *Leishmania braziliensis*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 33 (2021) 102083. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102083>.
- [50] B. Pucelik, A. Barzowska, A. Sułek, M. Werłos, J.M. Dąbrowski, Refining antimicrobial photodynamic therapy: effect of charge distribution and central metal ion in fluorinated porphyrins on effective control of planktonic and biofilm bacterial forms, *Photochem Photobiol Sci* 23 (2024) 539–560. <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00538-1>.
- [51] L. Tan, X. Shen, Z. He, Y. Lu, The Role of Photodynamic Therapy in Triggering Cell Death and Facilitating Antitumor Immunology, *Front. Oncol.* 12 (2022) 863107. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.863107>.
- [52] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1776 (2007) 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- [53] Q. Ding, H. Rha, C. Yoon, Y. Kim, S.J. Hong, H.J. Kim, Y. Li, M.H. Lee, J.S. Kim, Regulated cell death mechanisms in mitochondria-targeted phototherapy, *Journal of Controlled Release* 382 (2025) 113720. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113720>.
- [54] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G.B. Kharkwal, M.R. Hamblin, Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer, *Cancers* 3 (2011) 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>.
- [55] D. Kessel, M.G.H. Vicente, J.J. Reiners, Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy, *Lasers Surg Med* 38 (2006) 482–488. <https://doi.org/10.1002/lsm.20334>.

- [56] T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Res* 38 (1978) 2628–2635.
- [57] S. Ito, K. Wakamatsu, T. Sarna, Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications, *Photochem & Photobiology* 94 (2018) 409–420. <https://doi.org/10.1111/php.12837>.
- [58] P. Mroz, Y. Huang, A. Szokalska, T. Zhiyentayev, S. Janjua, A. Nifli, M.E. Sherwood, C. Ruzi , K.E. Borbas, D. Fan, M. Krayner, T. Balasubramanian, E. Yang, H.L. Kee, C. Kirmaier, J.R. Diers, D.F. Bocian, D. Holten, J.S. Lindsey, M.R. Hamblin, Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy, *The FASEB Journal* 24 (2010) 3160–3170. <https://doi.org/10.1096/fj.09-152587>.
- [59] L. Pires, S. Khattak, S. Pratavieira, C. Calcada, R. Romano, Y. Yucel, V.S. Bagnato, C. Kurachi, B.C. Wilson, Femtosecond pulsed laser photodynamic therapy activates melanin and eradicates malignant melanoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121 (2024) e2316303121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2316303121>.
- [60] B. Wu, B. Zhang, B. Li, H. Wu, M. Jiang, Cold and hot tumors: from molecular mechanisms to targeted therapy, *Sig Transduct Target Ther* 9 (2024) 274. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01979-x>.
- [61] H. Sikorski, M.A.  mijewski, A. Piotrowska, Tumor Microenvironment in Melanoma—Characteristic and Clinical Implications, *IJMS* 26 (2025) 6778. <https://doi.org/10.3390/ijms26146778>.
- [62] C.S. Lobo, M.I.P. Mendes, D.A. Pereira, L.C. Gomes-da-Silva, L.G. Arnaut, Photodynamic therapy changes tumour immunogenicity and promotes immune-checkpoint blockade response, particularly when combined with micromechanical priming, *Sci Rep* 13 (2023) 11667. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38862-8>.
- [63] R.A. Akasov, N.V. Sholina, D.A. Khochenkov, A.V. Alova, P.V. Gorelkin, A.S. Erofeev, A.N. Generalova, E.V. Khaydukov, Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide, *Sci Rep* 9 (2019) 9679. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46115-w>.
- [64] B.R. Hall, A. Cannon, P. Atri, C.S. Wichman, L.M. Smith, A.K. Ganti, C. Are, A.R. Sasson, S. Kumar, S.K. Batra, Advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of clinical trials over thirty years, *Oncotarget* 9 (2018) 19396–19405. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25036>.

- [65] J.A.G. Moir, J. Mann, S.A. White, The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer, *Surgical Oncology* 24 (2015) 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2015.05.002>.
- [66] M.G. Bachem, M. Schünemann, M. Ramadani, M. Siech, H. Beger, A. Buck, S. Zhou, A. Schmid-Kotsas, G. Adler, Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells, *Gastroenterology* 128 (2005) 907–921. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.12.036>.
- [67] H.-C. Huang, I. Rizvi, J. Liu, S. Anbil, A. Kalra, H. Lee, Y. Baglo, N. Paz, D. Hayden, S. Pereira, B.W. Pogue, J. Fitzgerald, T. Hasan, Photodynamic Priming Mitigates Chemotherapeutic Selection Pressures and Improves Drug Delivery, *Cancer Research* 78 (2018) 558–571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1700>.
- [68] S. Bano, J.Q. Albuquerque, H.J. Roberts, S. Pang, H.-C. Huang, T. Hasan, Minocycline and photodynamic priming significantly improve chemotherapy efficacy in heterotypic spheroids of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 255 (2024) 112910. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112910>.
- [69] D. Aebisher, A. Przygórzewska, D. Bartusik-Aebisher, The Latest Look at PDT and Immune Checkpoints, *CIMB* 46 (2024) 7239–7257. <https://doi.org/10.3390/cimb46070430>.
- [70] C.S. Lobo, M.I.P. Mendes, D.A. Pereira, L.C. Gomes-da-Silva, L.G. Arnaut, Photodynamic therapy changes tumour immunogenicity and promotes immune-checkpoint blockade response, particularly when combined with micromechanical priming, *Sci Rep* 13 (2023) 11667. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38862-8>.
- [71] X. Hu, J. Ren, Q. Xue, R. Luan, D. Ding, J. Tan, X. Su, J. Yang, Anti-PD-1/PD-L1 and anti-CTLA-4 associated checkpoint inhibitor pneumonitis in non-small cell lung cancer: Occurrence, pathogenesis and risk factors (Review), *Int J Oncol* 63 (2023) 122. <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5570>.
- [72] D.R. Leach, M.F. Krummel, J.P. Allison, Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade, *Science* 271 (1996) 1734–1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>.
- [73] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, T. Honjo, Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death.,

- The EMBO Journal 11 (1992) 3887–3895. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x>.
- [74] P. De Silva, M.A. Saad, J.W.R. Swain, Z. Mai, M.D. Kidd, J.J. Choe, A.P. Camargo, S. Anand, V. Chandrasekhara, B.W. Pogue, K.K. Wang, B.Q. Spring, E.V. Maytin, T. Hasan, Photodynamic priming with red light triggers adaptive immune responses in a pancreatic cancer mouse model, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 265 (2025) 113126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2025.113126>.
- [75] I.E. Borissevitch, E. Silveira-Alves, C.G.L. Almeida, G.R.L. Souza, S.S. Sokolov, P.J. Gonçalves, An Alternative Method to Determine the Quantum Yield of the Excited Triplet State Using Laser Flash Photolysis, *Photonics* 10 (2023) 409. <https://doi.org/10.3390/photonics10040409>.
- [76] T.H. Tran-Thi, J.F. Lipskier, P. Maillard, M. Momenteau, J.M. Lopez-Castillo, J.P. Jay-Gerin, Effect of the exciton coupling on the optical and photophysical properties of face-to-face porphyrin dimer and trimer: a treatment including the solvent stabilization effect, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 1073–1082. <https://doi.org/10.1021/j100182a012>.
- [77] M. Korínek, R. Dědic, A. Molnár, A. Svoboda, J. Hála, A comparison of photosensitizing properties of meso-tetraphenylporphyrin in acetone and in dimethyl sulfoxide, *Journal of Molecular Structure* 744–747 (2005) 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.036>.
- [78] S. Naveenraj, S. Anandan, Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 14 (2013) 53–71. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001>.
- [79] J. Melomedov, J.R. Ochsmann, M. Meister, F. Laquai, K. Heinze, Aminoferrocene and Ferrocene Amino Acid as Electron Donors in Modular Porphyrin–Ferrocene and Porphyrin–Ferrocene–Porphyrin Conjugates, *Eur J Inorg Chem* 2014 (2014) 2902–2915. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402138>.
- [80] A. Farmilo, F. Wilkinson, Triplet state quenching by ferrocene, *Chemical Physics Letters* 34 (1975) 575–580. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(75\)85565-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(75)85565-5).
- [81] A. Di Masi, Human Serum Albumin: From Molecular Aspects to Biotechnological Applications, *IJMS* 24 (2023) 4081. <https://doi.org/10.3390/ijms24044081>.

- [82] A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier, H.-A. Tajmir-Riahi, Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins, *PLoS ONE* 7 (2012) e36723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036723>.
- [83] M. Saeidifar, H. Mansouri-Torshizi, Investigation of the Interaction Between Human Serum Albumin and Antitumor Palladium(II) Complex Containing 1,10-Phenanthroline and Dithiocarbamate Ligands, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 34 (2015) 16–32. <https://doi.org/10.1080/15257770.2014.955192>.
- [84] L. Colina-Vegas, J.L. Dutra, W. Villarreal, J.H. De A. Neto, M.R. Cominetti, F. Pavan, M. Navarro, A.A. Batista, Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: Interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and Mycobacterium tuberculosis, *Journal of Inorganic Biochemistry* 162 (2016) 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.023>.
- [85] P. Lee, X. Wu, Review: Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect, *CPD* 21 (2015) 1862–1865. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302115025>.
- [86] A. Divsalar, M.J. Bagheri, A.A. Saboury, H. Mansoori-Torshizi, M. Amani, Investigation on the Interaction of Newly Designed Anticancer Pd(II) Complexes with Different Aliphatic Tails and Human Serum Albumin, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 14035–14042. <https://doi.org/10.1021/jp904822n>.
- [87] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096–3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>.
- [88] R. Ou, G. Aodeng, J. Ai, Advancements in the Application of the Fenton Reaction in the Cancer Microenvironment, *Pharmaceutics* 15 (2023) 2337. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092337>.
- [89] M.T. Martin, A.B. Becceneri, P.C. Ford, R.S. Da Silva, Chemical approach for obtaining a porphyrin bonded to nitro-ruthenium derivative as a promising photosensitizer for enhancing light irradiation therapy, *Inorganic Chemistry Communications* 161 (2024) 112138. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112138>.
- [90] D.I. Figueroa-Figueroa, F. Hernández-Luis, Advances in ferrocene photosensitizers: illuminating new avenues in the medicinal chemistry of cancer, *Med Chem Res* 34 (2025) 1480–1495. <https://doi.org/10.1007/s00044-025-03432-2>.

- [91] N.N.P. Da Silva, M.V. Palmeira-Mello, N.O. Acésio, C.A.F. Moraes, J. Honorato, E.E. Castellano, D.C. Tavares, K.M. Oliveira, A.A. Batista, Ru(II)-diphosphine/N,S-mercapto complexes and their anti-melanoma properties, *Dalton Trans.* 54 (2025) 605–615. <https://doi.org/10.1039/D4DT02575J>.
- [92] M.A. Saad, W. Zhung, M.E. Stanley, S. Formica, S. Grimaldo-Garcia, G. Obaid, T. Hasan, Photoimmunotherapy Retains Its Anti-Tumor Efficacy with Increasing Stromal Content in Heterotypic Pancreatic Cancer Spheroids, *Mol. Pharmaceutics* 19 (2022) 2549–2563. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00260>.
- [93] P. De Silva, S. Bano, B.W. Pogue, K.K. Wang, E.V. Maytin, T. Hasan, Photodynamic priming with triple-receptor targeted nanoconjugates that trigger T cell-mediated immune responses in a 3D *in vitro* heterocellular model of pancreatic cancer, *Nanophotonics* 10 (2021) 3199–3214. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0304>.
- [94] G. Wu, S. Tan, X. Tan, G. Chen, Q. Yang, Recent advances in ferrocene-based nanomedicines for enhanced chemodynamic therapy, *Theranostics* 15 (2025) 384–407. <https://doi.org/10.7150/thno.101697>.
- [95] G. Kroemer, L. Galluzzi, O. Kepp, L. Zitvogel, Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy, *Annu. Rev. Immunol.* 31 (2013) 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.
- [96] F. Wang, R. Gómez-Sintes, P. Boya, Lysosomal membrane permeabilization and cell death, *Traffic* 19 (2018) 918–931. <https://doi.org/10.1111/tra.12613>.
- [97] A.D. Garg, D.V. Krysko, T. Verfaillie, A. Kaczmarek, G.B. Ferreira, T. Marysael, N. Rubio, M. Firczuk, C. Mathieu, A.J.M. Roebroek, W. Annaert, J. Golab, P. De Witte, P. Vandenabeele, P. Agostinis, A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death, *The EMBO Journal* 31 (2012) 1062–1079. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.497>.
- [98] J. Fucikova, O. Kepp, L. Kasikova, G. Petroni, T. Yamazaki, P. Liu, L. Zhao, R. Spisek, G. Kroemer, L. Galluzzi, Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy, *Cell Death Dis* 11 (2020) 1013. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>.
- [99] M. Costa Da Silva, M.O. Breckwoldt, F. Vinchi, M.P. Correia, A. Stojanovic, C.M. Thielmann, M. Meister, T. Muley, A. Warth, M. Platten, M.W. Hentze, A. Cerwenka, M.U. Muckenthaler, Iron Induces Anti-tumor Activity in Tumor-

Associated Macrophages, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1479.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01479>.

APÊNDICE

Publicações no período do doutorado (2021/2 – 2025/2)



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

pubs.acs.org/journal/abseba

Article

Human 3D Lung Cancer Tissue Photothermal Therapy Using Zn- and Co-Doped Magnetite Nanoparticles

Edynara Cruz de Moraes, Marcella Miranda Siqueira Furtuoso Rodrigues, Rafaela Campos de Menezes, Marcus Vinícius-Araújo, Marize Campos Valadares,* and Andris Figueiroa Bakuzis*

Cite This: *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2025, 11, 1084–1095

Read Online

ACCESS |

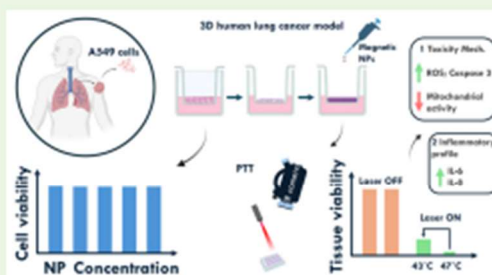
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Iron oxide-based nanoparticles are promising materials for cancer thermal therapy and immunotherapy. However, several proofs of concept reported data with murine tumor models that might have limitations for clinical translation. Magnetite is nowadays the most popular nanomaterial, but doping with distinct ions can enhance thermal therapy, namely, magnetic nanoparticle hyperthermia (MNH) and photothermal therapy (PTT). In this study, we used a 3D alveolar reconstructed A549 lung cancer tissue model and investigated the thermal properties, toxicity, and impact of the thermal dose on tissue viability and inflammatory response using magnetite codoped with 40% Zn and 2% Co divalent ions. The ZnCo-doped magnetite nanoparticles are not toxic up to an NP concentration of 30 mg/mL. PTT showed a better heat generation response than MNH under the evaluated conditions, while NP showed a high external photothermal conversion efficiency of $\sim 1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 808 nm. PTT study is carried out at different temperatures, 43 and 47 °C, for 15 min. Tissue viability decreased with increasing thermal dose, while intracellular ROS levels increased, mitochondrial activity decreased, and active caspase-3 increased, suggesting cell death via apoptosis. Nanoparticles and PTT did not influence the cytokine TNF, IL-10, IL-1B, and IL-12p70. In contrast, IL-6 and IL-8 were triggered by NP and PTT. Increased expression of IL-6 and IL-8 with higher thermal doses is correlated with tissue injury results, suggesting the potential role in activating and attracting immune cells to the site of thermal-mediated tissue injury.

KEYWORDS: iron oxide, thermal-induced immunotherapy, nanomedicine, cytokine, reactive oxygen species



DE MORAES, Edynara Cruz et al. Human 3D Lung Cancer Tissue Photothermal Therapy Using Zn- and Co-Doped Magnetite Nanoparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 11, n. 2, p. 1084-1095, 2025.



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Original Research Article



Nanoparticle-mediated hyperthermia for male cat neutering: Disrupting fertility without surgery

Ana Bárbara Rocha Silva ^{a,b}, Juliana Lis Mendes Brito ^a, Rafaela Lopes Palmeiro de Souza ^a,
 Fernanda Souza Natividade Gontijo ^c, Wesley de Souza Barbosa ^d, Letícia Araújo de Santana ^a,
 Julia Palma Maia de Almeida ^a, Sara Alves Almeida ^a, Edynara Cruz De Moraes ^c,
 Vanessa Nicolau Lima ^a, Giane Regina Paludo ^b, Paulo Eduardo Narciso Souza ^e,
 Andris Figueiroa Bakuzis ^g, Ricardo Bentes Azevedo ^a, Carolina Madeira Lucci ^{a,*}

^a University of Brasília, Institute of Biological Sciences, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil

^b University of Brasília, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil

^c University of Brasília, Faculty of Medicine, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil

^d WS Atividades Veterinárias, Agnus Clarus, 71916-500, DF, Brazil

^e Federal University of Goiás, Institute of Physics, Goiânia, Goiás, 74690-900, Brazil

^f University of Brasília, Institute of Physics, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, 70910-900, DF, Brazil

^g CNanoMed, Nanomedicine Integrated Research Center, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, 74690-631, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Animal population control
 Nanocastration
 Nanocastration
 Testicular hyperthermia
 Non-surgical neutering
 Tomcats

ABSTRACT

This study aimed to evaluate magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia (MNH) as a potential method to induce infertility in male cats. The short- and long-term effects of the treatment on reproductive health parameters were assessed in 20 cats. Treatment consisted of a 150 μ L intratesticular injection of a magnetic fluid composed of citrate-coated manganese ferrite (Ct-MnFe₂O₄) nanoparticles, followed by the application of an external magnetic field to raise and maintain testicular temperature at 45 °C for 15 min. Testicular MNH was found to be safe and well tolerated, with no signs of pain or clinical side-effects. Testicular volume increased significantly on Day 7 due to peritesticular inflammation, followed by a marked decrease on Day 180. Azospermia was observed in 85 % of the treated animals, while 15 % were oligospermic. Histological analysis revealed substantial damage to seminiferous tubule architecture and epididymides. No hematological, biochemical or abdominal ultrasound abnormalities were observed in the treated animals. These findings demonstrated the strong potential of testicular magnetic hyperthermia mediated by Ct-MnFe₂O₄ nanoparticles as a non-surgical alternative method for male cat sterilization.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Breaking antibiotic resistance: Porphyrin-driven photoinactivation and priming effect on mastitis-related MDR bacteria

Luiz Henrique Barbosa Pires^a, Taise Maria dos Anjos Oliveira^a, Jaqueline C. Desordi^b,
Eli Silveira Alves Ducas^{c,d}, Lucas Soares Souza^b, Edynara Cruz de Moraes^b,
Ana Carolina Borsanelli^a, Alzir Azevedo Batista^{c,e}, Pablo José Gonçalves^{b,d,f,g},
Guilherme Rocha Lino de Souza^{a,h,*}

^a Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^c Saneamento de Goiás, Superintendência de Gestão de Obras, Goiânia, GO, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^e Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^f Centro de Excelência em Hidroginio e Tecnologias Energéticas Sustentáveis (CEHTES), Goiânia, GO, Brazil

^g Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Palladium(II)/diphosphine-coordinated meso-tetrapyrrolyl porphyrins
Photophysical properties
Mastitis-associated bacteria photoinactivation
PS-priming effect

ABSTRACT

Bovine mastitis is a major infectious disease in dairy herds worldwide, with increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR) pathogens affecting the efficacy of conventional antibiotic therapies. In this study, we explore antimicrobial photodynamic inactivation (PDI) as an innovative and sustainable strategy for controlling mastitis-associated bacteria. The photoinactivation potential was evaluated for four photosensitizers (PS) – palladium(II)/diphosphine-coordinated meso-tetrapyrrolyl porphyrins – Porf@DPPE, Porf@DPPP, Porf@DPPB, and Porf@DPPF – against six MDR bacterial strains isolated from bovine mastitis cases. Porf@DPPE, Porf@DPPP, and Porf@DPPB showed high triplet ($\Phi_T > 0.72$) and singlet oxygen ($\Phi_\Delta > 0.62$) quantum yields, while Porf@DPPF, despite lower values ($\Phi_T = 0.46$; $\Phi_\Delta = 0.42$), exhibited higher lipophilicity. All compounds induced significant photoinactivation, with Porf@DPPE achieving the lowest effective concentration (6.25 μM) and the broadest antimicrobial spectrum. Gram-negative isolates, such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, exhibited reduced susceptibility, requiring higher PS concentrations. DNA integrity assays indicated a potential PS mechanism of action on pathogens. Furthermore, combined treatment with Porf@DPPE or Porf@DPPF and sulfonamides restored antibiotic susceptibility in MDR *E. coli*, highlighting a synergistic interaction. These findings underscore the therapeutic potential of metalloporphyrin-based photosensitizers for mastitis control and support the integration of PDI with conventional antibiotics as a feasible approach to overcome multidrug-resistant bacteria in veterinary settings.

PIRES, Luiz Henrique Barbosa et al. Breaking antibiotic resistance: Porphyrin-driven photoinactivation and priming effect on mastitis-related MDR bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p. 113246, 2025.

1 Palladium(II)-Complexed *meso*-Tetra(4-pyridyl)porphyrin: 2 Photodynamic Efficacy in 3D Pancreatic Cancer Models

3 Edynara Cruz de Moraes,* Lívia do Carmo Silva, Juliana Santana de Curcio, Alex Marchezini Graça,
4 Alzir Azevedo Batista, Elisângela de Paula Silveira Lacerda, and Pablo José Gonçalves*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c09619>

Read Online

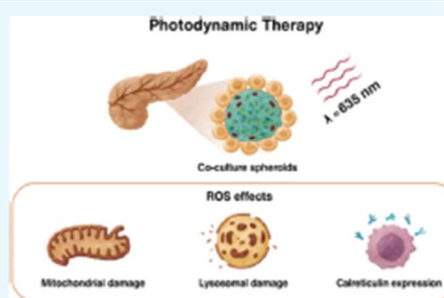
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

5 **ABSTRACT:** Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is among the
6 deadliest malignancies, with limited therapeutic options and a highly
7 unfavorable prognosis, largely attributed to the presence of a desmoplastic
8 tumor microenvironment. In this study, the photodynamic efficacy of
9 metalloporphyrin-based photosensitizers—palladium(II)/diphosphine-co-
10 ordinated *meso*-tetrapyrrolyl porphyrins, PS1 and PS2—were evaluated in
11 both homogeneous and heterogeneous 3D models of PDAC composed of
12 MIA PaCa-2 tumor cells and pancreatic cancer-associated fibroblasts.
13 Photodynamic therapy was conducted using red light ($\lambda = 635$ nm) at
14 doses ranging from 1.5 to 10 J/cm², following a 90 min of incubation
15 period. Among the tested compounds, PS2 demonstrated superior
16 photodynamic performance in both models, exhibiting significantly
17 lower IC₅₀ values compared to PS1, thereby indicating enhanced
18 phototoxicity. At a concentration of 3 μ M, the IC₅₀ value for PS2 was
19 1.3 ± 0.1 J/cm², whereas for PS1 exhibited a markedly higher IC₅₀ of 5.7 ± 0.06 J/cm². This enhanced efficacy was attributed to
20 sustained, dose-dependent generation of reactive oxygen species and increased cellular uptake. Notably, treatment with PS2 induced
21 calreticulin exposure on the cell surface, indicative of immunogenic cell death. Organelle-specific analyses revealed mitochondrial
22 hyperpolarization and decreased lysosomal fluorescence, suggesting selective subcellular accumulation and functional impairment.



CRUZ DE MORAES, Edynara et al. Palladium (II)-Complexed *meso*-Tetra (4-pyridyl) porphyrin: Photodynamic Efficacy in 3D Pancreatic Cancer Models. ACS *omega*, 2025.

Apresentação de trabalhos na modalidade poster no período do doutorado (2021/2 – 2025/2)



CERTIFICADO

Este certificado é conferido a **Edynara Cruz de Moraes**, em reconhecimento à sua participação na 6ª Escola Avançada de Física Experimental (EAFExp) do CBPF, realizada de 30 de janeiro a 10 de fevereiro de 2023, onde participou do módulo "**Magnetismo na Síntese e Caracterizações de Nanomateriais**" obtendo a média **95** relativa à avaliação de desempenho individual, ao seminário apresentado e ao relatório de conclusão. O participante também apresentou trabalho intitulado "**Terapia fototérmica mediada por NP de magnetita dopadas Zn e Co promove morte de células de câncer de pulmão A549 em tecido 3D**".

Rio de Janeiro, 24 de abril de 2023



Flávio Garcia

6 **EAFEXP** INSTITUTO
BRASILEIRO DE FÍSICA
EXPERIMENTAL
COMITÊ ORGANIZADOR
CBPF | CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS

VI WORKSHOP
PPGFísica

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que **EDYNARA CRUZ DE MORAES** apresentou na modalidade de Pannel o trabalho "**Avaliação fotodinâmica in vitro de Porfirinas de Paládio em células cancerígenas de melanoma murino (B16F10)**" durante o **VI Workshop do Programa de Pós-Graduação em Física**, realizado no dia 06 e 07 de novembro de 2023, no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

Goiânia, 09 de novembro de 2023



Prof. Dr. Lucas Chibêbe Céleri
Coordenador do PPGF



Prof. Dr. Lauro Júnio Queiroz
Diretor do IF-UFG


Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física


UFG
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS

VII WORKSHOP PPGFísica

CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que EDYNARA CRUZ DE MORAES apresentou na modalidade de Painel o trabalho "Avaliação Fotodinâmica In Vitro de Porfirinas com Complexos de Paládio em Células Cancerígenas de Melanoma (B16F10)" durante o VII Workshop do Programa de Pós-Graduação em Física, realizado no dia 10 e 11 de setembro de 2024, no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

Goiânia, 17 de setembro de 2024

Lucas Celso

Prof. Dr. Lucas Chibebé Céleri
Coordenador do PPGF

Lauro Juné

Prof. Dr. Lauro Juné Queiroz
Diretor do IF-UFG



CBFM
29º CONGRESSO BRASILEIRO DE FÍSICA MÉDICA
SÃO PAULO • 2025

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Caracterização fotofísica da porfirina de paládio PdCl(dppp)TpyP4 e sua aplicação na terapia fotodinâmica in vitro em melanoma murino (B16F10),

de autoria de LUCAS SOARES SOUZA, EDYNARA CRUZ DE MORAES, JAQUELINE CRISTINE DESORDI, LIVIA DO CARMO SILVA, ALZIR AZEVEDO BATISTA, ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA, PABLO JOSE GONCALVES, foi apresentado na forma de PÔSTER durante o 29º Congresso Brasileiro de Física Médica, promovido pela Associação Brasileira de Física Médica - ABFM, de 1 a 4 de outubro de 2025, na cidade de São Paulo/SP.

São Paulo, 4 de outubro de 2025.

Angel da Silva Martinez
Dr. Angel da Silva Martinez
Presidente 29º CBFM 2025
Presidente ABFM Biênio 2024/2025

Simone Coutinho Cardoso
Dra. Simone Coutinho Cardoso
Presidente da Comissão Científica 29º CBFM 2025
Diretora de Ensino e Pesquisa da ABFM

REALIZAÇÃO: ABFM

GERENCIAMENTO E PRODUÇÃO: **RV+**
EVENTOS