

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

ME. JULIANY NAURA MARCIEL DA SILVA

**Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas  
de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação  
com a albumina sérica bovina**

GOIÂNIA

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

## 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

**Juliany Naura Marciel Da Silva**

#### 3. Título do trabalho

*Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação com a albumina sérica bovina*

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

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

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) 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 **Pablo Jose Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2025, às 14:59, 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 **Juliany Naura Marciel Da Silva, Discente**, em 26/11/2025, às 16:52, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5812842** e o código CRC **EA154DC7**.

---

ME. JULIANY NAURA MARCIEL DA SILVA

**Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas  
de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação  
com a albumina sérica bovina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química.

Linha de pesquisa: Síntese Química.

Orientador: Professor Dr. Pablo José Gonçalves.

GOIÂNIA

2025

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

Silva, Juliany Naura Marciel da  
Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação com a albumina sérica bovina [manuscrito] / Juliany Naura Marciel da Silva. - 2025.  
XCVII, 97 f.

Orientador: Prof. Pablo José Gonçalves.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2025.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Porfirinas Mesossubstituídas. 2. Espectroscopia Transiente. 3. Oxidação de Proteínas. I. Gonçalves, Pablo José, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº **203** da sessão de Defesa de Tese de **Juliany Naura Marciel Da Silva**, que confere o título de **Doutora em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **24 (vinte e quatro dias) do mês de novembro de 2025 (dois mil e vinte e cinco)**, a partir das **14h:00 m**, no **Anfiteatro do I.Q 2**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação com a albumina sérica bovina (BSA).”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Pablo José Gonçalves (IF – UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Lucília Kato (IQ – UFG)**; Professora Doutora **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ – UFG)**, Professor Doutor **Antônio Alonso (IF – UFG)**, Professor Doutor **Leonardo Pereira Franchi (ICB – UFG)**. Durante a arguição, os membros da banca **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 assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **24 (vinte e quatro dias) do mês de novembro de 2025 (dois mil e vinte e cinco)**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

*Propriedades fotofísicas de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e sua interação com a albumina sérica bovina*



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professora do Magistério Superior**, em 25/11/2025, às 08:42, 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 25/11/2025, às 13:59, 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 25/11/2025, às 15:17, 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 25/11/2025, às 16:09, 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 **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 13:33, 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](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5808862** e o código CRC **433F1456**.

---

Referência: Processo nº 23070.055208/2025-02

SEI nº 5808862

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a Deus, fonte de sabedoria e poder nos momentos mais desafiadores, sem ele  
não teria chegado até aqui!*

*À minha família, por todo amor e apoio incondicional, e a todos que acreditaram em mim  
quando eu mesma duvidei.*

## AGRADECIMENTO

Chegou a hora de colocar no papel a gratidão que transborda no meu coração. Esta conquista não é só minha; é um mosaico de apoio, fé e amor de cada pessoa que Deus colocou no meu caminho. Caminho esse que foi árduo e cheio de desafios, mas que com paciência e fé consegui vencer e chegar até aqui. Foram muitos finais de semanas, feriados sentados em uma mesa escrevendo. Passei por muitos problemas emocionais e físicos, na verdade foi para mim os melhores e os piores anos da minha vida. Chegar até aqui, foi significativo para meu crescimento pessoal, e para a pessoa que me tornei.

Mãe, Elieth... onde encontrar palavras? Você é meu alicerce. O que seria de mim sem você! Lembro de tantas noites em que você ficou acordada comigo, mesmo cansada do seu dia, só para me fazer companhia. Quantos dias você estava lá me dando apoio quando eu mesma não tinha força para lutar. Sua fé inabalável era a minha âncora nos momentos de tempestade. Obrigada pelas infinitas orações, obrigada por ser minha primeira e maior professora na vida, por ser minha amiga, por ser a “mãe” dos meus filhos, por cuidar bem deles quando eu não estava lá. Obrigada por tudo, pelo exemplo, mesmo sofrendo na vida nunca te vi triste e nem reclamar, nunca te vi desanimar e isso foi e é essencial na minha formação como pessoa. Tentar explicar aqui o amor que sinto não é possível, mas saiba que te amo com todo o meu coração. Agradeço à Deus por ter te escolhido como minha mãe.

Fábio, meu companheiro de vida, homem fiel à Deus e íntegro. Que sempre trabalhou para dar o melhor para sua família. Já passamos por muitos altos e baixos, mas conseguimos chegar até aqui... esta vitória é nossa. Você não só dividiu a teoria dos orbitais moleculares comigo nas madrugadas, mas dividiu os estresses, os choros, as crises de ansiedade (que foram muitas) você dividiu a vida. Só Deus sabe o que passamos para chegar até aqui, que trajetória cheia de dificuldades, provas e tristezas. Mas vencemos, obrigada por toda a paciência, pelos abraços silenciosos que diziam tudo e por acreditar em mim mais do que eu mesma. Sem você, esta jornada teria sido infinitamente mais solitária.

Bruno e Felipe, meus filhos, meus amores, minhas alegrias, minha vida... vocês são a razão de tudo. Cada "Mamãe, você consegue!" dito com aquela pureza infantil era o combustível que me faltava. Que esta conquista mostre a vocês que, com perseverança e Deus no comando, nenhum sonho é grande demais. Lutar, quebrar barreiras, enfrentar obstáculos faz parte da vida.

Professor Pablo, meu orientador... sua orientação foi um exemplo de excelência e serenidade. Homem íntegro, inteligente, te agradeço não apenas pelas correções precisas e pelas discussões intelectualmente desafiadoras, mas pela paciência humana nos meus momentos de dúvida, e nos momentos que quis desistir, obrigado por toda ajuda, sem você não teria chegado até aqui. Sua confiança no meu trabalho me deu asas para voar mais alto e conseguir terminar.

Ao CNPq e ao projeto SISFóton-MCTI, pelo indispensável suporte financeiro por meio da bolsa DTI-B. Este apoio foi a permissão para me dedicar integralmente a esta pesquisa, e seu valor é imensurável.

Aos meus companheiros de laboratório... vocês transformaram o ambiente de trabalho em uma segunda família. Obrigada pelos cafés compartilhados, pelas risadas que aliviavam o stress e pela colaboração genuína. Fizemos desta jornada uma estrada de mãos dadas.

Aos amigos e familiares que, mesmo de longe, me enviaram mensagens de apoio, oraram por mim e vibraram a cada conquista. Cada gesto foi um fio de força tecendo esta vitória.

E, por fim, volto os olhos para o Alto. Senhor, és a fonte de toda luz. Foi o Senhor que me deu a serenidade nos momentos de incerteza, a coragem nos dias de desânimo e a força quando o cansaço batia à porta. Foi o Senhor que me sustentou, a ti toda honra e toda glória. Esta conquista é, acima de tudo, para glorificar o Teu nome.

A todos, o meu muito obrigada, do fundo do meu coração!

## RESUMO

As porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos estáveis, com forte absorção na região visível e alta eficiência na geração de oxigênio singlete, sendo bem estabelecidas como agentes fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica (TFD). Seus derivados monocatiônicos frequentemente apresentam interações com alvos biológicos, embora suas interações com albuminas ainda não sejam totalmente compreendidas. Neste trabalho foi realizada a completa caracterização fotofísica de um conjunto de porfirinas monocatiônica (H<sub>2</sub>MPyP) e seus complexos de Pd (II), Pt (II) e Ru (II). Para isso, foram empregadas técnicas espectroscópicas, como UV-vis, Laser Flash-Fotólise e emissão de fluorescência e fosforescência de onde foram obtidos parâmetros com coeficiente de absorção molar, rendimentos quânticos de formação de estados tripleto, fluorescência e oxigênio singlete. Além disso, foi investigado suas interações com albumina sérica bovina (BSA), como constante de ligação e sua foto-oxidação, sob irradiação com lâmpada halógena. Comparadas a análogos tetracatiônicos, as porfirinas monocatiônicas foram mais eficientes em povoar o estado tripleto e gerar oxigênio singlete. Entre elas, H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP e PtMPyP exibiram altos rendimentos quânticos de tripleto ( $\Phi_T \approx 0,85$ ), sendo que H<sub>2</sub>MPyP apresentou o maior rendimento de oxigênio singlete ( $\Phi_\Delta = 0,70$ ). Todos os compostos promoveram foto-oxidação da BSA, com a eficiência geral seguindo a ordem PtMPyP > PdMPyP > H<sub>2</sub>MPyP > RuMPyP; notavelmente, PtMPyP apresentou a maior constante de taxa de fotodegradação ( $k_{pd} = 0,286 \text{ min}^{-1}$ ). O docking molecular localizou todas as porfirinas no sítio III (subdomínio IB), estabilizadas por interações hidrofóbicas e  $\pi$ -cátion. Nenhum descritor isolado ( $\Phi_\Delta$ , lipofilicidade ou afinidade) explicou sozinho a reatividade, apoiando o conceito de uma “janela de exposição–afinidade”: a foto-oxidação proteica efetiva requer ligação suficiente para colocalização com a BSA, mas também exposição adequada ao O<sub>2</sub> próximo a resíduos oxidáveis. Esses achados mostram que a coordenação metálica ajusta finamente tanto a desativação do estado excitado quanto a oxidação da proteína, oferecendo diretrizes práticas para projetar fotossensibilizadores de PDT de próxima geração com eficiência e seletividade aprimoradas.

**Palavras-chave:** Porphirinas Mesosubstituídas. Espectroscopia Transiente. Oxidação de Proteínas.

## ABSTRACT

Porphyrins are stable tetrapyrrole macrocycles with strong absorption in the visible region and high singlet oxygen generation efficiency, well established as photosensitizing agents in Photodynamic Therapy (PDT). Their monocationic derivatives often exhibit interactions with biological targets, although their interactions with albumins are not yet fully understood. In this work, a complete photophysical characterization of a set of monocationic porphyrins (H<sub>2</sub>MPyP) and their Pd(II), Pt(II), and Ru(II) complexes was performed. For this purpose, spectroscopic techniques such as UV-vis, Laser Flash Photolysis, and fluorescence and phosphorescence emission were employed, from which parameters such as molar absorption coefficient, quantum yields of triplet state formation, fluorescence, and singlet oxygen were obtained. Furthermore, their interactions with bovine serum albumin (BSA) were investigated, including binding constant and its photo-oxidation under irradiation with a halogen lamp. Compared to tetracationic analogs, the monocationic porphyrins were more efficient in populating the triplet state and generating singlet oxygen. Among them, H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP, and PtMPyP exhibited high triplet quantum yields ( $\Phi_T \approx 0.85$ ), with H<sub>2</sub>MPyP showing the highest singlet oxygen yield ( $\Phi_\Delta = 0.70$ ). All compounds promoted BSA photo-oxidation, with the overall efficiency following the order PtMPyP > PdMPyP > H<sub>2</sub>MPyP > RuMPyP; notably, PtMPyP exhibited the highest photodegradation rate constant ( $k_{pd} = 0.286 \text{ min}^{-1}$ ). Molecular docking localized all porphyrins in site III (subdomain IB), stabilized by hydrophobic and  $\pi$ -cation interactions. No single descriptor ( $\Phi_\Delta$ , lipophilicity, or affinity) alone explained the reactivity, supporting the concept of an "exposure–affinity window": effective protein photo-oxidation requires sufficient binding for colocalization with BSA, but also adequate exposure to O<sub>2</sub> near oxidizable residues. These findings demonstrate that metal coordination finely tunes both excited state deactivation and protein oxidation, offering practical guidelines for designing next-generation PDT photosensitizers with enhanced efficiency and selectivity.

**Keywords:** Mesosubstituted Porphyrins; Transient Spectroscopy; Protein Oxidation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura geral de uma porfirina (1 A) e exemplo de um espectro de absorção de uma porfirina da região do visível (1 B). ..... 19
- Figura 2- Diagrama de Jablonski mostrando: absorção, CI (conversão interna), fluorescência, CIS (cruzamento intersistemas) e fosforescência. ....26
- Figura 3- Mecanismos (Tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental ( $^3\text{O}_2$ ).....28
- Figura 4- Representação do aparato experimental de detecção de  $^1\text{O}_2$  pelo método direto. ....33
- Figura 5- a) Representação esquemática do aparato experimental da técnica de Flash-Fotólise com o sistema de bombeio (Laser Brilliant) e de análise (Lâmpada de Xe) ortogonais entre si; b) Diagramas de níveis de energia dos processos fotofísicos monitorados pela técnica.....35
- Figura 6- Fotografia da região interior do aparato experimental da flash-fotólise que evidencia a geometria ortogonal entre feixes de bombeio e análise. ....35
- Figura 7- Exemplo de um espectro de absorção de uma porfirina da região do visível.....39
- Figura 8- Estrutura do anel porfírico. ....41
- Figura 9- Divisão dos domínios e subdomínios da estrutura da BSA: subdomínio I (azul); subdomínio II (magenta); subdomínio III (ciano). ....47
- Figura 10- Estrutura tridimensional de albuminas séricas [(a) HSA e (b) BSA], com resíduos de triptofano mostrados na cor verde. ....48
- Figura 11- Estruturas químicas das porfirinas monocatiônicas utilizadas neste estudo:  $\text{H}_2\text{MPyP}$  (a),  $\text{PtMPyP}$  (b),  $\text{PdMPyP}$  (c) e  $\text{RuMPyP}$  (d). ....51
- Figura 12- Espectros de absorção UV-vis em DMSO das porfirinas  $\text{H}_2\text{MPyP}$ ,  $\text{PdMPyP}$ ,  $\text{PtMPyP}$  e  $\text{RuMPyP}$ . O detalhe amplia a região das bandas Q entre 450 e 700 nm. ....59
- Figura 13- Espectros de absorção no UV-Vis da porfirina monocatiônica  $\text{RuMPyP}$ , destacando as bandas características (Soret e Q). ....60
- Figura 14- Espectros de absorção na banda Q das porfirinas em diferentes concentrações: a)  $\text{H}_2\text{MPyP}$ , b)  $\text{PdMPyP}$ , c)  $\text{PtMPyP}$  e d)  $\text{RuMPyP}$ . O detalhe inserido mostra a dependência linear da absorvância em relação à concentração. Todas as medições foram realizadas utilizando DMSO como solvente. ....61

|  |    |
|--|----|
| Figura 15- Espectros de absorção na banda de Soret das porfirinas em diferentes concentrações: a) H <sub>2</sub> MpyP, b) PdMpyP, c) PtMpyP e d) RuMpyP. O detalhe inserido mostra a dependência linear da absorbância em relação à concentração. Todas as medições foram realizadas utilizando DMSO como solvente. ....   | 62 |
| Figura 16 - Espectros de absorção para avaliação da estabilidade das porfirinas PdMpyP e PtMpyP em diferentes dias.....  | 64 |
| Figura 17- Espectros de absorção da RuMpyP (a) e da H <sub>2</sub> MpyP (b) registrados em diferentes dias para avaliação de sua estabilidade.....   | 65 |
| Figura 18 - (a) Espectros de fluorescência normalizados das porfirinas estudadas após excitação a 514 nm. (b) Curvas de decaimento da fluorescência das porfirinas registradas após excitação a 441 nm. ....   | 66 |
| Figura 19 - Espectros de emissão fosforescente do <sup>1</sup> O <sub>2</sub> produzido pelas porfirinas. ....   | 68 |
| Figura 20 - Curvas de Cinética de Decaimento do estado triplete T <sub>1</sub> da PdMpyP, para diferentes energias de pulso de excitação.....  | 71 |
| Figura 21- ΔA <sub>0</sub> em função da energia do pulso de laser para todas as porfirinas estudadas. ..   | 71 |
| Figura 22- Absorção transiente (ΔA) em função da energia do pulso de excitação da luz de bombeio: (a) TPP; (b) H <sub>2</sub> MpyP, (c) PdMpyP e (d) PtMpyP e e) RuMpyP. Os insets apresentam a variação de ΔA da amostra com o ΔAs do padrão. ....  | 72 |
| Figura 23- Superposição da melhor pose de encaixe para interação entre (A) BSA: H <sub>2</sub> MpyPor, (B) BSA: PdMpyPor, (C) BSA: PtMpyPor e (D) BSA: RuMpyPor nos subdomínios IIA, IIIA e IB. ....   | 77 |
| Figura 24- Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para à interação entre o composto BSA e as porfirinas de (a) H <sub>2</sub> MpyP, (b) PdMpyP, (c) PtMpyP e (d) RuMpyP, a 298 K em uma solução de mistura DMSO (5%)/PBS (pH 7,4). Os insets mostram os diagramas de Stern-Volmer para as interações com BSA. A concentração dos compostos variou de 0 à 18 μM, e a BSA apresentou concentrações fixas em 5,0 μM. .... | 78 |
| Figura 25- Gráficos de decaimento de fluorescência normalizados entre a BSA e as porfirinas estudadas, em solução de DMSO (5%) / tampão PBS (pH 7,4), com excitação em λ = 284 nm (fonte NanoLED). ....  | 81 |
| Figura 26 - Ensaios de fotooxidação de BSA em solução de DMSO/PBS (1:1) na presença de porfirinas usando um comprimento de onda de excitação de 290 nm.....  | 83 |
| Figura 27- Intensidade de fluorescência normalizada da BSA a 340 nm (λ <sub>exc</sub> = 295 nm) em função do tempo de irradiação.....  | 84 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) do oxigênio no estado excitado singleto ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) e no estado fundamental tripleto ( $^3\Sigma_g^-$ ). ..... 32
- Tabela 2- Transições eletrônicas das porfirinas estudadas por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, em DMSO. .... 63
- Tabela 3- Tempo de vida  $S_1$  ( $\tau S_1$ ) e rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_F$ )..... 67
- Tabela 4- Comparação determinados  $\Phi_{\Delta}$  por este trabalho usando como padrão a TPP..... 69
- Tabela 5- Parâmetros fotofísicos das porfirinas estudadas em DMSO: tempo de vida  $T_1$ ( $\tau T_1$ ); tripleto ( $\Phi_T$ ) e conversão interna ( $\Phi_{ic}$ ); constantes de taxa de decaimento radiativo ( $k_r$ ), cruzamento intersistema ( $k_{isc}$ ) e interconversão ( $k_{ic}$ )..... 73
- Tabela 6- Coeficientes de partição na mistura n-octanol/água ( $\log P_{ow}$ ) das porfirinas estudadas. .... 74
- Tabela 7- Valores de pontuação de encaixe molecular (adimensional) para a interação BSA:  $H_2MPyP$  /  $PdMPyP$  /  $PtMPyP$  /  $RuMPyP$ . .... 76
- Tabela 8- Parâmetros de ligação da BSA das porfirinas estudadas: supressão (Q%), constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), constante de taxa de supressão de Stern-Volmer bimolecular ( $k_q$ ), constante de associação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), número de fluoróforos (f) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ )..... 79
- Tabela 9- Parâmetros resolvidos no tempo de BSA com porfirinas em DMSO (5%) /PBS (pH 7,4). [BSA] = 5,0  $\mu M$ ; [porfirinas] = 18  $\mu M$ ;  $\lambda_{exc}$  = 284 nm (NanoLED)..... 81

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| ${}^1\text{O}_2$                    | <i>Oxigênio singleto</i>   |
| ${}^1\Delta_g$                      | <i>Estado singleto delta g</i>   |
| ${}^1\Sigma_g^+$                    | <i>Estado singleto sigma g mais</i>  |
| ${}^3\Sigma_g^-$                    | <i>Estado tripleto sigma g menos</i>   |
| <i>A</i>                            | <i>Absorbância</i>   |
| <i>A<sub>em</sub></i>               | <i>Absorbância nos comprimentos de onda de emissão</i>                             |
| <i>A<sub>exc</sub></i>              | <i>Absorbância nos comprimentos de onda de excitação</i>                           |
| <i>A<sub>org</sub></i>              | <i>Absorbância máxima da banda de Soret na fase orgânica</i>                       |
| <i>A<sub>aq</sub></i>               | <i>Absorbância máxima da banda de Soret na fase aquosa</i>                         |
| <i>A<sub>ex</sub><sup>s</sup></i>   | <i>Absorbância de um composto padrão no comprimento de onda de excitação</i>       |
| <i>A<sub>T</sub></i>                | <i>Absorbância das espécies no estado tripleto</i>                                 |
| <i>A<sub>S</sub></i>                | <i>Absorbância das espécies no estado singleto</i>                                 |
| <i>A<sub>ex</sub></i>               | <i>Absorbância da amostra no comprimento de onda de excitação</i>                  |
| <i>A<sub>0</sub></i>                | <i>Absorbância da solução da amostra antes da incidência do pulso de excitação</i> |
| <i>BSA</i>                          | <i>Albumina sérica bovina</i>  |
| <i>c</i>                            | <i>Concentração da espécie absorvedora de luz</i>                                  |
| <i>C</i>                            | <i>Concentração molar (mol·L<sup>-1</sup>)</i>                                     |
| <i>C<sub>S</sub></i>                | <i>Concentração das espécies no estado singleto</i>                                |
| <i>C<sub>T</sub></i>                | <i>Concentração das espécies no estado tripleto</i>                                |
| <i>C<sub>0</sub></i>                | <i>Concentração inicial da amostra</i>   |
| <i>C<sub>S</sub></i>                | <i>Concentração inicial do composto padrão</i>                                     |
| <i>EROs</i>                         | <i>Espécies reativas de oxigênio</i>   |
| <i>FS</i>                           | <i>Fotossensibilizador</i>   |
| <i>H<sub>2</sub>MPyP</i>            | <i>meso-5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina</i>                             |
| <i>HOMO</i>                         | <i>Orbital molecular ocupado de maior energia</i>                                  |
| <i>HSA</i>                          | <i>Albumina sérica humana</i>  |
| <i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i> | <i>Dihidrogenofosfato de potássio</i>  |
| <i>K<sub>b</sub></i>                | <i>Constante de ligação fluorescente</i>   |
| <i>K<sub>SV</sub></i>               | <i>Constante de extinção de Stern-Volmer</i>                                       |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| $k_q$                                | Constante de taxa de extinção bimolecular   |
| $K_a$                                | Constante de associação de Stern-Volmer modificada                                |
| $k$                                  | Constante de velocidade de degradação   |
| $k_{ci}$                             | Constante cinética de conversão interna   |
| $k_{cis}$                            | Constante cinética de cruzamento intersistemas                                    |
| $k_r$                                | Constante cinética de decaimento radiativo  |
| $K_T$                                | Constante de decaimento do estado tripleto  |
| <b>LFF</b>                           | Laser flash-fotólise  |
| <b>LUMO</b>                          | Orbital molecular ocupado de menor energia  |
| <b>M</b>                             | Multiplicidades totais dos spins eletrônicos                                      |
| <b>MHz</b>                           | Mega-hertz  |
| $n$                                  | Índice de refração do solvente  |
| <b>nm</b>                            | Nanômetros  |
| $n_0$                                | Número total de fótons presentes no pulso de excitação                            |
| $n_{1O_2}$                           | Número de moléculas de $^1O_2$ geradas  |
| $n_{abs}$                            | Número de moléculas absorvedoras  |
| $n_{abs}^{fótons}$                   | Número de fótons absorvidos   |
| $n_{fl}$                             | Número de fótons emitidos pela molécula via fluorescência                         |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Hidrogenofosfato de sódio   |
| <b>O<sub>2</sub></b>                 | Gás oxigênio  |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>     | Ânion superóxido  |
| <b>PBS</b>                           | Tampão fosfato  |
| <b>log P<sub>ow</sub></b>            | Coefficiente de partição na mistura n-octanol/água                                |
| <b>PtMPyP</b>                        | meso-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bipiridil-platina(II)            |
| <b>PdMPyP</b>                        | meso-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bipiridil-paládio(II)            |
| <b>RuMPyP</b>                        | meso-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bis(bipiridil)-cloro-rutênio(II) |
| <b>S</b>                             | Momentos angulares totais de spin dos elétrons                                    |
| <b>S<sub>0</sub></b>                 | Estado eletrônico singleto não excitado   |
| <b>S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub></b> | Estados eletrônicos singleto excitado   |
| <b>S<sub>n</sub></b>                 | Estados eletrônicos singletos   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| $T_1$              | <i>Estado eletrônico triplo excitado / estado tripleto</i>   |
| <b>TFD</b>         | <i>Terapia fotodinâmica</i>  |
| <b>TPP</b>         | <i>5,10,15,20-tetrafenil-21h,23h-porfirina</i>   |
| $\tau_f$           | <i>Tempos de vida da fluorescência</i>   |
| $\tau_{s1}$        | <i>Tempo de vida do estado singleto excitado s1</i>  |
| $\tau_T$           | <i>Tempo de vida do estado tripleto</i>  |
| $\tau_n$           | <i>Tempo de vida de transições entre estados excitados</i>   |
| $V$                | <i>Volume</i>  |
| $V_{org}$          | <i>Volume final da fase orgânica</i>   |
| $V_{aq}$           | <i>Volume final da fase aquosa</i>   |
| $Xe$               | <i>Xenônio</i>   |
| <b>UV-vis</b>      | <i>Ultravioleta-visível</i>  |
| $\cdot OH$         | <i>Radical hidroxila</i>   |
| $\cdot OOH$        | <i>Hidroperoxil</i>  |
| $\Delta A$         | <i>Absorção transiente</i>   |
| $\Delta A_0$       | <i>Amplitude da curva de absorção transiente imediatamente no instante após o pulso de excitação da amostra</i>            |
| $\Delta A^s$       | <i>Absorção transiente de um padrão</i>  |
| $\Delta A_0^s$     | <i>Amplitude da curva de absorção transiente imediatamente no instante após o pulso de excitação de um composto padrão</i> |
| $\Delta A_f$       | <i>Absorção transiente no final do experimento</i>   |
| $\Delta A_i$       | <i>Absorção transiente no início do experimento</i>  |
| $\Delta A_{max}$   | <i>Absorção transiente máxima</i>  |
| $\Delta A_{max}^s$ | <i>Absorção transiente máxima de um composto padrão</i>  |
| $\Phi$             | <i>Rendimento quântico</i>   |
| $\Phi_T$           | <i>Rendimento quântico de formação de estados tripleto</i>   |
| $\Phi_{\Delta}$    | <i>Rendimento quântico de formação de oxigênio singleto</i>  |
| $\Phi_f$           | <i>Rendimento quântico de fluorescência</i>  |
| $\Phi_n$           | <i>Rendimento quântico de fluorescência de composto padrão</i>   |
| $\Phi_T^s$         | <i>Rendimento quântico de tripleto de um composto padrão</i>   |
| $\gamma_{\Delta}$  | <i>Eficiência de geração de oxigênio singleto</i>  |
| $\epsilon$         | <i>Coefficiente de absortividade molar</i>   |

|                |  |
|----------------|--|
| $\epsilon_s$   | <i>Coeficiente de absorvidade molar do estado singleto</i>   |
| $\epsilon_t$   | <i>Coeficiente de absorvidade molar do estado tripleto</i>   |
| $\lambda$      | <i>Comprimento de onda da radiação</i>                       |
| $\lambda_{an}$ | <i>Comprimento de onda da luz de análise</i>                 |
| $t$            | <i>Tempo</i>   |
| $tg \theta$    | <i>Coeficiente angular ou inclinação de uma reta</i>         |
| $I_{fl}$       | <i>Integral ou área do espectro de emissão fluorescente</i>  |
| $I_{fos}$      | <i>Integral ou área do espectro de emissão fosforescente</i> |
| $I_1$          | <i>Intensidade do sinal antes do pulso de bombeio</i>        |
| $I_2$          | <i>Intensidade do sinal após o pulso de bombeio</i>          |
| $l$            | <i>Caminho óptico da amostra</i>                             |

## SUMÁRIO

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>1</b>    | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>2</b>    | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>23</b> |
| <b>3</b>    | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Diagrama de Jablonski</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>3.3</b>  | <b>Metodologia experimental referente à caracterização fotofísica.</b> .....                          | <b>28</b> |
|             | 3.3.1 <i>Absorção da luz e determinação do coeficiente de absorvidade molar.</i> .....                | 28        |
|             | 3.3.2 <i>Emissão de fluorescência e determinação do rendimento quântico de fluorescência</i><br>..... | 29        |
| <b>3.4.</b> | <b>Métodos espectroscópicos para detecção de oxigênio singlete</b> .....                              | <b>31</b> |
|             | 3.4.1 <i>Mecanismos de geração de oxigênio Singlete</i> .....   | 31        |
| <b>3.5</b>  | <b>Espectroscopia de Absorção Transiente e seu uso para monitoramento de estados tripletos</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>3.6</b>  | <b>Porfirinas</b> .....   | <b>39</b> |
|             | 3.6.1 <i>Aspectos Estruturais</i> .....   | 40        |
|             | 3.6.2 <i>Porfirinas Monocâtionicas</i> .....  | 42        |
| <b>3.7</b>  | <b>O uso da lâmpada halógena para avaliar a degradação da seroalbumina</b> .....                      | <b>45</b> |
|             | 3.7.1 <i>Seroalbumina</i> .....   | 45        |
| <b>4</b>    | <b>METODOLOGIA</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Síntese e preparo das soluções</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>4.3</b>  | <b>Espectroscopia de Fluorescência</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>Coeficiente de partição na mistura n-octanol/água (<math>P_{ow}</math>)</b> .....                  | <b>53</b> |
| <b>4.5</b>  | <b>Determinação do tempo de vida de tripleto e rendimento de tripleto</b> .....                       | <b>53</b> |
| <b>4.6</b>  | <b>Determinação de rendimento de formação de oxigênio singlete (<math>\Phi\Delta</math>)</b> .....    | <b>54</b> |
|             | 4.6.1 <i>Método Direto</i> .....  | 54        |
| <b>4.7</b>  | <b>Ensaio BSA</b> .....   | <b>54</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.7.1      | <i>Procedimento de encaixe molecular</i> .....   | 54        |
| 4.7.2      | <i>Degradação da BSA e constante de Stern-Volmer</i> .....   | 55        |
| 4.7.3      | <i>Propriedades de ligação de BSA por análise de emissão</i> .....   | 56        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis</b> .....   | <b>59</b> |
| 5.1.1      | <i>Absortividade molar</i> .....   | 59        |
| <b>5.2</b> | <b>Análise da influência do tempo na estabilidade das porfirinas em solução</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Determinação do rendimento quântico de fluorescência (<math>\Phi_F</math>)</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Determinação direta do rendimento de formação de oxigênio singleto (<math>\Phi_\Delta</math>)</b> .....                                   | <b>67</b> |
| 5.5        | <i>Determinação do tempo de vida de tripleto e rendimento de tripleto (<math>\Phi_T</math>)</i> .....  | 70        |
| 5.6        | <i>Ensaio de determinação do coeficiente de partição (<math>P_{ow}</math>)</i> .....   | 74        |
| <b>5.7</b> | <b>Ensaio de ligação de BSA</b> .....  | <b>75</b> |
| 5.7.1      | <i>Análise de encaixe molecular para BSA: <math>H_2MPyP</math>, <math>PtMPyP</math>, <math>PdMPyP</math> e <math>RuMPyP</math>.</i><br>..... | 75        |
| 5.7.2      | <i>Análise de emissão de fluorescência em estado estacionário</i> .....  | 78        |
| 5.7.3      | <i>Análise de fluorescência síncrona (SF)</i> .....  | 80        |
| 5.7.4      | <i>Análise de fluorescência resolvida no tempo</i> .....   | 80        |
| 5.8        | <i>Oxidação fotodinâmica de BSA e constante de Stern-Volmer.</i> .....   | 81        |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>85</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>88</b> |

# Capítulo I

## Introdução

*Este capítulo aborda a Terapia Fotodinâmica, suas definições, aplicações e os avanços recentes na área, com foco no uso de fotossensibilizadores e no tratamento de doenças como o câncer.*

## 1 INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD), ou *Photodynamic Therapy* (PDT), tem se consolidado como uma modalidade terapêutica promissora e pouco invasiva no tratamento de diversos tipos de câncer e microrganismos. Ela envolve o uso combinado de três elementos: uma molécula orgânica fotossensibilizadora (FS), a luz visível e o oxigênio molecular (que normalmente está presente nos tecidos e meio reacional). Quando o fotossensibilizador (FS) é ativado pela luz, ele pode formar espécies reativas que desempenham um papel crucial na indução de danos oxidativos seletivos às células ou tecidos-alvo, de forma localizada e precisa. Essas espécies químicas são amplamente estudadas por sua relevância na terapia fotodinâmica (Bakun et al., 2024; Plaetzer et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas tais como radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (Sies; Jones, 2020). Os EROs desempenham papéis cruciais em processos biológicos, como na sinalização celular e na defesa contra patógenos. No entanto, em níveis excessivos, podem causar danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Dhalla; Temsah; Netticadan, 2000). O equilíbrio entre a produção e a remoção de EROs é fundamental para a manutenção da saúde, sendo que antioxidantes, tanto endógenos quanto exógenos, desempenham um papel vital na neutralização dessas espécies (Fujii; Homma; Osaki, 2022).

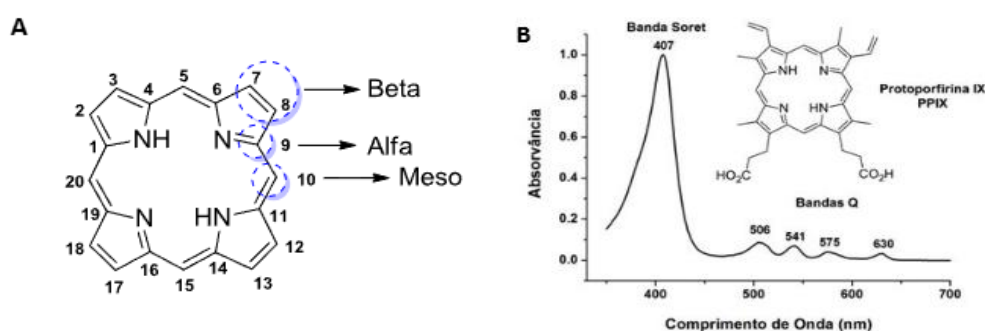
A TFD tem se destacado como uma abordagem inovadora e eficaz em várias aplicações clínicas. Originalmente reconhecida pelo seu uso na oncologia, utiliza agentes fotossensibilizadores ativados por luz para destruir células cancerosas de maneira seletiva, minimizando os danos aos tecidos circundantes (Aebisher et al., 2024). Além do tratamento de tumores, a TFD tem sido amplamente aplicada na dermatologia, oferecendo soluções para condições como acne, rosácea e lesões precoces de câncer de pele, com resultados positivos e efeitos colaterais limitados (Kalka et al., 2000). Na oftalmologia, a terapia é utilizada para tratar doenças como a degeneração macular relacionada à idade, contribuindo para a preservação da visão em pacientes, especialmente quando combinada com outras terapias (Su et al., 2018).

Quanto a escolha dos corantes FS para utilização em TFD, deve ser baseada em suas características físico-químicas, como alta absorção de luz e geração de EROS, baixa toxicidade no escuro, elevada estabilidade, fácil obtenção e preferencialmente baixo custo (Silva et al., 2018). As propriedades ideais incluem seletividade e acúmulo preferencial em células tumorais, baixa toxicidade na ausência de luz, absorção eficiente da luz na faixa de 600 a 800 nm, caráter

anfífilico, elevada eficiência quântica na produção de oxigênio singlete e rápida eliminação do organismo do paciente (Przygoda et al., 2023). Dentre os FS que detêm essas características, pode-se destacar: moléculas baseadas em núcleos tetrapirrólicos como as porfirinas, clorinas e bacterioclorinas; derivados de xantenos (Rosa bengala); fenotiazínicos tais como azul de toluidina e azul de metileno, acridinas; dentre outras.

As porfirinas são moléculas orgânicas fotossensibilizadoras que apresentam características distintas, como geometrias rígidas e planas, elevada estabilidade em condições de temperatura e pH variados, facilidade de oxidação e redução, simetria intrínseca, além de propriedades eletrônicas e redox que podem ser facilmente ajustadas (Vinodh et al., 2012). Fazem parte de um grupo de compostos tetrapirrólicos que apresentam importantes propriedades químicas e físicas. As propriedades fotofísicas são fortemente dependentes da presença de íons metálicos em seu anel central (Bastos et al., 2012). Possuem heterociclos aromáticos constituídos por quatro unidades pirrólicas unidas através de pontes meso-metínicas (Figura 1 A) e apresentam bandas de absorção características na região do visível. Estes compostos possuem, em geral, uma banda de maior intensidade na região de 400 nm, denominada banda Soret (Figura 1 B), e outras de menor intensidade localizadas em maiores comprimentos de onda (500-650 nm - bandas Q) (Oliveira et al., 2015).

Figura 1- Estrutura geral de uma porfirina (1 A) e exemplo de um espectro de absorção de uma porfirina da região do visível (1 B).



Fonte: Oliveira et al., 2015.

A eficiência a TFD está associada às suas propriedades físico-químicas e fotofísica tais como sua lipofilicidade e propriedades de estados excitados como produção de estados tripletos e produção de EROS (Tasso et al., 2017).

Os estados tripletos, gerados a partir do estado excitado dos fotossensibilizadores, atuam como intermediários que podem interagir com substratos biológicos, promovendo reações que

geram radicais livres (Bagnato et al., 2023). Também podem transferir energia ao oxigênio molecular, originando o oxigênio singlete, principal mediador do dano fotoquímico causado aos microrganismos por muitos fotossensibilizadores, que pode provocar uma série de reações bioquímicas que levam à morte de células (Ronsein et al., 2006)

A procura pela síntese de novos compostos fotossensibilizadores tem se tornado uma área em constante evolução, com o intuito de desenvolver moléculas mais eficazes e específicas para a TFD. Pesquisadores têm concentrado esforços na modificação das estruturas moleculares dos FS existentes, visando aprimorar suas propriedades fotofísicas, como a absorção em comprimentos de onda terapêuticos e a eficiência na geração de radicais livres. Estudos indicam que compostos com estruturas químicas otimizadas podem aumentar significativamente a seletividade em células-alvo, resultando em tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Essa abordagem não apenas expande o potencial da TFD em aplicações clínicas, como no tratamento de câncer e doenças dermatológicas, mas também abre novas perspectivas para pesquisas em áreas como terapia antimicrobiana e regeneração tecidual (Abrahamse e Hamblin, 2016; Zhou et al., 2020; Lin et al., 2021). A lipofilicidade é um parâmetro crucial, pois influencia diretamente o desempenho dos fotossensibilizadores. Ela afeta a capacidade de permeação pelas membranas celulares, a distribuição nos tecidos e a interação com componentes lipídicos. Portanto, ajustar a lipofilicidade dentro de uma faixa ideal é essencial para alcançar um equilíbrio entre solubilidade, seletividade, estabilidade e eficácia terapêutica. (Ethirajan et al., 2011).

As porfirinas podem ser modificadas para se tornarem catiônicas pela adição de substituintes positivamente carregados nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico, afetando sua capacidade de interação com células microbianas. A hidrofobicidade dessas moléculas pode ser ajustada pelo número de grupos catiônicos ou pela introdução de cadeias hidrocarbonadas de diferentes comprimentos nos nitrogênios amino. Porfirinas catiônicas apresentam potencial para inativar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, sendo que diferentes distribuições de carga influenciam diretamente sua eficácia, assim como a natureza dos grupos *meso*-substituintes na periferia do macrociclo (Alves et al., 2009). Nesse contexto, porfirinas que apresentam uma única carga positiva (monocatiônicas) destacam-se por favorecer a interação com membranas celulares carregadas negativamente, especialmente em células tumorais (Yin et al., 2024). Essas moléculas são promissoras em terapias combinadas, como as imunoterapias, pois sua baixa densidade de carga, aliada à considerável lipofilicidade, facilita a penetração nas membranas celulares e potencializa a eficácia no tratamento de células cancerosas (Sharma; Sengupta, 2023).

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo e uma das principais responsáveis pelo transporte e armazenamento de diversas moléculas endógenas e exógenas, como ácidos graxos de cadeia longa, bilirrubina e íons metálicos. Além disso, desempenha papel fundamental na manutenção da pressão coloidal osmótica do sangue e na regulação do equilíbrio osmótico plasmático (Behera et al., 2023).

Trata-se de uma proteína altamente solúvel, estável e de fácil isolamento em grandes quantidades, o que a torna amplamente utilizada em estudos bioquímicos e farmacológicos. Sua estrutura secundária é rica em resíduos de cistina, predominantemente organizados em hélices alfa, característica que contribui para sua robustez estrutural e resistência à desnaturação (Bezerra et al., 2024; Chaves et al., 2019).

A BSA é também uma das proteínas mais estudadas devido à sua alta homologia estrutural com a albumina sérica humana (HSA), o que a torna um modelo experimental adequado para investigar interações entre proteínas e diferentes ligantes, incluindo fármacos e fotossensibilizadores (Chaves et al., 2019; Belatik et al., 2012).

O estudo da interação entre albumina e fotossensibilizadores, bem como dos processos de foto-oxidação resultantes, é fundamental para compreender a biodisponibilidade, distribuição e eficácia terapêutica desses compostos em sistemas biológicos. O estudo desta interação pode modular a atividade dos fotossensibilizadores por meio de interações específicas que afetam sua localização, estabilidade e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (Samperi et al., 2023; Yu et al., 2022; Simone; Mais; Ascenzi, 2021; Bezerra et al., 2024). Além disso, a avaliação da foto-oxidação da albumina fornece um modelo experimental sensível para investigar a eficiência fotodinâmica dos compostos e oferece *insights* sobre possíveis efeitos oxidativos colaterais em proteínas circulantes (Cavalcante et al., 2009; Alonso et al., 2016). Portanto, investigar essas interações é essencial para o desenvolvimento racional de fotossensibilizadores mais seguros e eficazes para a terapia fotodinâmica.

O objetivo geral deste trabalho é realizar a caracterização fotofísica de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e investigar sua capacidade de interagir e fotooxidar a BSA, utilizada como proteína modelo. Dessa forma, os resultados aqui apresentados buscam ampliar a compreensão das relações entre estrutura e propriedade em metaloporfirinas monocatiônicas, com vistas a orientar o desenvolvimento de fotossensibilizadores altamente eficientes para PDT e aplicações correlatas.

# Capítulo II

## Objetivos

*Neste capítulo serão apresentados os objetivos gerais e específicos.*

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização fotofísica de porfirinas monocatiônicas de Pd(II), Pt(II) e Ru(II) e avaliar sua interação com albumina sérica bovina. Destacamos os seguintes objetivos específicos:

- I. Determinação dos coeficientes de absorção das bandas de absorção das porfirinas via espectro de UV-Vis;
- II. Determinar os rendimentos quânticos de fluorescência;
- III. Analisar os rendimentos quânticos de formação de estados tripletos, e os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete;
- IV. Avaliar a solubilidade através de ensaio de coeficiente de partição;
- V. Analisar a interação destes compostos com biomoléculas (BSA) via técnicas espectroscópicas, bem como através de cálculos de *docking molecular*;
- VI. Avaliar as propriedades fotodinâmicas na degradação da albumina sérica bovina (BSA) utilizando lâmpada halógena.

# Capítulo III

## Fundamentação Teórica

*Este capítulo abordará fundamentos teóricos da fotofísica e seus fenômenos associados. Além disso, serão explorados os princípios e os aspectos gerais das técnicas espectroscópicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.*

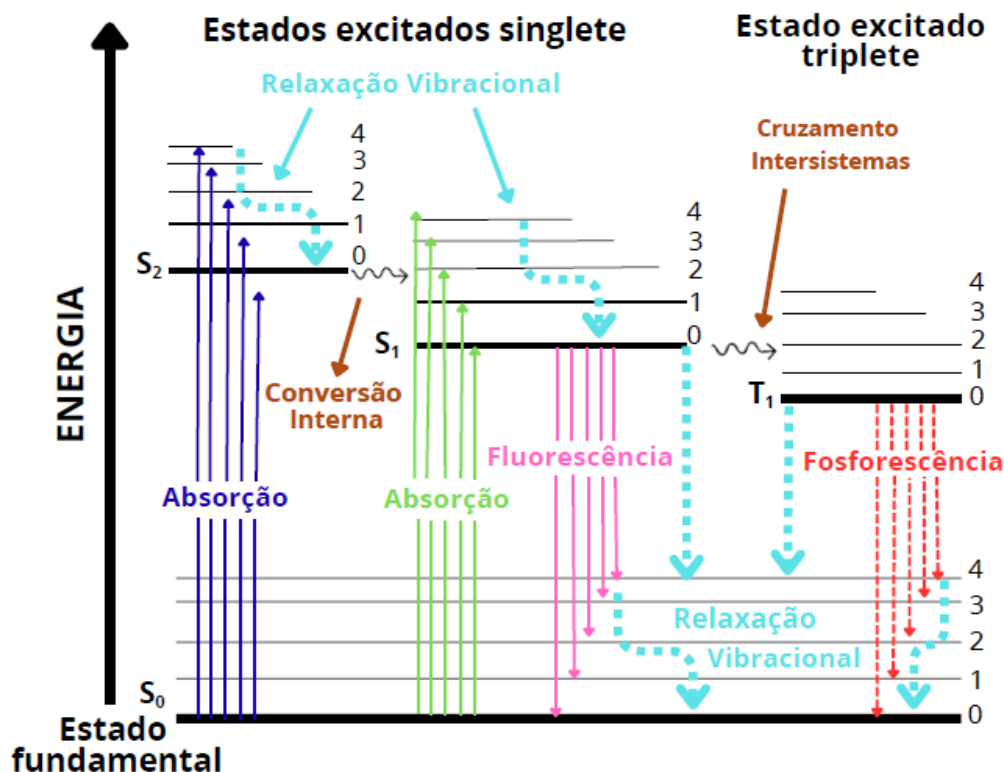
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Diagrama de Jablonski

Em 1933, o físico polonês Alexander Jablonski introduziu o Diagrama de Jablonski, uma representação gráfica que detalha os níveis de energia de uma molécula e os processos que ocorrem durante a absorção e emissão de luz.

O diagrama de Jablonski, representado na Figura 2, é constituído por estado eletrônico singlete não excitado ( $S_0$ ), estados eletrônicos singlete excitado ( $S_1$  e  $S_2$ ) e estado eletrônico tripleto excitado ( $T_1$ ), sendo que cada estado eletrônico apresenta níveis vibracionais, classificados por números quânticos: 0, 1, 2, .... As linhas horizontais mais espessas correspondem a níveis eletrônicos, e as linhas menos espessas aos níveis vibracionais; as transições verticais entre os níveis eletrônicos estão associadas às energias dos orbitais moleculares. Após absorver um fóton, a molécula do FS pode transitar do estado fundamental ( $S_0$ ) para o estado excitado singlete ( $S_1$  ou  $S_2$ ). Esse processo de absorção de luz ocorre muito rapidamente, sendo da ordem de  $10^{-15}$  segundos. No estado excitado, o FS pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton por meio de processos radiativos (fluorescência), representados pelas setas retas, ou não-radiativos (relaxação vibracional, conversão interna (CI)) ou pode ainda inverter seu spin através do processo de cruzamento intersistemas (CIS) que são representados por setas onduladas e passar do estado  $S_1$  para o estado excitado tripleto ( $T_1$ ). A relaxação vibracional é a transição entre níveis vibracionais de maior para menor energia dentro do mesmo estado eletrônico excitado, enquanto a conversão interna envolve a passagem entre estados eletrônicos excitados de mesma multiplicidade de spin. Esses processos ocorrem em tempos da ordem de  $10^{-12}$  segundos — significativamente mais rápidos que a fluorescência, que ocorre tipicamente em torno de  $10^{-8}$  segundos. Como consequência, os processos não radiativos geralmente precedem a emissão, promovendo a fluorescência a partir do nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado  $S_1$  (Lakowicz, 2006; Cugnasca e Santos, 2021).

Figura 2- Diagrama de Jablonski mostrando: absorção, CI (conversão interna), fluorescência, CIS (cruzamento intersistemas) e fosforescência.



Fonte: Adaptado de Cugnasca e Santos, 2021.

A diferença entre os estados singlete e tripleto está relacionada à multiplicidade total de spin ( $M$ ), que depende do momento angular total de spin dos elétrons ( $S$ ). Essa multiplicidade é determinada pela equação:

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

Se os elétrons estiverem em um mesmo nível de energia eles podem apresentar tantas orientações de spin paralelas quanto antiparalelas. Segundo a Regra de Hund, a configuração antiparalela corresponde a de menor energia. No estado singlete, os spins dos elétrons estão emparelhados em sentidos opostos, o que leva ao cancelamento de seus momentos de spin e resulta em uma multiplicidade eletrônica igual a 1, conforme representado na equação 1. Em contraste, no estado tripleto, os spins se alinham paralelamente, somando seus momentos e originando uma multiplicidade igual a 3. Do ponto de vista energético, o estado tripleto apresenta uma energia ligeiramente inferior à do estado singlete. Esse comportamento está de acordo com a Regra de Hund e é atribuído à correlação de spins. Quando os elétrons possuem

spins paralelos, como no estado  $T_1$ , há uma tendência de maior separação entre eles, o que reduz a repulsão eletrostática. Essa diminuição da repulsão permite uma contração da nuvem eletrônica, aumentando a atração entre os elétrons e o núcleo. Como consequência, ocorre uma estabilização do sistema, com a diminuição da energia total associada ao estado tripleto (Atkins; Paula, 2008).

Dada a alta reatividade e a curta meia-vida tanto das espécies reativas de oxigênio quanto do oxigênio singlete, os efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica restringem-se a estruturas celulares próximas ao local onde essas espécies são geradas - geralmente em um raio de até 20 nanômetros. Nesse sentido, a correta localização do fotossensibilizador no tecido é determinante para a eficácia do tratamento, garantindo uma ação seletiva sobre as células-alvo (Calixto et al., 2016).

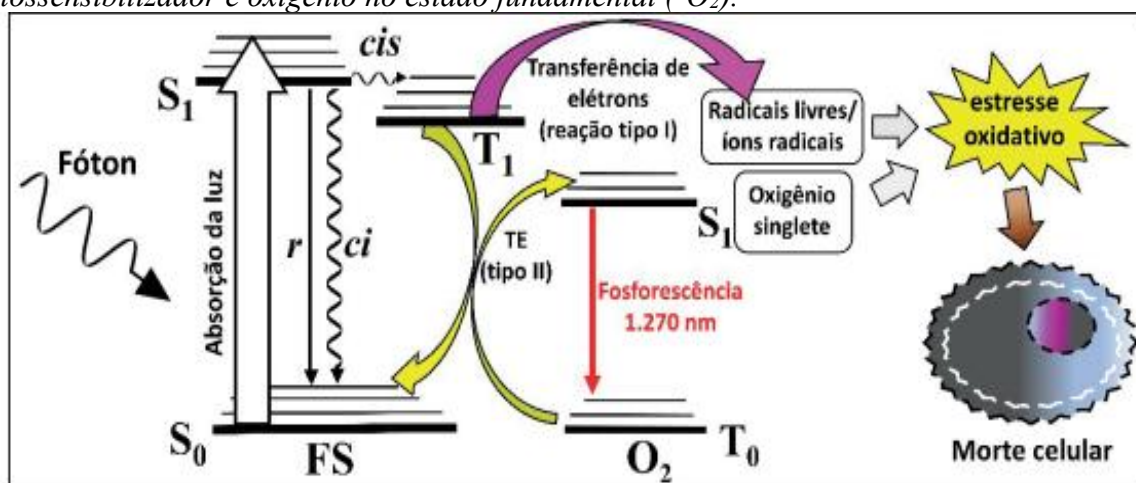
Além de visualizar as interações de absorção e emissão de luz, o diagrama também enfatiza fenômenos como a conversão interna e o cruzamento intersistemas, que são cruciais para entender a dinâmica molecular em processos fotofísicos e fotodinâmicos. Essa compreensão é particularmente relevante no contexto da terapia fotodinâmica, onde a eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio depende da dinâmica dos estados excitados e das transições associadas (Valeur, 2001; Atvars; Martelli, 2002).

No estado tripleto, a molécula pode retornar à  $S_0$  por um novo processo de cruzamento intersistemas seguindo pela relaxação vibracional ou pela emissão de fosforescência (radiativo). Diferente da fluorescência, a fosforescência ocorre em tempos muito mais longos, variando de  $10^{-3}$  a  $10^0$  segundos, e apresenta, em geral, comprimentos de onda maiores. Por ser uma transição eletrônica proibida, ela pode ocorrer devido ao acoplamento spin-órbita, que é favorecida em compostos que contêm átomos pesados, como bromo ou iodo. Além disso, condições como baixas temperaturas e solventes com maior viscosidade também favorecem a ocorrência da fosforescência (Cugnasca e Santos, 2021; Lakowicz, 2006).

As reações de fotooxidação podem ocorrer através de dois mecanismos que competem entre si, o mecanismo do Tipo I e o mecanismo do Tipo II (Silva et al., 2018). As reações fotoquímicas do Tipo I, envolve transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de uma molécula para outra, já o mecanismo do Tipo II, envolve transferência de energia para o oxigênio molecular. Deve-se notar que ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, mas as proporções relativas podem depender da estrutura do PS e do microambiente. No mecanismo Tipo I, o FS absorve a luz e transfere energia ou elétrons para moléculas próximas, resultando na geração de radicais livres e espécies EROs (Dolmans et al., 2003; Vatansever et al., 2013). Ao captar um elétron, o oxigênio molecular é convertido no ânion-radical superóxido

( $O_2^{\bullet-}$ ). Em meios ácidos, ricos em íons  $H^+$ , esse radical pode ser protonado, originando o radical hidropoxila ( $HOO^{\bullet}$ ). Quando o oxigênio molecular recebe dois elétrons e dois prótons ( $2H^+$ ), forma-se o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); com a adição de três elétrons e três prótons ( $3H^+$ ), é gerado o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (Dąbrowski, 2007; Gutteridge, 1995; Sanchez e Moreno, 2002). Por outro lado, no mecanismo Tipo II, a energia excitada do FS é transferida diretamente para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete, uma forma altamente reativa que pode causar danos celulares, conforme pode ser observado na Figura 3 (Perussi, 2007).

Figura 3- Mecanismos (Tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental ( $^3O_2$ ).



Fonte: Gonçalves et al., 2021.

Ambos os mecanismos são essenciais para a eficácia da terapia fotodinâmica; no entanto, a predominância de um sobre o outro depende das características do FS e das condições experimentais, como a concentração de oxigênio e substratos (Ferreira et al. 2006). A combinação adequada desses elementos não apenas potencializa a eficácia do tratamento, mas também pode reduzir os efeitos colaterais e aumentar a segurança dos pacientes. Assim, a otimização das condições de iluminação e das características dos FS é essencial para o sucesso clínico da TFD.

### 3.3 Metodologia experimental referente à caracterização fotofísica.

#### 3.3.1 Absorção da luz e determinação do coeficiente de absortividade molar.

Quando a luz atravessa uma solução, moléculas ou íons absorvem parte dessa energia e são excitados a estados mais energéticos. O processo de absorção da radiação pode ser descrito através da lei de Lambert-Beer, que mostra a dependência entre a atenuação do feixe incidente

na amostra com a concentração das moléculas, o coeficiente de absorção molar e a extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção prevendo um decaimento exponencial para a intensidade da luz incidente à medida em que o feixe percorre o caminho óptico da amostra (Canassa; Lamonato; Ribeiro, 2018). A lei de Lambert-Beer é escrita em termos da absorbância  $A(\lambda)$ , que depende do comprimento de onda ( $\lambda$ ), concentração da amostra  $c$  e do caminho óptico  $l$  do meio absorvente como mostrado na equação 2 a seguir:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)l.c \text{ (Eq. 2)}$$

Análises na região do UV/Vis são consolidadas por serem rápidas, sensíveis e de baixo custo, além de apresentarem uma excelente precisão. Pode ser usada para avaliações qualitativas e quantitativas em uma gama de aplicações envolvendo desde matrizes ambientais à estudos de estabilidade de compostos, cinética e equilíbrio de reações, assim como na identificação de ligações metálicas (Canassa; Lamonato; Ribeiro, 2018; Borissevitch; Gonçalves; Schaberle, 2015).

### *3.3.2 Emissão de fluorescência e determinação do rendimento quântico de fluorescência*

A fluorescência, de modo geral, é o fenômeno de emissão de luz por determinadas substâncias quando expostas à radiação eletromagnética. Na técnica de espectroscopia de absorção UV/Vis é fornecido informações sobre o primeiro passo dos processos fotofísicos, já na técnica de espectroscopia de fluorescência podemos avaliar os processos de relaxação do estado excitado singleto via emissão radiativa, que dependerá da sua estrutura molecular e que está quase sempre associada ao sistema eletrônico  $\pi$ . Sendo assim, a fluorescência corresponde ao processo inverso do fenômeno da absorção, pois é produzida a partir da emissão de energia do nível mais baixo do primeiro estado singleto excitado. A maioria das moléculas se encontra no nível energético vibracional mais baixo do estado eletrônico  $S_0$  (estado fundamental). A absorção de um quantum de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia. Quando retornam ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida reemitida, sendo este fenômeno conhecido como luminescência. Se a energia é reemitida a partir do primeiro estado singleto excitado ( $S_1$ ), o fenômeno corresponde à fluorescência (Sierra et al., 1996).

A intensidade de fluorescência observada em uma amostra depende não somente da absorção no comprimento de onda de excitação, mas também da geometria de iluminação da

amostra e dos caminhos ópticos percorridos pela luz na excitação e na emissão (Canassa; Lamonato; Ribeiro, 2018). A geometria comumente utilizada é a incidência de luz na face da cubeta sob um ângulo reto, geometria está que também será empregada neste trabalho.

A eficiência da emissão fluorescente pode ser obtida pelo rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ). Este parâmetro é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos por um fluoróforo ou em termos das taxas dos processos que ocorrem. A expressão para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência é dada pela equação 3 a seguir:

$$\Phi_f = \frac{K_f}{K_f + K_{nf}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $K_f$  é a taxa de emissão fluorescente do fluoróforo e  $K_{nf}$  é a taxa de decaimento através de mecanismos não radiativos. No entanto, na prática é mais fácil determinar o rendimento quântico de uma molécula fluorescente pela comparação com padrões de rendimentos quânticos conhecidos, conforme a equação 4 a seguir (Lakowicz, 2006):

$$\Phi_f = \Phi_r \frac{f A_r n_0^2}{f_r A n_{0r}^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Nessa equação  $\Phi_f$  é o rendimento quântico de fluorescência,  $\Phi_r$  é o rendimento quântico fluorescente de referência,  $f$  é a área sob a curva da emissão florescente,  $f_r$  é a área sob a curva da emissão fluorescente do composto padrão de referência,  $A$  é o valor a absorbância da amostra no comprimento de excitação,  $A_r$  a absorção do composto padrão de referência,  $n_0^2$  é o índice de refração do meio e  $n_{0r}^2$  índice de refração do meio de referência.

Os espectros de emissão de fluorescência das porfirinas caracterizam-se pela presença de duas bandas de emissão, usualmente designadas Q (0,0) e Q (0,1), por ordem decrescente de energia (Gouterman, 1961; Uddin, 2012). Como é característico desses compostos, os espectros registrados mostraram uma banda em comprimentos de onda mais curtos, atribuída à transição Q (0,0), seguida por uma banda adjacente correspondente à transição Q (0,1). Ao comparar a intensidade relativa dessas bandas em cada espectro, observa-se que, em todos os casos, a primeira banda é mais intensa que a segunda. A emissão da primeira banda resulta da transição de estados vibrônicos superiores ao estado  $S_1$ , enquanto a segunda banda reflete a emissão de energia proveniente do próprio estado eletrônico (Gouterman, 1978).

A técnica de fluorescência é muito importante, pois fornece informações preciosas sobre o meio em que a molécula se encontra, podendo ser empregada nas formas estática e temporal.

Na forma estática pode-se avaliar o comprimento de onda de emissão ou quantificar a eficiência de emissão fluorescente, enquanto na forma temporal pode-se obter o tempo de vida do estado excitado (Silva et al., 2025).

### 3.4. Métodos espectroscópicos para detecção de oxigênio singlete

#### 3.4.1 Mecanismos de geração de oxigênio Singlete

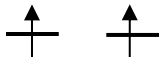

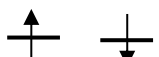
O oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é uma das formas mais reativas de espécies reativas de oxigênio e apresenta forte potencial oxidante devido à ausência da restrição de spin presente no oxigênio molecular em seu estado fundamental. Essa característica permite que o  $^1\text{O}_2$  interaja com outras moléculas com muito mais facilidade, tornando-se um agente altamente danoso para componentes celulares. Sua geração pode ocorrer por diferentes mecanismos: (1) em organismos fotossintéticos, por meio da transferência de energia da luz para pigmentos como a clorofila; (2) em células não fotossintéticas, através da ativação de compostos como flavinas e porfirinas, que atuam como fotossensibilizadores; e (3) por mecanismos independentes da luz, como durante processos inflamatórios, em que o peróxido de hidrogênio reage com ácido hipocloroso gerando  $^1\text{O}_2$ , principalmente em macrófagos ativados. Diversas substâncias químicas, como corantes, herbicidas e certos fármacos, também podem desencadear sua formação (Vatansever et al., 2013).

Pode apresentar-se em dois estados eletrônicos distintos: o singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e o tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Dentre esses, o estado tripleto corresponde à configuração fundamental da molécula e é amplamente encontrado nas células dos organismos vivos. Nessa forma, o oxigênio apresenta baixa reatividade química. Em contraste, o oxigênio no estado singleto caracteriza-se por sua elevada reatividade, sendo capaz de interagir intensamente com outras moléculas e liberar energia durante as reações químicas. Assim, a conversão do oxigênio de seu estado fundamental para o estado excitado singleto pode induzir danos celulares, uma vez que tal transição está associada à geração de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, essa conversão não ocorre de forma espontânea apenas na presença de fótons em um meio contendo oxigênio molecular. Para que ocorra a transferência eficiente de energia e a consequente excitação do oxigênio, é necessária a presença de substâncias fotossensibilizadoras. Essas moléculas atuam como intermediárias, sendo capazes de absorver diretamente fótons de energia adequada e, posteriormente, transferir essa energia ao oxigênio, promovendo sua transição para o estado excitado (Ribeiro et al., 2005).

Devido à sua elevada reatividade frente a grupos orgânicos eletrônicos, o  $^1\text{O}_2$  ataca

preferencialmente moléculas essenciais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA. Diferentemente do oxigênio tripleto (estado fundamental), o  $^1\text{O}_2$  apresenta uma inversão no spin dos elétrons da camada externa, o que permite sua redução direta por dois elétrons, conferindo-lhe um papel central em processos de oxidação celular. A teoria do orbital molecular (TOM) prevê a existência de dois estados excitados possíveis para o  $^1\text{O}_2$ , diferindo apenas na ocupação dos dois orbitais degenerados  $\pi^*$ . O oxigênio no estado fundamental possui, no orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), dois elétrons desemparelhados localizados no orbital  $\pi^* x$  e  $\pi^* y$ . Esses orbitais são degenerados e seus elétrons têm o mesmo spin, de forma a produzir multiplicidade de spin tripleto. Quando o oxigênio molecular tem excesso de energia, os dois elétrons desemparelhados no orbital podem emparelhar-se, gerando o oxigênio singleto. O oxigênio no estado excitado singleto pode apresentar duas formas: o  $^1\Delta_g$  e o  $^1\Sigma_g^+$ , tendo o primeiro estado energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (2-4  $\mu\text{s}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e em solvente aquoso de aproximadamente  $10^{-6}$ , o segundo tendo energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor cerca de ( $10^{-11}$  s) em meio aquoso, decaindo rapidamente para o estado  $^1\Delta_g$ . Conseqüentemente, em razão da maior estabilidade do estado  $^1\Delta_g$ , essa forma é a de maior relevância para sistemas biológicos (Ronsein et al., 2006). Desse modo é a forma  $^1\Delta_g$ , que será denotada por  $^1\text{O}_2$  (Tabela 1).

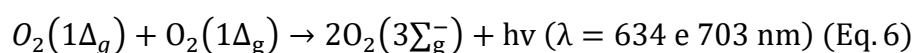
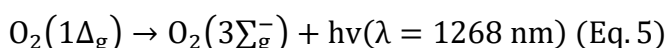
*Tabela 1- Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) do oxigênio no estado excitado singleto ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) e no estado fundamental tripleto ( $^3\Sigma_g^-$ ).*

| Estado      | Ocupação $\pi_x \pi_y$  | Energia (Kcal/mol) | Tempos de vida(s) |
|-------------|---|--------------------|-------------------|
| Fundamental | $^3\Sigma_g^-$<br> |                    |                   |
| Primeiro    | $^1\Delta_g$<br>   | 22,5               | $10^{-6}$         |
| Segundo     | $^1\Sigma_g^+$<br> | 37,5               | $10^{-11}$        |

Fonte: Adaptado de Ronsein et al., 2006.

O decaimento do  $^1\text{O}_2$  ao estado fundamental gera uma emissão de luz em 1268 nm. Esse tipo de emissão é denominado de monomol (Eq. 5). O  $^1\text{O}_2$  pode decair pela colisão entre duas moléculas de  $^1\text{O}_2$ , resultando no decaimento das duas moléculas com emissão de luz em 634 e 703 nm. Já esse processo é conhecido como emissão dimol (Eq. 6) (Cadenas e Sies, 1984; Khan

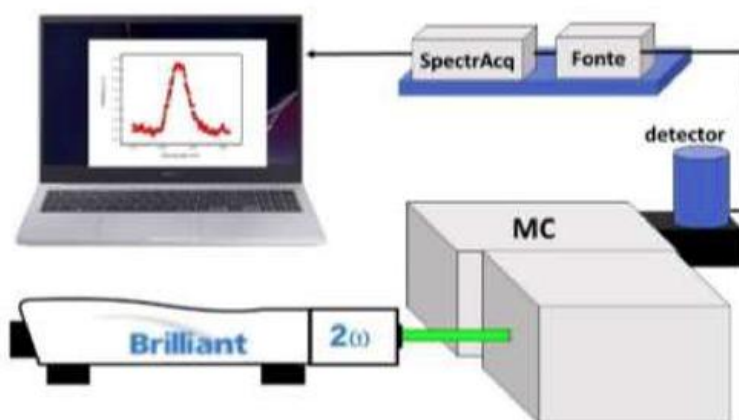
e Kasha, 1963). O tempo de meia-vida do oxigênio singlete depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é cerca de 3,5- 4,0  $\mu\text{s}$ , pois ele se choca com as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio triplete. Já em  $\text{D}_2\text{O}$  o tempo é de 68  $\mu\text{s}$ . Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singlete é maior, em solventes orgânicos sua vida útil é de até 100  $\mu\text{s}$  e em lipídios é de 50 – 100  $\mu\text{s}$ . O tempo de vida diminui drasticamente para 0,2  $\mu\text{s}$  dentro das células, devido à alta reatividade com substâncias biológicas (Ormond e freeman, 2013).



A formação do  $^1\text{O}_2$  pode ser avaliada através do monitoramento das alterações nas bandas de absorvância ou emissão fluorescente de um sensor químico, pelo chamado método de detecção indireta. Porém, esse método pode propiciar reações cruzadas com outras moléculas presentes no meio, além do fotossensibilizador (Makarska-Bialokoz; Lipke, 2018). Nesse sentido, a forma de detecção de oxigênio singlete mais apropriada consiste no método direto, a qual avalia a emissão fosforescente do oxigênio.

No método direto o espectrômetro (Figura 4) é projetado para captar a fosforescência resultante da transição do oxigênio singlete para seu estado fundamental em triplete ( $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g$ ), utilizando uma fonte de luz laser, um monocromador (MC), um detector (InGasAs), e uma fonte DSS, a interface do computador é feita por meio do Spectraq.

Figura 4- Representação do aparato experimental de detecção de  $^1\text{O}_2$  pelo método direto.



Durante a detecção, após a molécula relaxar, o  $^1\text{O}_2$  emite fosforescência na região do infravermelho com o máximo do espectro localizado aproximadamente em 1270 nm e o  $\Phi_\Delta$  (rendimento quântico de oxigênio singlete) pode ser determinado de forma análoga ao procedimento de obtenção do  $\Phi_{fl}$ , na equação 7 conforme a relação:

$$\Phi_\Delta = \frac{I_{fos}}{A} \frac{A_0}{I_{fos0}} \Phi_\Delta \text{ (Eq. 7)}$$

onde  $I_{fos}$  e  $I_{fos0}$  representam as integrais da curva de emissão da fosforescência da amostra e do padrão, respectivamente;  $A$  e  $A_0$ , são as absorbâncias no comprimento de onda de excitação e  $\Phi_\Delta$  corresponde ao rendimento de oxigênio singlete do padrão.

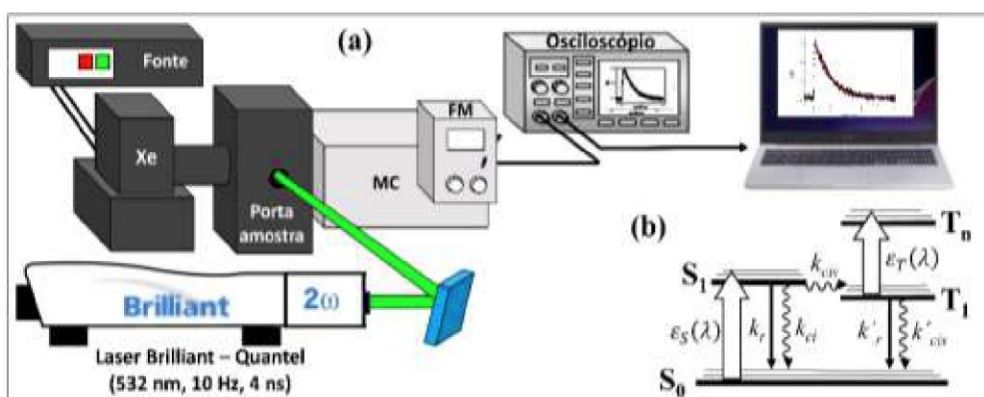
### 3.5 Espectroscopia de Absorção Transiente e seu uso para monitoramento de estados tripletos

A Espectroscopia de Absorção Transiente, modernamente conhecida por Laser Flash-Fotólise (LFF), baseia-se na excitação de uma amostra por um pulso de luz intenso e no monitoramento de sua absorção transitória por meio de um feixe de luz de análise contínua, na qual se obtém uma curva de variação de  $\Delta A$  em função da energia do laser. O primeiro parâmetro fotofísico obtido pela técnica de LFF é o tempo de vida do estado tripleto ( $\tau_T$ ). Este valor se relaciona à estabilidade do FS em seu estado tripleto excitado, que influencia o processo de transferência de energia para molécula de oxigênio e, conseqüentemente, à formação da espécie  $^1\text{O}_2$ . O rendimento de formação de tripleto ( $\Phi_T$ ), por sua vez, refere-se à eficiência com que as espécies no estado tripleto são geradas.

A técnica de Flash-fotólise analisa os mecanismos e etapas das reações fotoquímicas, investigando como as espécies químicas interagem e quais caminhos reativos são seguidos após a excitação eletrônica. Se tornando fundamental, pois mede diretamente os tempos de vida das espécies excitadas, oferecendo informações valiosas sobre a dinâmica das reações. Esse enfoque busca esclarecer como e por que as reações ocorrem em determinadas condições. O monitoramento do estado tripleto pela técnica consiste em um sistema de bombeio e prova (*pump-probe*) superpostos ortogonalmente sobre a amostra, na forma de uma excitação transversa (Figura 5a). Sobre a amostra é incidido um intenso pulso de laser que irá produzir uma significativa população eletrônica no estado  $S_1$ . Após o relaxamento, uma fração dessa população eletrônica irá sofrer o cruzamento intersistemas ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) produzindo o estado tripleto  $T_1$  (Figura 5b). Durante o processo, uma lâmpada contínua de xenônio monitora o

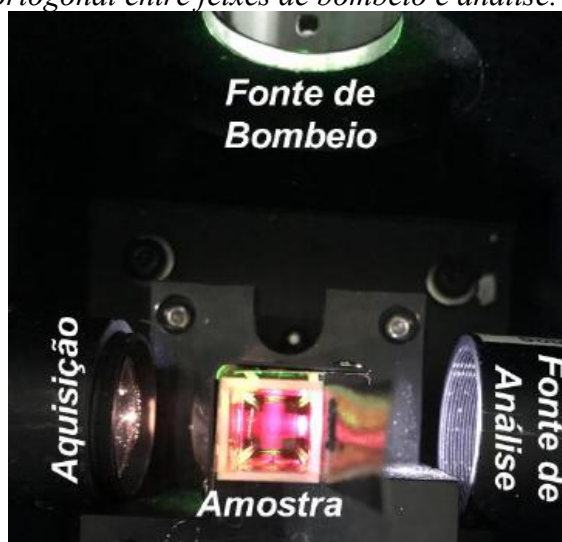
decaimento da população de  $T_1$  durante o relaxamento do estado fundamental em um novo cruzamento intersistemas ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). A função do monocromador (MC) é seleccionar o comprimento de onda da luz de análise, a qual é detectada por uma fotomultiplicadora (FM). O sinal é então digitalizado por um osciloscópio que envia para um computador para posterior análise (Figura 6) (Borissevitch; Gonçalves; Schaberle, 2015).

Figura 5- a) Representação esquemática do aparato experimental da técnica de Flash-Fotólise com o sistema de bombeio (Laser Brilliant) e de análise (Lâmpada de Xe) ortogonais entre si; b) Diagramas de níveis de energia dos processos fotofísicos monitorados pela técnica.



Fonte: Gonçalves et al., 2021.

Figura 6- Fotografia da região interior do aparato experimental da flash-fotólise que evidencia a geometria ortogonal entre feixes de bombeio e análise.



Fonte: Gonçalves et al., 2021.

A técnica de flash-fotólise consiste no estudo da absorção óptica do estado excitado em função do tempo de vida do estado tripleto ( $\tau_T$ ). O valor obtido se relaciona à estabilidade do FS em seu estado tripleto excitado, que influencia o processo de transferência de energia para molécula de oxigênio e, conseqüentemente, à formação da espécie  $^1O_2$ .

O rendimento de formação de tripleto ( $\varphi_T$ ), por sua vez, refere-se à eficiência com que as espécies no estado tripleto são geradas. De acordo com (Borissevitch et al., 2021) o  $\varphi_T$  pode ser estimado pela relação:

$$\varphi_t = \frac{n_T}{n_{abs}} \text{ (Eq. 8)}$$

Onde  $n_T$  é o número de espécies no estado tripleto, formadas através do pulso de luz de excitação;  $n_{abs}$  é o número de moléculas que absorvem os fótons. O número de espécies no estado tripleto é calculado por:

$$n_T = C_T N_a V \text{ (Eq. 9)}$$

Sendo que  $C_T$  corresponde à concentração das espécies no estado tripleto;  $N_a$  corresponde a constante de Avogadro e  $V$  é o volume de amostra irradiada pelo pulso de excitação. Por outro lado, o número de moléculas absorvedoras é determinado através:

$$n_{abs} = n_0(1 - 10^{A_{ex}}) \text{ (Eq. 10)}$$

no qual  $n_0$  é o número total de fótons presentes no pulso de excitação e  $A_{ex}$  é a absorbância da amostra no comprimento de onda da excitação. Por simplificação, quando  $A_{ex} \ll 1$  o número de espécies absorvedoras pode ser expresso por:

$$n_{abs} = 2,3 n_0 A_{ex} \text{ (Eq. 11)}$$

Deste modo, o rendimento de formação de tripleto pode ser reescrito:

$$\varphi_T = \frac{C_T N_a V}{2,3 n_0 A_{ex}} \text{ (Eq. 12)}$$

A absorbância observada na amostra é dada pela soma da absorbância das espécies no estado singleto ( $A_S$ ) e a absorbância das espécies no estado tripleto ( $A_T$ ). As absorbâncias dessas espécies são dadas pela soma dos produtos de suas respectivas concentrações ( $C_S$  e  $C_T$ ) e coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon_S$  e  $\epsilon_T$ ), conforme as Eq.13 abaixo:

$$A = A_S + A_T = \epsilon_S C_S + \epsilon_T C_T \text{ (Eq. 13)}$$

Considerando que durante a análise a soma das concentrações das espécies nos estados singleto e tripleto é igual a concentração inicial da amostra ( $C_S + C_T$ ), a Eq.14 pode ser reescrita como:

$$A = \varepsilon_S(C_0 - C_T) + \varepsilon_T C_T = \varepsilon_S C_0 + (\varepsilon_T - \varepsilon_S)C_T = A_0 + (\varepsilon_T - \varepsilon_S)C_T \text{ (Eq. 14)}$$

onde  $A_0$  corresponde a absorvância da solução da amostra antes da incidência do pulso de excitação.

Após a exposição da amostra ao pulso de excitação ocorre modificações na absorção da amostra. Essa modificação, denominada absorção diferencial ( $\Delta A$ ), é expressa por:

$$\Delta A = A_0 - A = (\varepsilon_S - \varepsilon_T)C_T \text{ (Eq. 15)}$$

A absorção diferencial é consequência da variação das concentrações de espécies em estado tripleto com o tempo; a partir do ajuste temporal de  $\Delta A$  é possível determinar os tempos de vida de decaimento de estado tripleto.

Considerando que o decaimento obedece a uma cinética de primeira ordem temos que

$$C_T = C_{T_0} e^{-kt} \text{ (Eq. 16)}$$

$$\Delta A = \Delta A_0 e^{-kt} \text{ (Eq. 17)}$$

Deste modo, rearranjando a Eq.17, obtemos que a constante ( $k$ ) de decaimento do estado tripleto é dada pela Eq.18 (Borissevitch; Gonçalves; Schaberle, 2015):

$$K = \frac{\ln \ln \left( \frac{\Delta A_0}{\Delta A} \right)}{t} \text{ (Eq. 18)}$$

Experimentalmente, a absorção diferencial é estimada através das diferenças de intensidade do sinal antes do pulso de bombeio ( $I_1$ ) e da intensidade transiente após o pulso ( $I_2$ ), através da equação:

$$\log \left( 1 - \frac{\Delta I}{I_1} \right) = \Delta A \text{ (Eq. 19)}$$

De acordo com Eq.20 a concentração de moléculas no estado tripleto é dada por:

$$C_T = \frac{\Delta A}{\varepsilon_S - \varepsilon_T} \text{ (Eq. 20)}$$

E o rendimento de formação de tripleto e a absorção diferencial podem ser reescritos da seguinte maneira:

$$\varphi_T = \frac{\Delta A N_a V}{2.3 n_0 A_{\text{ex}} (\varepsilon_s - \varepsilon_T)} \quad (\text{Eq. 21})$$

$$\Delta A = \varphi_T \frac{2.3 n_0 A_{\text{ex}} (\varepsilon_s - \varepsilon_T)}{N_a V} \quad (\text{Eq. 22})$$

O número de fótons do pulso de excitação ( $n_0$ ) pode ser elevado aumentando-se a energia do pulso, fazendo assim que todas as moléculas saiam do estado singlete ( $S_1$ ) para o estado tripleto ( $T_1$ ). Neste caso a variação da absorbância é expressa por:

$$\Delta A_{\text{max}} = (\varepsilon_s - \varepsilon_T) C_0 \quad (\varepsilon_s - \varepsilon_T) = \frac{\Delta A_{\text{max}}}{C_0}$$

E nesta condição a absorção diferencial (Eq.23) pode ser reformulada de acordo com a relação:

$$\Delta A = \varphi_T \frac{2.3 n_0 A_{\text{ex}} \Delta A_{\text{max}}}{N_a V C_0} \quad (\text{Eq. 23})$$

Desde que as condições de excitação utilizadas para determinação da absorção diferencial da amostra forem as mesmas utilizadas durante a medida de um padrão, a absorção diferencial deste padrão será dada por:

$$\Delta A^S = \varphi_T^S \frac{2.3 n_0 A_{\text{ex}}^S \Delta A_{\text{max}}^S}{N_a V C_0^S} \quad (\text{Eq. 24})$$

Combinando as equações 23 e 24 de absorção diferencial da amostra e do padrão obtemos que:

$$\frac{\Delta A}{\Delta A^S} = \frac{\varphi_T}{\varphi_T^S} \frac{A_{\text{ex}}}{A_{\text{ex}}^S} \frac{C_0^S}{C_0} \frac{\Delta A_{\text{max}}}{\Delta A_{\text{max}}^S} \quad (\text{Eq. 25})$$

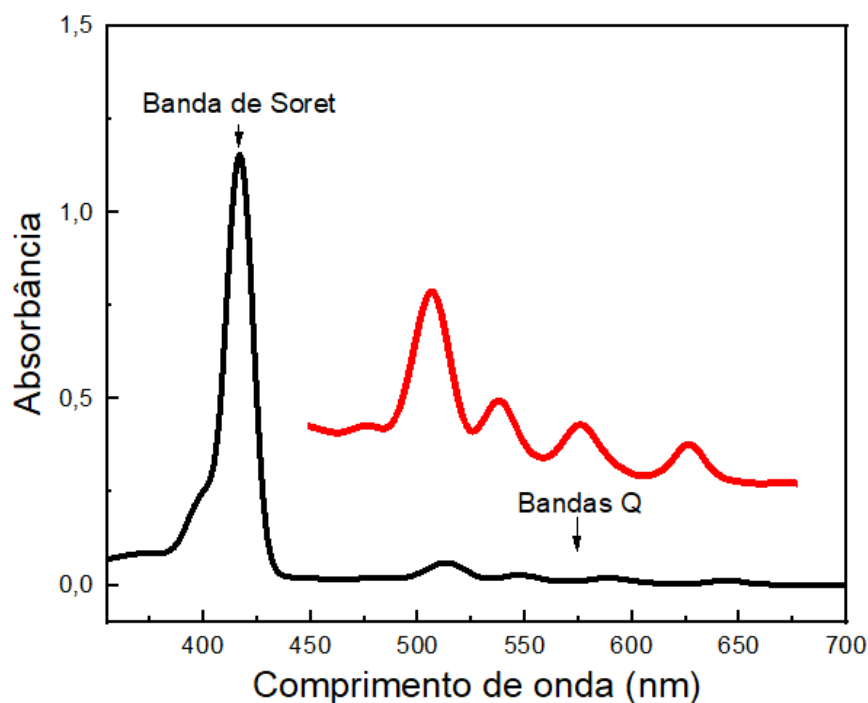
$$\varphi_T = \frac{\Delta A_0}{\Delta A_0^S} \frac{A_{\text{ex}}^S}{A_{\text{ex}}} \frac{C_0}{C_0^S} \frac{\Delta A_{\text{max}}}{\Delta A_{\text{max}}^S} \varphi_T^S \quad (\text{Eq. 26})$$

Onde  $\Delta A_0$  e  $\Delta A_0^S$  são as amplitudes das curvas de decaimento do estado tripleto medidas imediatamente no instante final após o pulso de excitação. Para estas equações todos os termos são independentes da energia do pulso, exceto  $\Delta A_0^S$ . De acordo com Borissevitch et al. (2021), se variarmos a energia do pulso obtemos a dependência dos valores de absorção diferencial da amostra ( $\Delta A_0$ ) em função da absorção diferencial do padrão ( $\Delta A_0^S$ ) após o pulso de excitação.

### 3.6 Porfirinas

A palavra *porfirina* tem origem na palavra grega “porphura” que significa “da cor púrpura” (Senge; Sergeeva; Hale, 2021). Porfirinas e seus derivados são amplamente encontrados na natureza, desempenhando uma enorme variedade de funções nos sistemas biológicos. Porfirinas são compostos intensamente coloridos e apresentam um espectro de absorção característico, com uma banda de maior intensidade na região de 400 nm, denominada banda Soret (Figura 7), e outras de menor intensidade localizadas em maiores comprimentos de onda 500-650 nm, denominadas de bandas Q (Gouterman, 1961; Oliveira et al., 2015; Nasri, 2020)

Figura 7- Exemplo de um espectro de absorção de uma porfirina da região do visível.



Fonte: Autoria própria.

As porfirinas apresentam um conjunto coeso de espectros em moléculas que são aromáticas, mas com a complexidade adicional dos átomos de nitrogênio. O sistema  $\pi$  conjugado de 18 elétrons das porfirinas permite a absorção na região visível, gerando um espectro característico de transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ , cuja intensidade e forma dependem da estrutura molecular e da presença de metal. Essa característica é responsável pela intensa coloração das porfirinas, que as diferencia dos outros compostos aromáticos, já que possuem uma intensa

absorção nas regiões visível e ultravioleta próxima (Nasri, 2020). Os espectros de absorção são importantes para a compreensão das propriedades fotofísicas e fotoquímicas das moléculas.

Diversos estudiosos abordaram a interpretação dos espectros de absorção das porfirinas. Contudo, o modelo teórico introduzido por Gouterman (1961), conhecido como o "modelo dos quatro orbitais", tem mantido sua prevalência até os dias atuais. Ele propõe uma explicação para as cinco bandas presentes no espectro de absorção ao estabelecer um sistema de coordenadas cartesianas x e y na estrutura do macrociclo tetrapirrólico.

De acordo com o modelo proposto por Martin Gouterman, as bandas de absorção em sistemas porfirínicos são oriundas de transições entre dois orbitais HOMO e dois orbitais LUMO e a energia destas transições é dependente da identidade do metal coordenado ao centro da porfirina e aos substituintes do anel (Ceulemans et al., 1986).

Todas as porfirinas apresentam no espectro de absorção um conjunto de bandas relativamente estreitas e com intervalos bastante regulares na zona do visível, denominadas bandas Q, sendo quatro em porfirinas não metálicas e não protonadas, enquanto em porfirinas onde ocorram alterações no centro do anel porfírico, e.g. nas porfirinas metálicas e nas não metálicas que sofreram protonação, esse número é reduzido normalmente para duas (Nasri, 2020).

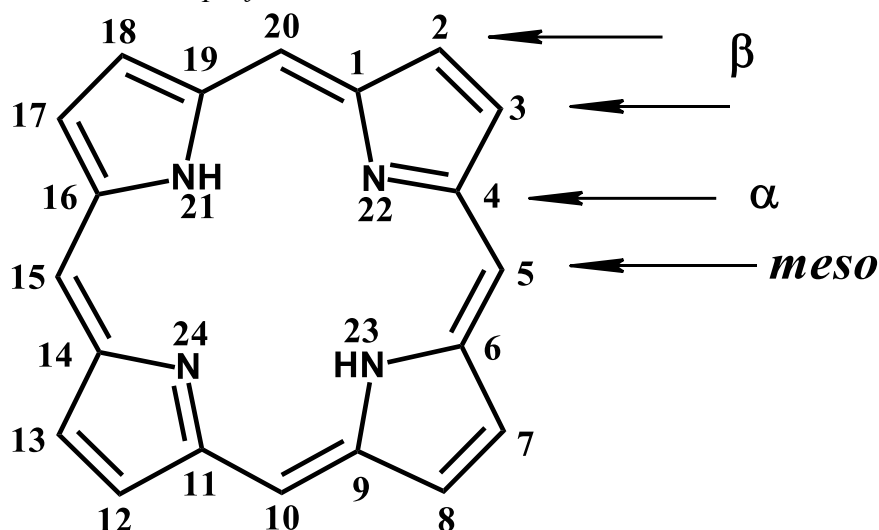
### 3.6.1 Aspectos Estruturais

O anel porfirínico sem nenhum substituinte é chamado de Porfirina. A base estrutural fundamental de uma porfina é caracterizada pela união de quatro anéis pirrólicos por meio de pontes metenil denominados de posições meso (indicadas pelos números 5,10,15,20), os carbonos 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são denominados de posições  $\beta$ -pirrólicas, e os carbonos restantes 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 são as posições  $\alpha$ -pirrólicas, como mostrado na Figura 8, que lhes proporcionam um conjunto de ligações duplas conjugadas que formam um anel aromático com dezoito conjugações  $\pi$ . O macrociclo possui dois átomos de nitrogênios imínicos capazes de aceitar prótons (22 e 24 dos anéis), e dois nitrogênios amínicos capazes de ceder prótons (21 e 23 dos anéis). É um sistema aromático com 22 elétrons, que obedece à regra de Hückel e apresenta uma geometria “quase” planar (Nasri, 2020; Senge; Sergeeva; Hale, 2021).

A regra de Hückel é utilizada para identificar compostos aromáticos e foi desenvolvida por Erich Hückel em 1931, a partir da teoria dos orbitais moleculares. Segundo essa regra, sistemas cíclicos, planos e conjugados são considerados aromáticos quando possuem um total

de  $(4n + 2)$  elétrons  $\pi$ , sendo  $n$  um número inteiro. Esse número específico de elétrons permite que a molécula atinja uma configuração eletrônica estável, o que justifica sua maior estabilidade em comparação com compostos não aromáticos (Caramori; Oliveira, 2009).

Figura 8- Estrutura do anel porfírico.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2015.

As porfirinas na forma de base livre não apresentam atividade catalítica na oxidação de substratos orgânicos. Isso se deve ao fato de que, na ausência de um metal ou de outro componente ativador, essas moléculas não conseguem facilitar reações químicas de oxidação. Porfirinas são compostos cíclicos que, ao se ligarem a metais como ferro ou cobre, formam complexos comumente ativos como catalisadores (Dolphin; Traylor; Xie, 1997).

Assim, a modificação química das porfirinas, geralmente através da incorporação de metais como ferro ou cobre, é essencial para que possam desempenhar um papel catalítico ativo. Portanto, a eficiência catalítica das porfirinas é altamente dependente da sua forma química, sendo a presença de íons metálicos um fator determinante para sua capacidade de atuar como catalisadores em reações de oxidação.

A este macrociclo podem ser coordenados diferentes íons metálicos pela remoção dos íons  $H^+$  dos grupos NH internos, dando origem às metaloporfirinas. As porfirinas meso-substituídas são preferencialmente preparadas a partir de reações de condensação entre pirróis e aldeídos (Smith, 2000).

Outro comportamento interessante das porfirinas é que emitem intensamente quando excitadas em qualquer uma de suas bandas de absorção (Oliveira et al., 2015). Dessa forma, é possível se realizar estudos por meio dos espectros de emissão (fluorescência e fosforescência)

e de excitação, que pode ser facilmente acompanhado pela variação do espectro de absorção na região do UV- vis. Tais resultados poderão ser usados para se obter informações sobre a estrutura eletrônica e sobre a dinâmica dos processos envolvendo os estados excitados singleto S e tripleto T.

### 3.6.2 *Porfirinas Monocâtionicas*

O Photofrin, conhecido também como fotossensibilizadores de primeira geração, foi desenvolvido na década de 1970 início de 1980 (Allison et al., 2004) sendo o primeiro medicamento aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em terapia fotodinâmica. Subsequentemente, diversos derivados de porfirina foram criados com o objetivo de aumentar a eficiência da terapia (Kolic et al., 2016). A segunda geração de fotossensibilizadores refere-se principalmente a derivados porfirínicos, como clorinas e ftalocianinas, que começaram a ser desenvolvidos a partir do final da década de 1980. Por sua vez, a terceira geração envolve a utilização desses fotossensibilizadores já existentes, mas que são modificados ou conjugados com anticorpos ou outras biomoléculas, visando aumentar a seletividade e a especificidade dos mesmos (Allison et al., 2004).

Para ser ideal, é necessário que o fotossensibilizador possua algumas particularidades como ausência de toxicidade, que não tenha efeito mutagênico, não haja acúmulo de material no tecido alvo, seja viável a administração tópica, baixo custo, compatibilidade com diferentes tipos de fontes de luz, apropriado estado tripleto de energia que permita a transferência suficiente de energia ao oxigênio no estado fundamental, alto rendimento quântico e extensa vida útil do estado tripleto e fotoestabilidade (Allison et al., 2004).

Essas moléculas, apresentam propriedades notáveis, como absorção na região da luz visível, alto coeficiente de absorção molar, biocompatibilidade e excelente estabilidade frente à radiação UV-Vis, tornando-as promissoras para diversas aplicações (Yu et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Porfirinas catiônicas são ideais como fotossensibilizadores porque a presença de cargas positivas em sua estrutura busca atuar na membrana de bactérias, permitindo uma forte interação principalmente com bactérias Gram-negativas. Essa ligação é crucial, já que o oxigênio singleto gerado possui uma distância de difusão muito curta e precisa agir diretamente na célula para ser eficaz. A carga do fotossensibilizador (FS) é um dos principais fatores que determina a eficácia do processo fotodinâmico (Savelyeva et al., 2023; Rapozzi et al., 2014).

Os FS catiônicos são considerados de grande interesse, pois apresentam a capacidade de se acumular nas mitocôndrias, influenciados pelo potencial da membrana mitocondrial interna. Devido à sua capacidade de interagir com bases do DNA e induzir lesões após fotoativação, os fotosensibilizadores catiônicos são fortes candidatos a causar toxicidade celular por meio de danos diretos à mitocôndria, ao contrário dos fotosensibilizadores aniônicos, cuja ação parece ocorrer principalmente por efeitos vasculares, considerados a causa primária da morte celular (Engelman et al., 2007; Morgan e Oseroff, 2001). Porfirinas com múltiplas cargas positivas demonstraram ser eficazes contra ambos os tipos de bactérias, enquanto algumas com grupos catiônicos adicionais ou padrões de distribuição específicos mostraram maior eficiência. A modulação do caráter anfifílico das porfirinas, combinando cargas positivas com grupos lipofílicos, aumenta sua afinidade com as bactérias e sua atividade fotocitotóxica (Jori et al., 2006; Merchat et al., 1996; Lazzeri et al., 2004).

Apesar do amplo uso dessas moléculas e de seus derivados como fotossensibilizadores convencionais, eles frequentemente formam agregados em meios aquosos devido às interações  $\pi$ - $\pi$  e à sua natureza hidrofóbica, o que provoca alterações cromofóricas e uma redução na geração de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete (Park et al., 2021; Sharma; Kaur; Chaudhary, 2020). Para contornar essas limitações, diversas modificações na estrutura da porfirina têm sido realizadas, visando aprimorar propriedades como agregação, biodistribuição, estabilidade e toxicidade da molécula (Tasso et al., 2017). Uma delas é a inserção de complexos metálicos em sua estrutura. A coordenação de metais pode modular a eficiência quântica, a estabilidade térmica e a seletividade biológica dessas moléculas, ampliando significativamente seu desempenho em aplicações terapêuticas e diagnósticas (Sarbadhikary et al., 2022).

A aplicação de compostos de coordenação oferece diversas vantagens, como a diversidade de geometrias possíveis, a capacidade dos complexos de se regenerarem de forma espontânea, juntamente com suas propriedades redox, catalíticas e fotoquímicas (Lee et al., 2020; Pinto et al., 2021). Vários íons metálicos podem ser utilizados, mas os complexos de rutênio (Ru), paládio (Pd) e platina (Pt) têm sido mais comumente empregados.

Os complexos de rutênio e os íons Pt (II) e Pd (II) têm sido largamente empregados em função de sua estabilidade. O rutênio também apresenta propriedades fotoquímicas, e sua principal área de pesquisa é a síntese de potenciais agentes anticâncer (Lee et al., 2020). Os íons Pt (II) e Pd (II) possuem estrutura quadrada, possibilitando a obtenção de “grades” e “fitas” supramoleculares (Toma; Araki, 2000).

O uso de diferentes metais em anéis porfirínicos apresenta diversas vantagens, principalmente no ajuste das propriedades químicas, espectroscópicas e eletroquímicas das moléculas. O metal central influencia a estabilidade do complexo, a reatividade redox e as transições eletrônicas, permitindo o controle preciso dessas características. Como ilustrado por eles os metais como platina e paládio tendem a formar complexos mais estáveis, enquanto o rutênio, com múltiplos estados de oxidação, é vantajoso para aplicações redox dinâmicas e fotossíntese artificial, além de melhorar a estabilidade da absorção da banda Q, especialmente em condições ácidas (Zhao et al., 2019). Ademais, os metais podem alterar as propriedades espectroscópicas, como as bandas de Soret e Q, oferecendo opções para otimizar porfirinas para sensores, catálise e até terapias biomédicas, como o uso de platina em tratamentos anticancerígenos. Essas vantagens fazem com que a escolha do metal central seja crucial para diversas aplicações em biotecnologia e indústrias químicas.

A inclusão de complexos periféricos derivados de platina (II) e paládio (II), tem demonstrado potencial para aumentar a atividade fotodinâmica desses compostos (Pinto et al., 2021). Esse efeito é atribuído ao aumento da taxa de cruzamento intersistêmico (ISC), promovido pela presença de átomos pesados, que facilita a transição para estados excitados tripleto e, conseqüentemente, a produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) devido ao acoplamento spin-órbita, que está intimamente ligada à carga do núcleo atômico. Para compreender esse fenômeno, podemos imaginar uma situação em que acompanhamos o elétron em sua trajetória orbital. Desse ponto de vista, o núcleo parece girar ao nosso redor — uma analogia semelhante à antiga concepção do sistema solar, em que o Sol orbitava a Terra. Nesse cenário, o núcleo em movimento gera uma corrente circular ao nosso redor. Quanto maior a carga nuclear, mais intensa será essa corrente e, portanto, mais forte será o campo magnético associado que se forma nesse referencial. Esse campo magnético interage com o momento magnético do spin do elétron, gerando a interação conhecida como acoplamento spin-órbita. Assim, quanto maior for a carga do núcleo, mais intensa será essa interação. Esse efeito aumenta drasticamente com o número atômico, em elementos leves, como o hidrogênio, o acoplamento é praticamente desprezível, resultando em variações mínimas nos níveis de energia (menores que  $0,4\text{ cm}^{-1}$ ). No entanto, em átomos mais pesados os efeitos do acoplamento são muito mais pronunciados, causando separações energéticas de milhares de  $\text{cm}^{-1}$  (Atkins; Paula, 2018).

Essas moléculas destacam-se por sua elevada eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio quando submetidas à irradiação luminosa adequada (Rossi et al., 2020; Pinto et al., 2021). Apresentam estabilidade em solução composta por DMSO e tampão, não exibem fenômenos de agregação e mantêm sua fotoestabilidade mesmo sob irradiação luminosa (Rossi

et al., 2020; Couto et al., 2020; Deng et al., 2020). Além de possuir uma maior atividade terapêutica, superando tanto os compostos de base livre quanto outros complexos metálicos. Complexos de paládio também demonstraram desempenho superior em comparação às porfirinas não metaladas, reforçando a relevância do efeito do átomo pesado na fototoxicidade e eficiência dos fotossensibilizadores empregados em PDT (Deng et al., 2020).

Os complexos de rutênio, assim como os de platina e paládio, destacam-se por ampliar as possibilidades de modulação eletrônica e fotofísica das porfirinas (Toma; Araki, 2000). Devido à sua extensa conjugação cíclica, as porfirinas exibem assinaturas espectroscópicas ricas na região UV-Vis, notadamente nas bandas B e Q, atribuídas a características estruturais específicas (Vidal et al., 2021). Essas moléculas também apresentam bandas de fluorescência bem definidas, associadas aos primeiros estados excitados singlete, além de fluorescência quente (Lopes et al., 2019).

Adicionalmente, possuem estados tripleto excitados acessíveis, devido à forte interação spin-órbita, o que favorece a geração eficiente de oxigênio singlete — propriedade essencial para sua aplicação como fármacos fotossensíveis na TFD (Lopes et al., 2022). Outra característica relevante é sua elevada seletividade por células tumorais e baixa toxicidade. Sua geometria octaédrica favorece interações específicas com o DNA por meio de ligações não covalentes, como intercalação e ligação em sulcos. Somadas às suas propriedades fotofísicas favoráveis, essas características tornam os complexos de rutênio fotossensibilizadores altamente promissores (Oliveira et al., 2020).

### **3.7 O uso da lâmpada halógena para avaliar a degradação da seroalbumina.**

#### *3.7.1 Seroalbumina*

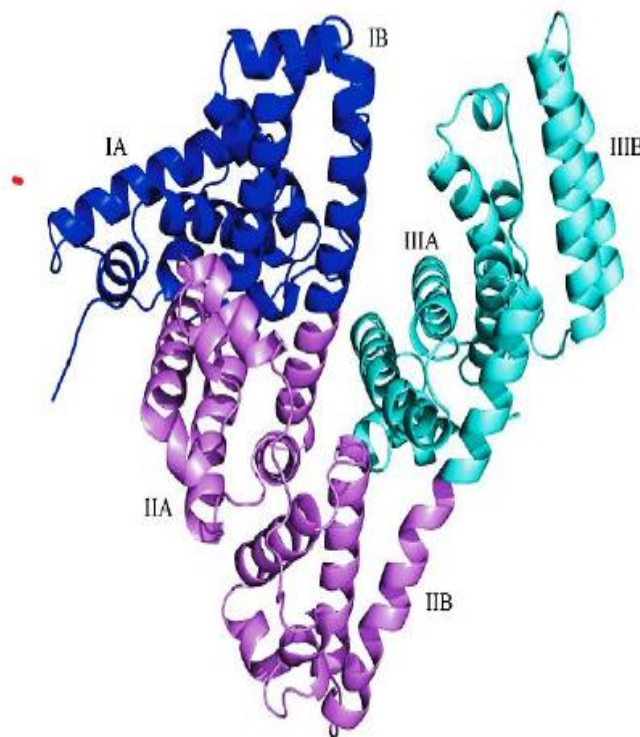
A albumina sérica bovina (BSA) é uma das seroalbuminas mais estudadas e representa a proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo e correspondem a 60% do seu total de proteínas, cuja função principal é transportar ácidos graxos. Desempenha um papel essencial na manutenção da pressão osmótica coloidal do sangue e na regulação do pH sanguíneo (Carter; Ho, 1994; Hu et al., 2006). Possui elevada estabilidade, boa solubilidade em água e capacidade de se ligar a uma ampla variedade de metabólitos, fármacos, corantes e compostos orgânicos, funcionando como transportadoras dessas substâncias. Uma de suas principais funções biológicas é justamente essa aptidão para transportar tanto medicamentos quanto compostos endógenos e exógenos. Ela atua na captação de substâncias nos locais de secreção ou administração, promovendo seu transporte para diferentes regiões do organismo. Além disso,

desempenha funções adicionais, como o sequestro de radicais livres de oxigênio e a inativação de diversos metabólitos lipofílicos tóxicos, a exemplo da bilirrubina. Para exercer essa função, a albumina desenvolveu diversas capacidades de ligação a ligantes com propriedades químicas variadas (Bujacz, 2012; Tong et al., 2010; Carter; Ho, 1994).

As células do fígado humano produzem cerca de 12 g de albumina por dia, com uma meia-vida que alcança 19 dias. Durante esse tempo, uma única molécula de albumina passa pelo sistema circulatório quase 15.000 vezes, transportando diversos ligantes (Bujacz, 2012; Naveenraj et al., 2013). Seu peso molecular é de aproximadamente 66.462 g/mol, possui cadeia polipeptídica simples com carga total negativa em pH 7,0 e ponto isoelétrico próximo de pH 4,0 (Peters, 1995). É frequentemente empregada como sistema-modelo para estudos de interação devido à sua semelhança estrutural com a albumina sérica humana (HSA).

As albuminas possuem uma estrutura formada por hélices  $\alpha$  e são compostas por três domínios estruturalmente semelhantes (I, II e III), cada um subdividido em dois subdomínios: A e B. A principal diferença entre os subdomínios está no número de pontes dissulfeto que estabilizam suas estruturas. Os subdomínios do tipo A apresentam seis hélices  $\alpha$  estabilizadas por quatro pontes dissulfeto, exceto o subdomínio IA, que possui apenas três. Por sua vez, os subdomínios do tipo B contêm quatro hélices  $\alpha$  unidas por duas pontes dissulfeto. A conexão entre os subdomínios ocorre por meio de longas *loops* flexíveis, que conferem mobilidade conformacional à molécula e influenciam diretamente a modulação dos sítios de ligação localizados entre os domínios. Os espaços entre domínios e subdomínios da albumina formam sítios de ligação para diversos ligantes. A BSA também pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada (Bujacz, 2012; Naveenraj; Anandan, 2013). A Figura 9 apresenta a estrutura da BSA, destacando os domínios I–II e II–III conectados por longas hélices, com as subdivisões localizadas no centro de cada unidade estrutural.

Figura 9- Divisão dos domínios e subdomínios da estrutura da BSA: subdomínio I (azul); subdomínio II (magenta); subdomínio III (ciano).



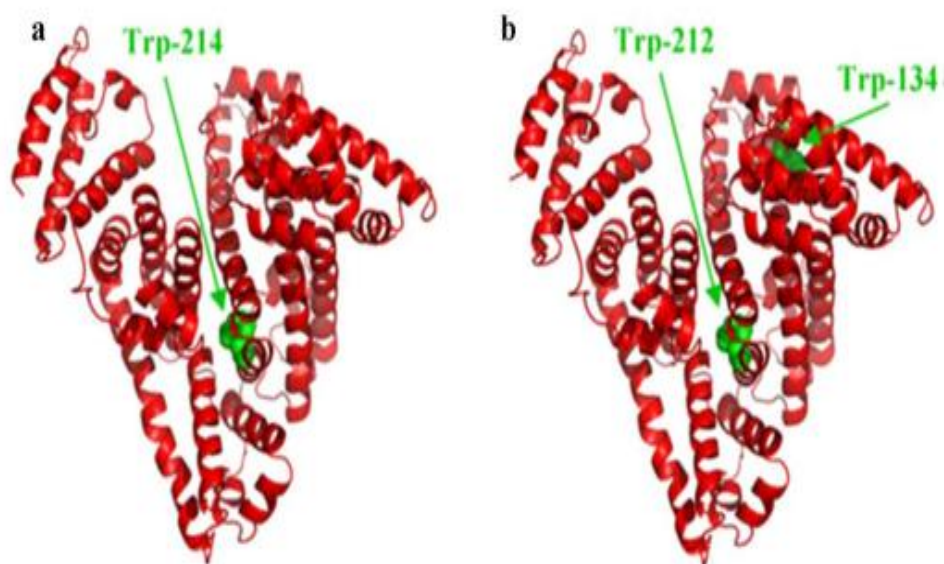
Fonte: Bujacz, 2012.

Sua estrutura é altamente conservada entre diferentes espécies de mamíferos, sendo observada uma homologia de aproximadamente 76% entre a BSA e a HSA (Mukherjee et al., 2015). As principais diferenças estão nas regiões estruturais que influenciam a exposição de epítomos e a interação com ligantes. O primeiro grupo de diferenças está localizado nas quatro primeiras  $\alpha$ -hélices do subdomínio IB, abrangendo uma ampla região antigênica (epítomo), que pode ser reconhecida imunologicamente e possui alta exposição à solvatação. O segundo grupo de diferenças, por sua vez, encontra-se na terceira e quarta  $\alpha$ -hélices do subdomínio IIB, além de alguns fragmentos dispersos no subdomínio IIIA. No entanto, essa região não está diretamente exposta na conformação nativa da proteína. Por fim, o terceiro grupo é composto por quatro fragmentos de resíduos, presentes em diferentes  $\alpha$ -hélices do subdomínio IIIB, que estão expostos na superfície da proteína (Majorek et al., 2012).

Do ponto de vista espectroscópico, outra diferença relevante entre as duas proteínas é o número de resíduos de triptofano: enquanto a BSA apresenta dois, a HSA contém apenas um. Análises da estrutura cristalina demonstraram que a HSA é composta por 585 resíduos de aminoácidos, incluindo 17 resíduos de tirosina e um único triptofano (Trp) localizado na posição 214, no subdomínio IIA. Em contrapartida, a albumina sérica bovina (BSA) apresenta 583 resíduos de aminoácidos, contendo 20 resíduos de tirosina e dois de triptofano,

posicionados nas regiões 134 e 212. O Trp-134 localiza-se no primeiro domínio, exposto na superfície da molécula, enquanto o Trp-212 está inserido em um bolsão hidrofóbico de ligação, no segundo domínio. O microambiente químico do Trp-212 na BSA mostra-se semelhante ao do Trp-214 na HSA. A Figura 10 ilustra a estrutura tridimensional da HSA e da BSA, com os resíduos de triptofano destacados em verde. (Bourassa et al., 2011; Naveenraj; Anandan, 2013; Meti et al., 2014; Bujacz, 2012).

*Figura 10- Estrutura tridimensional de albuminas séricas [(a) HSA e (b) BSA], com resíduos de triptofano mostrados na cor verde.*



Fonte: Bourassa; Hasni; Tajmir-Riahi, 2011.

A BSA foi selecionada como molécula-alvo por apresentar baixo custo, fácil obtenção e destacada capacidade de se ligar a pequenas moléculas. Sua habilidade de interagir com compostos hidrofílicos, hidrofóbicos e anfílicos, aliada à semelhança estrutural e de características de ligação com a HSA, justifica sua escolha (Santos et al., 2020; Silveira et al., 2022). As análises referentes a essas interações serão detalhadas na seção de Materiais e Métodos.

# Capítulo IV

## Metodologia

*Neste capítulo será detalhado o processo de preparo das amostras e as condições experimentais gerais empregadas nas análises espectroscópicas.*

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Síntese e preparo das soluções

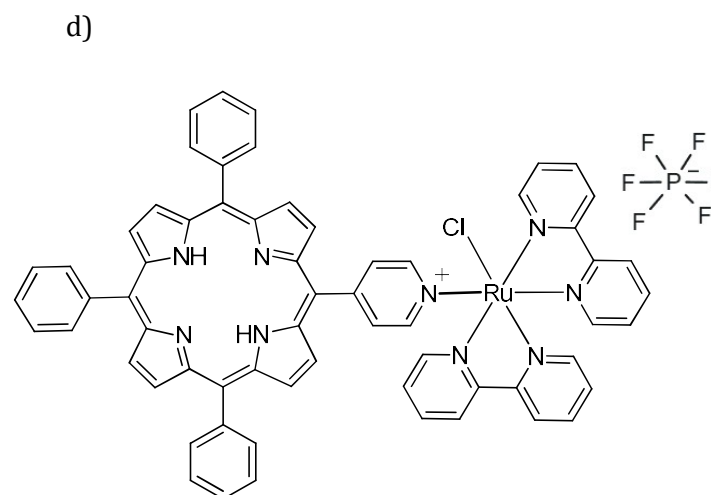
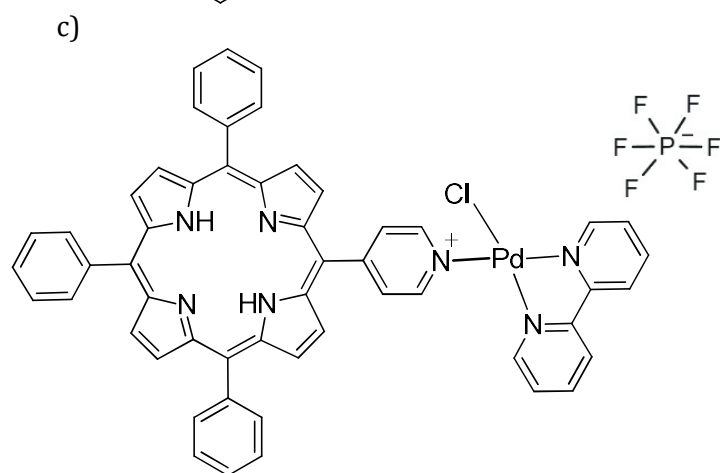
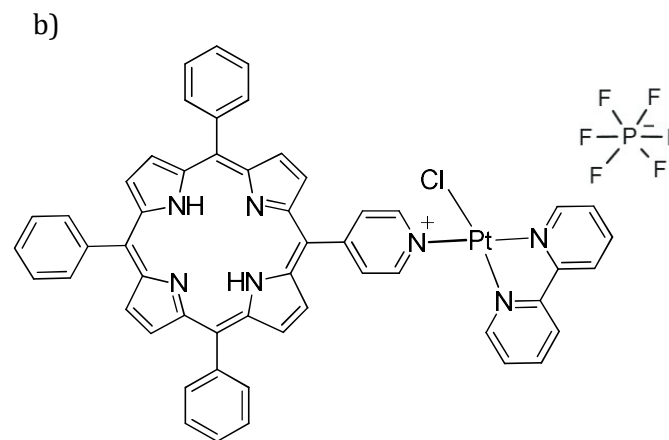
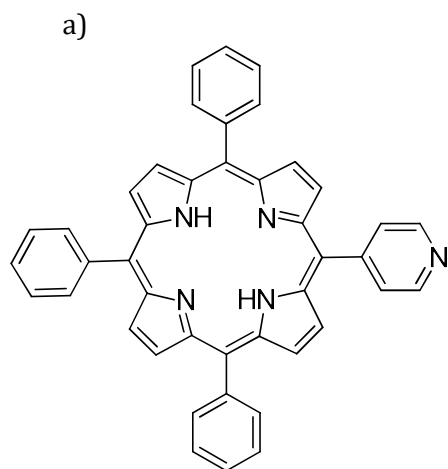
A porfirina *meso*-5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina (H<sub>2</sub>MPyP) de base livre foi adquirida da Frontier Scientific. As metaloporfirinas *meso*-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bipiridil-paládio(II) (PdMPyP), *meso*-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bipiridil-platina(II) (PtMPyP) e *meso*-[5-(4-piridil)-10,15,20-tri(fenil)porfirina]bis(bipiridil)-cloro-rutênio(II) ( RuMPyP ) foram sintetizados de acordo com o descrito por Deda et al. (2012), sendo essa etapa conduzida pelos pesquisadores responsáveis pelo projeto, sob supervisão do Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias.

Para os ensaios fotofísicos, as porfirinas foram inicialmente preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). Já para os experimentos com a BSA, alíquotas dessas soluções estoque em DMSO foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), a fim de minimizar a concentração de DMSO no meio reacional.

As concentrações das soluções-estoque das amostras foram definidas de acordo com a lei de Lambert-Beer. Para isso, utilizou-se coeficientes de absorvidade molar, que foram obtidos a partir da literatura ou por meio de medições empíricas, garantindo que as concentrações estivessem adequadas para as análises subsequentes.

As estruturas químicas das porfirinas utilizadas neste estudo estão apresentadas na Figura 11, destacando as modificações nos substituintes periféricos e nos complexos metálicos centrais.

Figura 11- Estruturas químicas das porfirinas monocatiônicas utilizadas neste estudo:  $H_2MPyP$  (a),  $PtMPyP$  (b),  $PdMPyP$  (c) e  $RuMPyP$  (d).



## 4.2 Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis

As análises de absorção realizadas neste estudo foram conduzidas com um espectrofotômetro UV-Vis Hitachi™, modelo U2900, disponível no Laboratório de Biofotônica do IF-UFG. Para obter os espectros, realizamos varreduras na faixa espectral de 260 a 750 nm, com uma resolução de 1 nm. As medições de absorbância foram feitas em cubetas de quartzo, com caminhos ópticos de 1 ou 0,1 cm, dependendo das características das amostras. Após a coleta dos dados, utilizamos o software OriginPro 2018®, versão 9.5 (Originlab Corporation, 2017), para processar e analisar os resultados, permitindo uma interpretação precisa das propriedades ópticas das amostras estudadas

## 4.3 Espectroscopia de Fluorescência

As medições de fluorescência foram realizadas nos modos de estado estacionário e resolvido no tempo, ambos à temperatura ambiente. Os espectros de emissão em estado estacionário foram obtidos em um espectrofluorímetro Hitachi™ FL F-7000 (Laboratório de Biofísica, Instituto de Física, UFG), e os dados foram tratados no software OriginPro 2018®. Para evitar efeitos de autoabsorção (filtro interno), as soluções foram diluídas de modo a manter a absorbância no comprimento de onda de excitação abaixo de 0,05 (Panigrahi; Mishra, 2019). Os espectros de emissão foram obtidos com fendas de excitação e emissão de 5 nm e velocidade de varredura de 240 nm·min<sup>-1</sup>, utilizando comprimentos de onda apropriados para cada amostra. Essas condições, juntamente com o uso de solventes que não absorvam significativamente no comprimento de onda de excitação, garantem a precisão e confiabilidade das medições. Além disso, os dados foram processados com métodos matemáticos de correção, melhorando a qualidade dos resultados.

Já os tempos de vida da fluorescência ( $\tau_f$ ) foram determinados em colaboração com o Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (Instituto de Química, UFU), sob a supervisão do Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias (Silva et al., 2025), empregando o método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) em um fluorímetro Horiba equipado com controlador DeltaHub e fonte NanoLED ( $\lambda_{exc} = 441$  nm, 1,0 MHz). A análise dos decaimentos foi realizada no software DAS6.

#### 4.4 Coeficiente de partição na mistura n-octanol/água ( $P_{ow}$ )

O coeficiente de partição das porfirinas foi determinado utilizando uma mistura de n-octanol (3,0 mL) e água (3,0 mL), conforme descrito na literatura (Rodrigues et al., 2025). As medições foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais da UFU, sob supervisão do Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias. O coeficiente de partição foi medido por análise UV-Vis e utilizando a Eq. 27 onde,  $A_{org}$  e  $A_{aq}$  são os valores de absorvância nas fases orgânica e aquosa, e  $V_{org}$  e  $V_{aq}$  são os volumes finais das fases orgânica e aquosa, respectivamente.

$$\text{Log } P = \log \frac{A_{org}}{A_{aq}} \frac{V_{aq}}{V_{org}} \quad (\text{Eq. 27})$$

#### 4.5 Determinação do tempo de vida de tripleto e rendimento de tripleto

Os estados tripletos excitados foram analisados usando a técnica de LFF. O feixe de luz de análise foi gerado por uma fonte de luz com uma lâmpada de xenônio de 75 W (XE075), um colimador de lente plano-convexa de quartzo, e um monocromador Sciencetech Inc (9055) acoplado a um tubo fotomultiplicador Hamamatsu (R928). A direção do feixe de luz de análise, com raio  $l = 0,25$  mm foi posicionada ortogonalmente ao feixe de bombeamento (Figura 5). As curvas de decaimento do estado  $T_1$  foram monitoradas pela absorção tripleto-tripletto em 470 nm para as porfirinas. A absorção transiente  $\Delta A$  foi registrada em  $\lambda_{an} = 7$  nm, onde o espectro de absorção óptica do estado tripleto ( $T_1$ ) da porfirina é mais intenso.

Para a realização das análises, as soluções foram preparadas com concentrações ajustadas para apresentar uma absorvância de 0,2 no comprimento de onda correspondente à fonte de bombeio. As medições foram realizadas em uma célula espectroscópica de quartzo de  $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ , contendo 2,5 mL das soluções de porfirina, sendo cada medida realizada em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos dados. A fonte de excitação utilizada foi um laser Brilliant® da marca Quantel™, operando a 532 nm, com taxa de repetição de 10 Hz e largura de pulso entre 4 e 6 nanossegundos.

Variando-se a energia da fonte de excitação entre 0,6 e 30 mJ, foi possível estimar a dependência da absorção diferencial. A medição da energia incidente foi realizada com um medidor de potência da ThorLabs. Para a luz de análise, utilizou-se uma lâmpada de xenônio (Xe). Os sinais da fotomultiplicadora foram coletados e processados em osciloscópio 500 MHz

da marca Teknatrix® *modelo DPO 3052*. E todos os dados foram processados no software *OriginPro 2018®*, versão 9.5. (Originlab Corporation, 2017).

#### **4.6 Determinação de rendimento de formação de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ )**

##### *4.6.1 Método Direto*

Os  $\Phi_{\Delta}$  foram determinados através do método direto em um espectrômetro IHR320, da Horiba™. A excitação foi realizada com um laser contínuo iZI-LaserLine, operando a 532 nm com potência de  $66 \pm 2$  mW e largura de pico a meia altura de 9 nm. Em ambas as abordagens, as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), empregando uma fonte de laser verde (532 nm) para excitação, e a TPP ( $\Phi_{\Delta} = 0,52$ ) foi adotada como padrão de referência, conforme mencionado por Silva et al. (2008).

O sistema é composto por uma câmara onde a amostra é posicionada, um monocromador que permite a discriminação da emissão com base no comprimento de onda, e um detector de estado sólido refrigerado (InGaAs) que opera na região do infravermelho. Um console de controle e processamento de dados (SpectrAcq) completa o equipamento. As medições foram realizadas em temperatura ambiente em uma solução saturada de ar atmosférico, cobrindo uma faixa espectral de 1200 a 1400 nm. Utilizaram-se fendas de abertura frontal e lateral de 2,0 mm, com um tempo de integração de 1 segundo, repetindo três varreduras para cada amostra. Os espectros obtidos foram então processados usando o software OriginPro 2018®, versão 9.5 (Originlab Corporation, 2017).

#### **4.7 Ensaio BSA**

##### *4.7.1 Procedimento de encaixe molecular*

A estrutura cristalográfica da BSA na forma não ligada foi obtida a partir do Protein Data Bank (PDB), utilizando o código de acesso 4F5S (Bujacz, 2012). As estruturas químicas dos derivados H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP, PtMPyP e RuMPyP foram construídas e otimizadas em energia por Teoria do Funcional da Densidade (DFT), empregando o programa Spartan'18 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA).

A etapa de modelagem molecular, incluindo a construção das estruturas químicas, otimização energética e cálculos de docking molecular, foi conduzida em colaboração com o Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais da UFU. Os cálculos de docking foram realizados utilizando o software GOLD 2023.3 (Cambridge Crystallographic Data Centre,

Cambridge, Reino Unido), com átomos de hidrogênio adicionados à proteína conforme os estados tautoméricos e dados de ionização previstos pelo software, considerando pH 7,4. A BSA apresenta três principais bolsos de ligação — correspondentes aos subdomínios IIA, IIIA e IB — que foram avaliados em esferas de 12 Å ao redor de cada sítio (Martins et al., 2024; Paz et al., 2023).

A função de pontuação ChemPLP foi adotada devido à melhor correlação entre resultados experimentais e teóricos em estudos prévios envolvendo porfirinas e albumina (Rodrigues et al., 2025). Para identificar os resíduos de aminoácidos participantes das interações ligante-proteína, foi utilizado o Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP). As representações tridimensionais das melhores poses de acoplamento foram geradas no software PyMOL Molecular Graphics System (versão 1.0, Delano Scientific LLC, Schrodinger, NY, EUA).

#### *4.7.2 Degradação da BSA e constante de Stern-Volmer*

A BSA foi adquirida da Sigma-Aldrich e utilizada sem purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas na proporção de 1:1, mantendo a concentração final de DMSO em 5% (v/v) em todas as amostras, os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (25 °C).

As porfirinas utilizadas no experimento foram ajustadas a cada medida a uma concentração de 100 µM. Para a observação da foto-oxidação de proteínas, uma alíquota de BSA era retirada da geladeira e deixada por 30 minutos em temperatura ambiente para completa termalização da amostra. Foi pipetado 10 µL de BSA, 100 µl da solução contendo porfirina e 1890 uL de PBS e colocadas em uma cubeta de quartzo no escuro por 30 minutos para a completa ligação entre as porfirinas e a BSA, esse ensaio se repetiu para todas as porfirinas.

Em seguida foi feita a medida do espectro de fluorescência da amostra que já estava na cubeta. Após a análise, foi feita a medida de fluorescência da amostra em função do tempo de irradiação por uma lâmpada halógena (emitindo de 400-900 nm) nos seguintes intervalos de tempo: 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min. A altura do feixe de luz também foi monitorada, estabelecemos uma altura de 6 cm de distância com a presença de uma pulga magnética e o agitador magnético. O processo de irradiação e degradação da proteína foi repetido 3 vezes para cada porfirina.

Para o cálculo da constante de degradação da BSA foi feito um gráfico da intensidade do sinal de fluorescência da BSA (340 nm) em função do tempo de irradiação e feito um ajuste exponencial da curva:

$$I = I_0 e^{-kt} \text{ (Eq. 28)}$$

onde  $I$  é a intensidade de fluorescência,  $I_0$  é a intensidade de fluorescência da solução no escuro,  $t$  é o tempo e  $k$  é a constante de degradação da amostra.

A afinidade das moléculas de porfirina pela albumina foi investigada através do estudo da supressão de fluorescência intrínseca da BSA pelas amostras em estudo, empregado a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \text{ (Eq. 29)}$$

onde  $F_0$  é a intensidade de fluorescência de BSA sem porfirina,  $F$  é a intensidade de fluorescência para as várias alíquotas de porfirina,  $[Q]$  é a concentração de porfirina na solução,  $K_{SV}$  é constante de Stern-Volmer.

O pico de absorção da albumina está entre 278-279 nm. A BSA possui coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) centrada em 280 nm. A fluorescência da albumina é dominada pelos seus resíduos de triptofano. Quando excitada apresenta uma fluorescência intrínseca com uma banda bem definida em 340 nm. À medida que os aminoácidos da BSA são foto-oxidados sua banda de fluorescência em 340 nm diminui de intensidade (Cavalcante et al., 2009; Belatik et al., 2012; Behera et al., 2023).

Experimentos adicionais foram realizados com um laser verde ( $\lambda = 532$  nm). As amostras foram inicialmente incubadas no escuro por 10 minutos, seguidos de 20 minutos adicionais sob agitação magnética, ainda no escuro. Após esse período, iniciou-se a irradiação, com registros de fluorescência realizados a cada 5 minutos. A distância entre o laser e a amostra foi de 24,5 cm. O volume total da solução na cubeta foi ajustado para 2,5 mL. Todas as amostras foram preparadas mantendo-se 5% de DMSO na solução final.

#### *4.7.3 Propriedades de ligação de BSA por análise de emissão*

A albumina sérica bovina (BSA), livre de ácidos graxos, foi obtida da Sigma-Aldrich e empregada sem purificação adicional. Preparou-se uma solução estoque de BSA a 100  $\mu$ M em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), enquanto as soluções estoque das porfirinas (500  $\mu$ M) foram preparadas em DMSO.

Medições de emissão de fluorescência em estado estacionário foram conduzidas na faixa de 305–500 nm ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) a 298 K. A adição de porfirina à solução de BSA (5,0  $\mu$ M em tampão PBS pH 7,4) variou a concentração final de 0 a 18  $\mu$ M. Devido à alta capacidade de absorção dos derivados de porfirina, ajustes de fluorescência em estado estacionário foram feitos para efeitos de filtro interno, conforme descrito na literatura (Chaves et al., 2019)

Para obter *insights* quantitativos sobre a afinidade de ligação entre BSA e os derivados de porfirina, vários parâmetros, como a constante de extinção de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), a constante de taxa de extinção bimolecular ( $k_q$ ), a constante de associação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ) e os valores de Gibbs de energia livre ( $\Delta G^\circ$ ) foram determinados usando as equações relevantes da literatura (Acunha et al., 2021).

Espectros de fluorescência síncrona (FS), variando de 240 a 340 nm, foram obtidos utilizando 5,0  $\mu$ M de BSA em tampão PBS pH 7,4, tanto na ausência quanto na presença de porfirinas, na mesma concentração utilizada nas medições de fluorescência em estado estacionário. As medições foram realizadas em  $\Delta\lambda = 60$  nm e  $\Delta\lambda = 15$  nm para resíduos de triptofano e tirosina, respectivamente.

Decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo de 5,0  $\mu$ M de BSA em solução tampão PBS pH 7,4 foram medidos na ausência e na presença de porfirinas, na concentração máxima de porfirina (18 $\mu$ M) utilizada nas medições de fluorescência em estado estacionário. Os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo foram analisados usando o mesmo método na seção fotofísica.

# Capítulo IV

## Resultados e discussões

*Neste capítulo será apresentado os resultados obtidos durante a caracterização fotofísica das porfirinas monocatiônicas, e sua interação com a albumina sérica bovina.*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

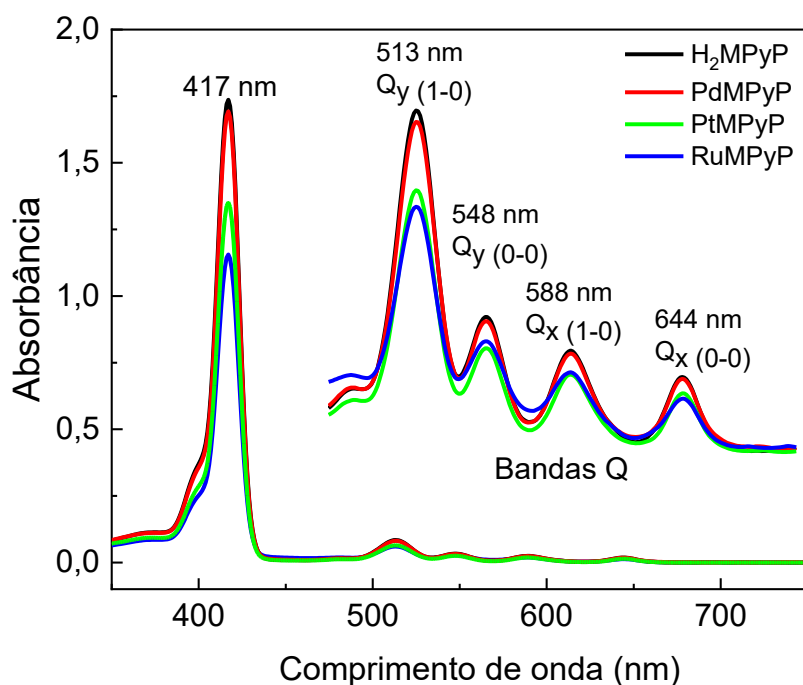
### 5.1 Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis

#### 5.1.1 Absortividade molar

A primeira etapa do processo fotodinâmico é a absorção de luz pelo sensibilizador, que deve ter alta absorção na faixa de emissão da lâmpada (sobreposição entre os espectros de absorção e emissão). Após isso, ocorre um rápido relaxamento dos estados excitados, que pode gerar espécies reativas de oxigênio que podem levar à morte celular.

De modo geral, todas as porfirinas apresentam espectros de absorção compatíveis com o comportamento típico de porfirinas de base livre, caracterizados por uma banda Soret intensa (entre 410-450 nm) e quatro bandas Q (entre 500-650 nm) (Figura 12). Essas bandas de absorção são atribuídas às transições eletrônicas dentro do sistema macrocíclico conjugado (Silva et al., 2025). As medidas foram realizadas em solução de DMSO, com as respectivas concentrações detalhadas na seção experimental.

Figura 12- Espectros de absorção UV-vis em DMSO das porfirinas  $H_2MPyP$ ,  $PdMPyP$ ,  $PtMPyP$  e  $RuMPyP$ . O detalhe amplia a região das bandas Q entre 450 e 700 nm.

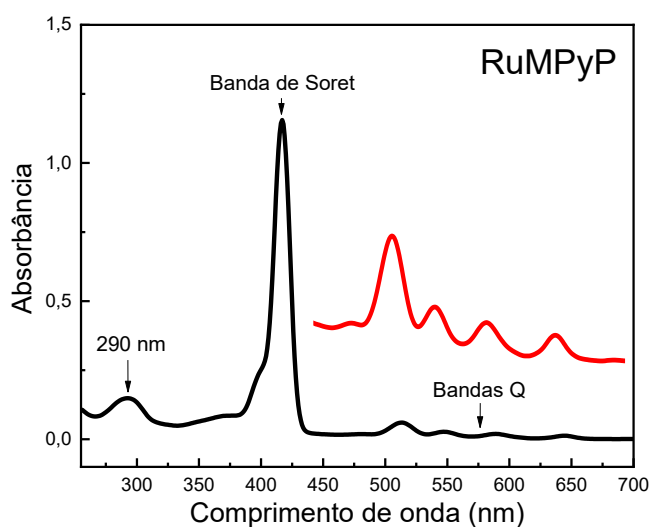


Fonte: Autoria própria.

Além dessas bandas características, a porfirina monocatiônica complexada com rutênio (Figura 13) apresentou uma banda adicional em aproximadamente 290 nm, atribuída a

transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  nos ligantes bipyridínicos coordenados ao centro metálico, evidenciando a influência da complexação sobre o perfil espectral do composto (LALLI et al., 2012).

Figura 13- Espectros de absorção no UV-Vis da porfirina monocatiônica RuMPyP, destacando as bandas características (Soret e Q).



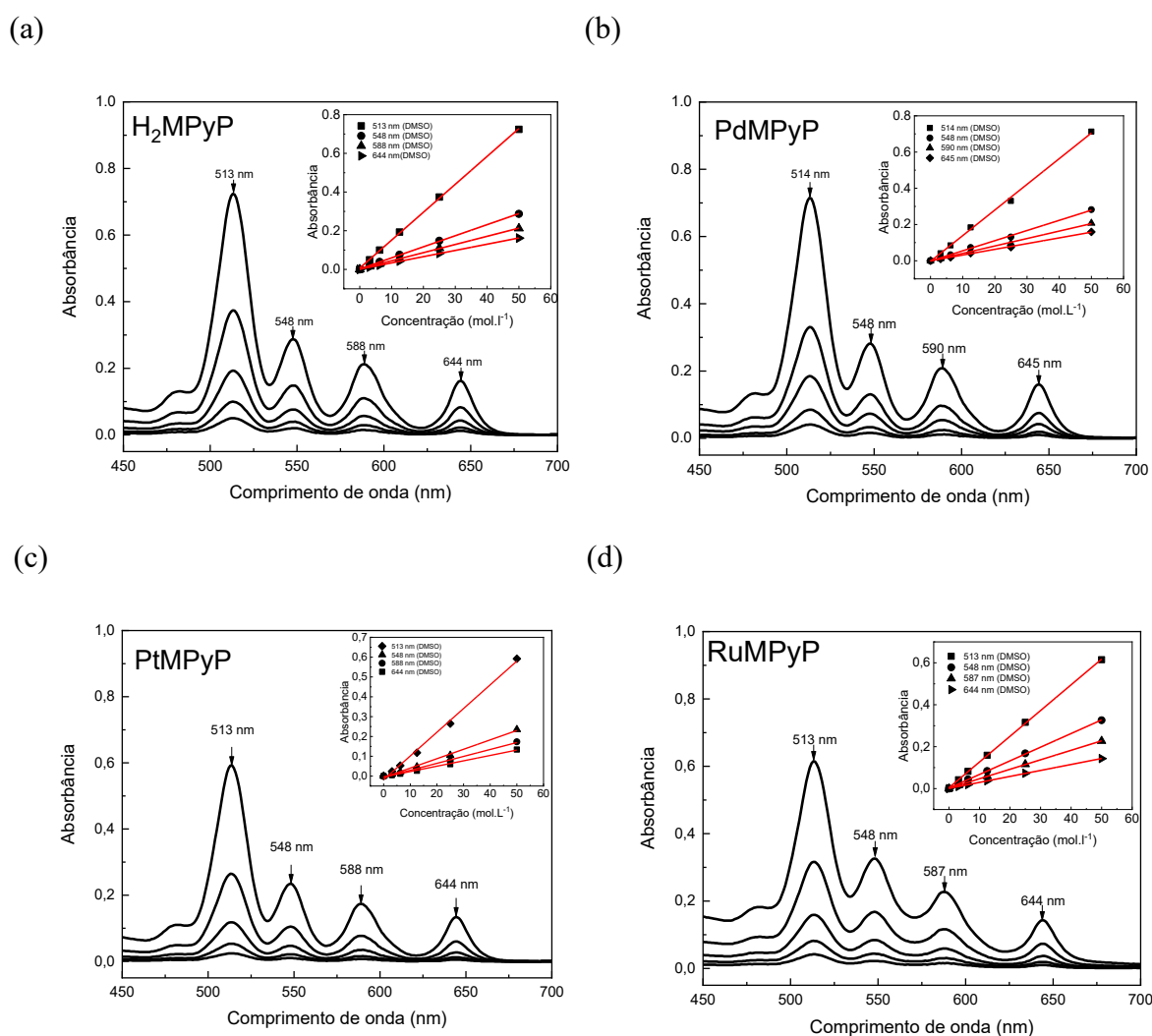
Fonte: Autoria Própria.

Para as porfirinas estudadas, os espectros de absorção em diferentes concentrações apresentaram comportamento linear, sem desvios significativos no comprimento de onda máximo da banda Soret. Também não foram observados alargamentos das bandas ou o surgimento de novas transições espectrais, o que reforça a ausência de agregação molecular. Vale mencionar que a formação de agregados compromete a geração de espécies reativas de oxigênio, prejudicando o desempenho dos fotossensibilizadores.

Esse resultado é atribuído à estabilidade eletrônica do sistema  $\pi$  conjugado do anel porfirínico, que mantém as moléculas bem dispersas, evitando interações que levem à agregação. Esse comportamento é considerado favorável, pois a não agregação em solução contribui diretamente para a eficácia das porfirinas como fotossensibilizadores. Embora a presença de diferentes metais possa influenciar a distribuição eletrônica e a estabilidade estrutural da porfirina, não foram observadas variações significativas nas bandas de absorção (Soret e Q) entre os diferentes íons metálicos coordenados, o que indica alta estabilidade dessas moléculas em DMSO.

De acordo com a lei de Lambert-Beer, o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) de um composto em determinado comprimento de onda pode ser obtido a partir do declive da reta da absorbância em função da concentração (gráfico  $A \times c$ ), dividido pelo caminho óptico ( $l$ ). Em DMSO, as bandas Q foram observadas em 513 nm ( $Q_{y(1-0)}$ ), 548 nm ( $Q_{y(0-0)}$ ), 588 nm ( $Q_{x(1-0)}$ ) e 644 nm ( $Q_{x(0-0)}$ ) (Figura 14), enquanto a banda Soret foi detectada em 417 nm (Figura 15).

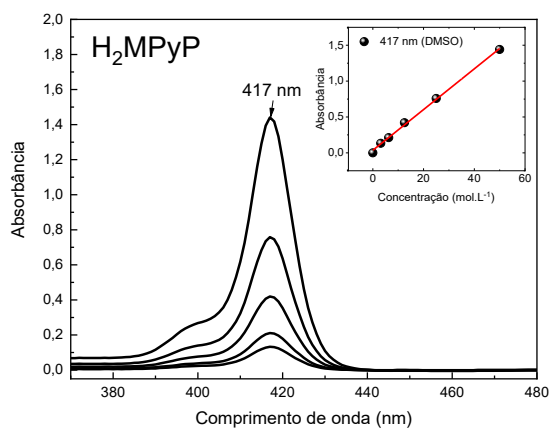
Figura 14- Espectros de absorção na banda Q das porfirinas em diferentes concentrações: a)  $H_2MPyP$ , b)  $PdMPyP$ , c)  $PtMPyP$  e d)  $RuMPyP$ . O detalhe inserido mostra a dependência linear da absorbância em relação à concentração. Todas as medições foram realizadas utilizando DMSO como solvente.



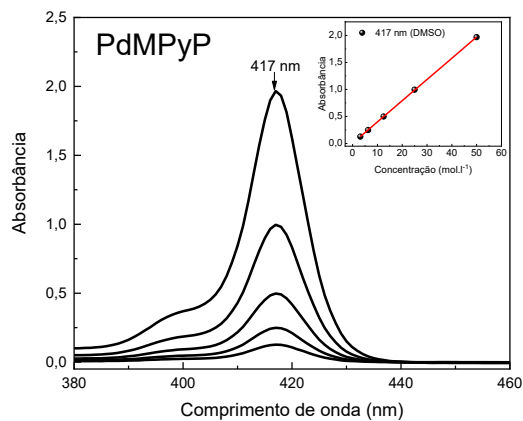
Fonte: Autoria Própria.

Figura 15- Espectros de absorção na banda de Soret das porfirinas em diferentes concentrações: a)  $H_2MPyP$ , b)  $PdMPyP$ , c)  $PtMPyP$  e d)  $RuMPyP$ . O detalhe inserido mostra a dependência linear da absorbância em relação à concentração. Todas as medições foram realizadas utilizando DMSO como solvente.

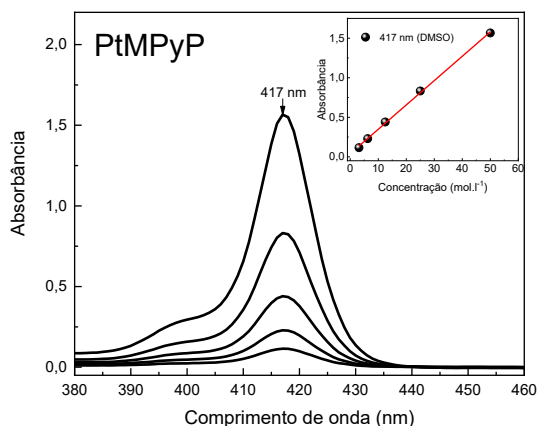
a)



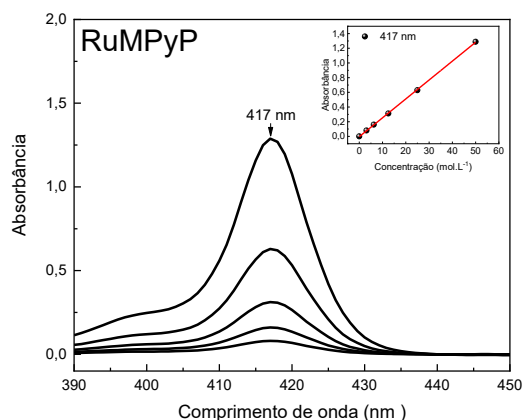
b)



c)



d)



Fonte: Autoria Própria.

Para caracterizar as diversas famílias de compostos sintetizados, é fundamental calcular a absorvidade molar para cada banda do espectro de absorção. Através da aplicação da lei de Lambert-Beer e utilizando o declive das retas ajustadas, determinou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) para as bandas Q e Soret. Em DMSO, a lei de Lambert-Beer foi obedecida para todas as porfirinas. Os valores dos coeficientes de absorção molar ( $\epsilon$ ) estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Transições eletrônicas das porfirinas estudadas por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, em DMSO.

| Porfirinas          | $\lambda = \text{nm} (\epsilon = \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$ |                          |                          |                          |                          |
|---------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                     | Soret<br>(417 nm)   | $Q_{x(0-1)}$<br>(513 nm) | $Q_{y(0-0)}$<br>(548 nm) | $Q_{y(0-1)}$<br>(588 nm) | $Q_{y(0-0)}$<br>(644 nm) |
| H <sub>2</sub> MPyP | $3,36 \cdot 10^5$   | $1,38 \cdot 10^4$        | $5,44 \cdot 10^3$        | $4,01 \cdot 10^3$        | $3,05 \cdot 10^3$        |
| PdMPyP              | $3,9 \cdot 10^5$  | $1,37 \cdot 10^4$        | $5,41 \cdot 10^3$        | $4,02 \cdot 10^3$        | $3,11 \cdot 10^3$        |
| PtMPyP              | $3,21 \cdot 10^5$   | $1,3 \cdot 10^4$         | $5,16 \cdot 10^3$        | $3,82 \cdot 10^3$        | $2,95 \cdot 10^3$        |
| RuMPyP              | $2,44 \cdot 10^5$   | $1,39 \cdot 10^4$        | $6,97 \cdot 10^3$        | $4,98 \cdot 10^3$        | $3,31 \cdot 10^3$        |

Fonte: Autorial Própria.

Nos espectros obtidos, observa-se que a introdução de complexos polipiridílicos periféricos não alterou de forma significativa a posição dos máximos de absorção, sendo os coeficientes de extinção molar das porfirinas bastante semelhantes. Em contrapartida, a RuMPyP apresenta  $\epsilon$  mais elevados nas bandas Q em relação aos demais derivados, enquanto na banda Soret (B) seus valores são inferiores. Esse comportamento pode estar associado à presença de uma banda de transferência de carga metal–ligante (MLCT), típica de complexos de rutênio (II), geralmente observada na região de 450–500 nm (Engelmann et al., 2002).

A transferência de carga metal–ligante (MLCT) é um processo fotofísico em complexos de metais de transição, no qual um elétron é promovido do centro metálico para um ligante aromático ou diimínico, formando um estado excitado tripleto. Esse estado é rapidamente populado após excitação e pode ser localizado em um ligante ou deslocalizado entre vários, sendo determinante para as propriedades de luminescência, relaxamento e reatividade fotoquímica do complexo (Wang et al., 2004).

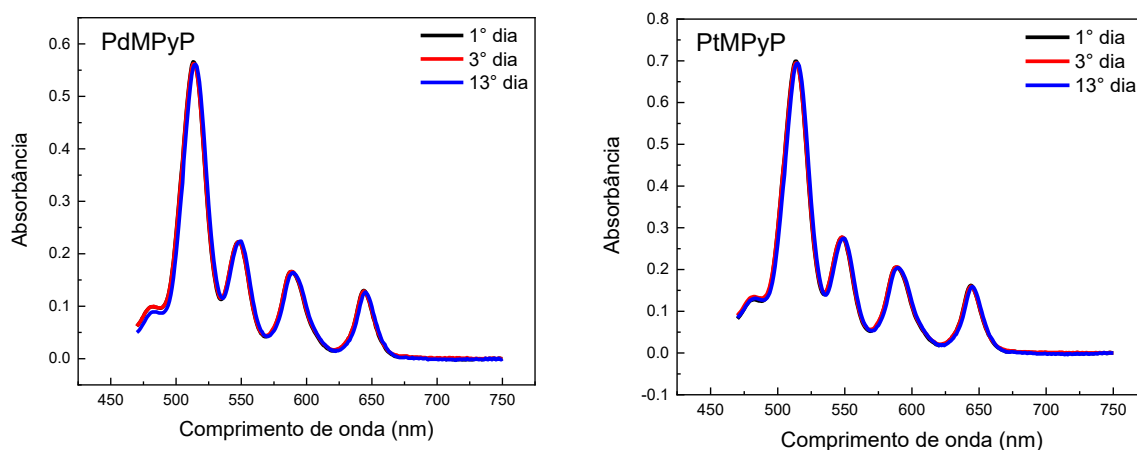
Considerando que a determinação de  $\epsilon$  depende da validade da Lei de Lambert-Beer, avaliou-se a linearidade da absorbância em função da concentração. Os coeficientes de correlação obtidos foram altamente satisfatórios, e dentro do intervalo de concentrações analisado não foram observados desvios da linearidade, o que indica ausência de agregação dos compostos na faixa investigada.

## 5.2 Análise da influência do tempo na estabilidade das porfirinas em solução

As porfirinas constituem um conjunto de compostos cujas propriedades químicas e físicas são significativamente influenciadas pelos grupos substituintes presentes no macrociclo. Entre as propriedades físicas afetadas, destacam-se a estabilidade e a solubilidade em solução.

Com base nos resultados obtidos, os espectros de absorção UV-Vis das porfirinas metaladas com paládio e platina (PdMPyP e PtMPyP), ver figura 16, mantiveram-se praticamente inalterados ao longo de 13 dias. Essa constância espectral indica que as estruturas moleculares dessas porfirinas permaneceram estáveis, sem apresentar sinais de degradação, oxidação ou agregação significativa durante o período de observação. Tal comportamento está associado à rigidez estrutural do anel tetrapirrólico e à forte coordenação dos íons metálicos, que formam complexos com geometria quadrado-planar e alta simetria, conferindo baixa tendência à agregação e alta resistência à degradação fotoquímica. Esses fatores são essenciais para a manutenção das bandas características de Soret e Q.

Figura 16 - Espectros de absorção para avaliação da estabilidade das porfirinas PdMPyP e PtMPyP em diferentes dias.

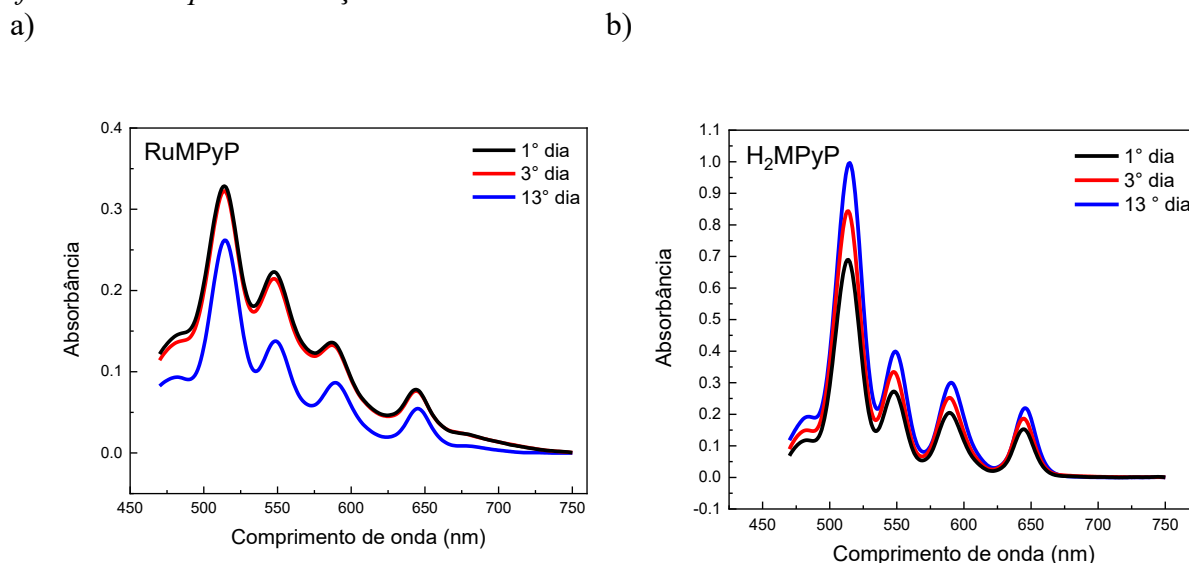


Fonte: Autoria Própria.

Essa estabilidade prolongada reforça o potencial dessas porfirinas para aplicações em terapia fotodinâmica e dispositivos ópticos, onde a integridade espectral é fundamental para a eficiência dos processos. Tal comportamento pode ser atribuído à rigidez estrutural do anel tetrapirrólico, à presença de substituintes que dificultam a agregação intermolecular e à repulsão eletrostática entre as moléculas.

A porfirina RuMPyP (Figura 17.a) apresentou fotobranqueamento, um fenômeno comum em muitas porfirinas quando expostas à luz. Esse processo resulta na diminuição das bandas de absorção no espectro de excitação da amostra, refletindo uma redução na concentração do composto ativo, uma vez que a absorvância é diretamente proporcional à concentração. Já o composto H<sub>2</sub>MPyP (Figura 17.b) apresentou um aumento gradual nas bandas de absorção ao longo dos dias. Considerando que a amostra necessita de um tempo maior para completa solubilização, esse aumento pode estar relacionado à dissolução progressiva da porfirina na solução, resultando em maior concentração efetiva da espécie ativa.

Figura 17- Espectros de absorção da RuMPyP (a) e da H<sub>2</sub>MPyP (b) registrados em diferentes dias para avaliação de sua estabilidade.



Fonte: A autoria Própria.

### 5.3 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ )

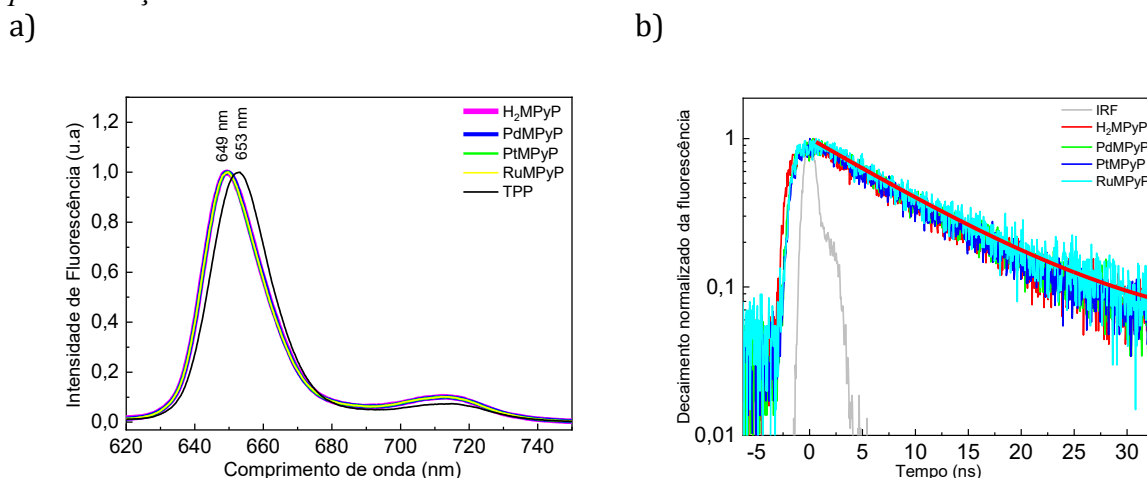
A fluorescência é a emissão de fótons que ocorre durante o processo de relaxação molecular, sem mudança na multiplicidade de spin, permitindo o retorno do estado excitado singlete ( $S_1$ ) ao estado fundamental ( $S_0$ ). O  $\Phi_F$  representa a probabilidade de que a molécula, ao ser excitada, retorne ao estado fundamental por meio da emissão de fluorescência, em vez de se desativar por processos não radiativos.

A Figura 18.a apresenta os espectros de emissão de fluorescência das porfirinas estudadas em solução de DMSO após excitação a 514 nm, já a Figura 18.b apresenta as curvas de decaimento da fluorescência. Todas as amostras independentes da natureza dos compostos de coordenação periférica, exibiram um pico de emissão principal a 649 nm, correspondente à

transição eletrônica Q (0,0), e um ombro em torno de 715 nm, referente à banda Q (0,1). Essas bandas mostram um deslocamento para o azul de aproximadamente 4,0 nm em comparação com o composto padrão TPP.

Para todos os compostos analisados, a banda Q (0,0) apresentou maior intensidade que a banda Q (0,1), comportamento típico de porfirinas em solução monomérica. Além disso, as moléculas mantiveram sua estrutura eletrônica no estado excitado, sem evidências relevantes de agregação. A presença bem definida das duas bandas indica que a emissão ocorre a partir do estado singlete excitado ( $S_1$ ), após uma pequena perda de energia por relaxação vibracional.

Figura 18 - (a) Espectros de fluorescência normalizados das porfirinas estudadas após excitação a 514 nm. (b) Curvas de decaimento da fluorescência das porfirinas registradas após excitação a 441 nm.



Fonte: Silva et al., 2025.

Os espectros de fluorescência das porfirinas foram registrados após diluição das soluções estoque, de forma que a absorvância em 540 nm fosse próxima de 0,05. Essa condição minimiza o efeito de filtro interno, que ocorre quando parte da luz de excitação é absorvida antes de atingir a amostra (efeito primário) e parte da luz emitida é reabsorvida antes de sair da célula (efeito secundário). Nessas condições, a intensidade de fluorescência observada ainda depende da densidade óptica da amostra nos comprimentos de onda de excitação e emissão, tornando a relação entre intensidade e concentração do fluoróforo ligeiramente não linear (Kubista et al., 1994).

Os valores das absorvâncias dos espectros de absorção do padrão, no comprimento de onda de 340 nm, os valores das áreas dos espectros de emissão de fluorescência corrigidos, tanto para o padrão TPP ( $\Phi_F = 0,13$ ), como das soluções preparadas nos meios considerados,

foram analisados por meio da Eq. 3, determinando-se assim, rendimento quântico de fluorescência (Tabela 3). Complementarmente, os tempos de vida do estado excitado singlete ( $\tau_{S1}$ ) foram obtidos por meio de excitação a 441 nm utilizando fonte NanoLED, e se encontram resumidos na Tabela 3. Parte destes resultados já foi publicada previamente (Silva et al., 2025), reforçando a consistência dos dados apresentados.

*Tabela 3- Tempo de vida  $S_1$  ( $\tau_{S1}$ ) e rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_F$ ).*

| <b>Porfirinas</b>   | <b><math>\Phi_F</math></b> | <b><math>\tau_{S1}</math> (ns)</b> |
|---------------------|----------------------------|------------------------------------|
| H <sub>2</sub> MPyP | 0,10 ( $\pm 0,02$ )        | 10,00 ( $\pm 0,02$ )               |
| PtMPyP              | 0,11 ( $\pm 0,02$ )        | 10,45 ( $\pm 0,02$ )               |
| PdMPyP              | 0,11 ( $\pm 0,02$ )        | 9,95 ( $\pm 0,03$ )                |
| RuMPyP              | 0,10 ( $\pm 0,02$ )        | 10,40 ( $\pm 0,04$ )               |

Fonte: Autorial Própria.

A partir dos dados apresentados na tabela, constatou-se que os valores de rendimento quântico de fluorescência das porfirinas foram considerados satisfatórios, pois todos os complexos apresentaram valores muito semelhantes, na faixa de 0,10 a 0,11. Identificando que a inserção de diferentes íons metálicos não resultou em variações significativas no  $\Phi_F$  considerando a margem de erro experimental de  $\pm 0,02$ .

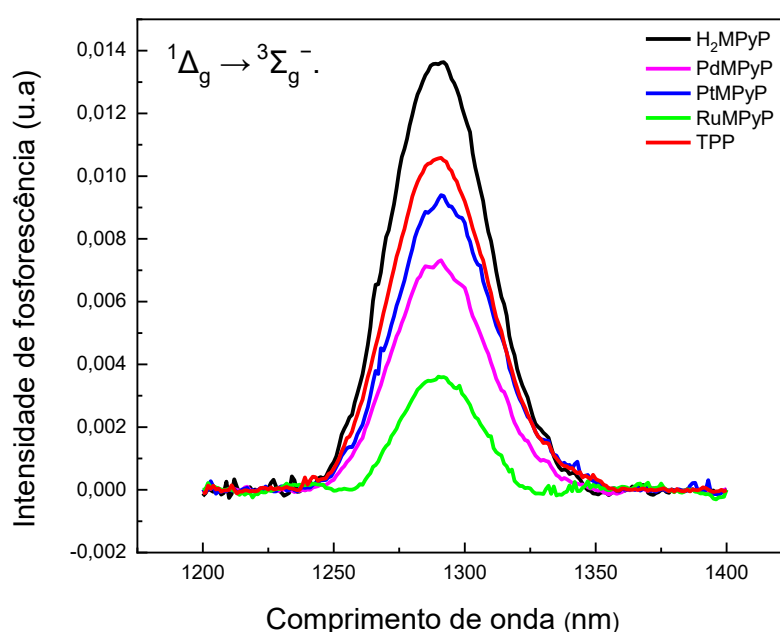
Essa constância nos valores de  $\Phi_F$  pode ser vista como um indicativo de que, apesar da complexação metálica poder alterar propriedades eletrônicas da porfirina, essas alterações não foram suficientes para impactar significativamente a eficiência do  $\Phi_F$ . Além disso, a ausência de diminuição expressiva no rendimento de fluorescência com a inserção de metais pesados (como Pt e Pd), que normalmente favorecem processos de ISC e fosforescência, pode indicar que esses processos competem de forma limitada com a fluorescência nesses sistemas específicos, ao menos nas condições experimentais utilizadas .

#### **5.4 Determinação direta do rendimento de formação de oxigênio singlete ( $\Phi_\Delta$ )**

Uma das espécies reativas mais importantes nos mecanismos dos processos fotodinâmicos é o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), que é capaz de induzir a morte celular e pode ser responsável pela fotoinativação de microrganismos. A capacidade das porfirinas em produzir espécies de  $^1O_2$  foi monitorada através do método direto. Os  $\Phi_\Delta$  correspondem à média das medidas independentes realizadas em triplicata utilizando a TPP como padrão.

As porfirinas usadas recebem o nome de FS<sub>s</sub> de segunda-geração por apresentarem modificação nas cadeias laterais do anel macrocíclico, que repercutem num aumento significativo nos seus  $\Phi_{\Delta}$ . Para os espectros de fosforescência dos compostos que são exibidos na (Figura 19), podemos observar uma banda com perfil gaussiano, aproximadamente a 1280 nm, revelando a característica da transição  $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ , com um pico de maior intensidade para a porfirina livre de metal.

Figura 19 - Espectros de emissão fosforescente do  $^1O_2$  produzido pelas porfirinas.



Fonte: Autoria Própria.

Os espectros de fosforescência apresentaram uma moderada razão sinal-ruído, mas que permitiu a determinação da área da banda de emissão com razoabilidade. Os  $\Phi_{\Delta}$  foram calculados de acordo com a Eq. 7 utilizando a TPP como padrão e estão elencados na Tabela 4. Analisando os valores de  $\Phi_{\Delta}$  para as porfirinas desse trabalho, todos os compostos testados apresentaram rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto abaixo do valor da molécula padrão ( $\Phi_{\Delta}=0,82$ ), sendo que para a porfirina de base livre o valor de  $\Phi_{\Delta}$  foi o maior em relação aos seus derivados (0,70), refletindo assim em uma maior eficiência quântica de transferência de energia, seguindo a ordem  $H_2 > Pd = Pt > Ru$ .

Tabela 4- Comparação determinados  $\Phi_{\Delta}$  por este trabalho usando como padrão a TPP.

| Composto            | $\Phi_{\Delta}$     |
|---------------------|---------------------|
| H <sub>2</sub> MPyP | 0.70 ( $\pm 0.06$ ) |
| PdMPyP              | 0.52 ( $\pm 0.06$ ) |
| PtMPyP              | 0.52 ( $\pm 0.02$ ) |
| RuMPyP              | 0.42 ( $\pm 0.07$ ) |

Fonte: Autoria Própria.

O composto contendo complexo de Ru (II) apresentou o menor valor de rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta} = 0,42$ ). Esse resultado pode estar relacionado à geração preferencial de outras espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e ânions superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), conforme observado por Gonçalves et al. (2020). Nesse estudo, os autores investigaram duas porfirinas contendo o grupo tetra-[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, a de base livre apresentou um valor de  $\Phi_{\Delta}$  ainda menor (0,02) através do método indireto. Já em um estudo realizado por Acunha et al. 2021, o rendimento quântico de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foi determinado para um corrole também com derivado de Ru (II), utilizando o método indireto, o valor obtido foi (0,62  $\pm$  0,50). Em outro trabalho realizado por Deda et al. 2012 a porfirina monocatiônica de Ru (II) estudada no presente trabalho foi caracterizada através do método indireto em diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), onde se observou que o  $\Phi_{\Delta}$  também está próximo do valor encontrado (0,51). Dessa forma, o valor encontrado ( $\Phi_{\Delta} = 0,42$ ) para a porfirina de Ru de base livre se mostra coerente com os dados da literatura, considerando-se a influência do centro metálico na modulação da formação de diferentes espécies reativas de oxigênio. Além disso esse valor está na faixa típica dos fotossensibilizadores aprovados para PDT, que apresentam rendimentos quânticos compreendidos entre 0,3 e 0,6 (Plaetzer et al., 2009).

Para as demais porfirinas de paládio (II) e platina (II) foram observados valores iguais de geração de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta} = 0,52$ ) para as duas porfirinas, indicando uma eficiência maior que 50%. Estudos encontrados na literatura corroboram com essa alta eficiência em compostos de Pd (II) e Pt (II). Em um estudo realizado por Tasso et al. (2017) em compostos de platina tetra-substituídos de base livre o rendimento foi superior a 60% que é um indicativo de comportamento fotoativo. Íons metálicos pesados, como paládio (II) e platina (II), exercem um papel importante na modificação do comportamento fotofísico de compostos tetrapirrólicos, como porfirinas, ftalocianinas e corroles (Cocca et al., 2018). Sua presença contribui para o relaxamento das regras de seleção de spin, facilitando transições normalmente proibidas, como

o cruzamento intersistema. Como consequência, o estado excitado singlete dessas moléculas tende a ser rapidamente desativado.

### 5.5 Determinação do tempo de vida de tripleto e rendimento de tripleto ( $\Phi_T$ )

A técnica de LFF (Espectroscopia de Absorção Transiente), baseada na excitação da amostra por pulsos intensos de luz e no monitoramento das espécies transientes geradas mediante uma fonte contínua de detecção, foi empregada para a determinação do tempo de vida e do rendimento quântico do estado tripleto ( $\Phi_T$ ).

Os valores de  $\Phi_T$  foram obtidos pelo método de absorção transiente em regime de flash laser, utilizando o TPP como padrão ( $\Phi_T = 0,82$ ).

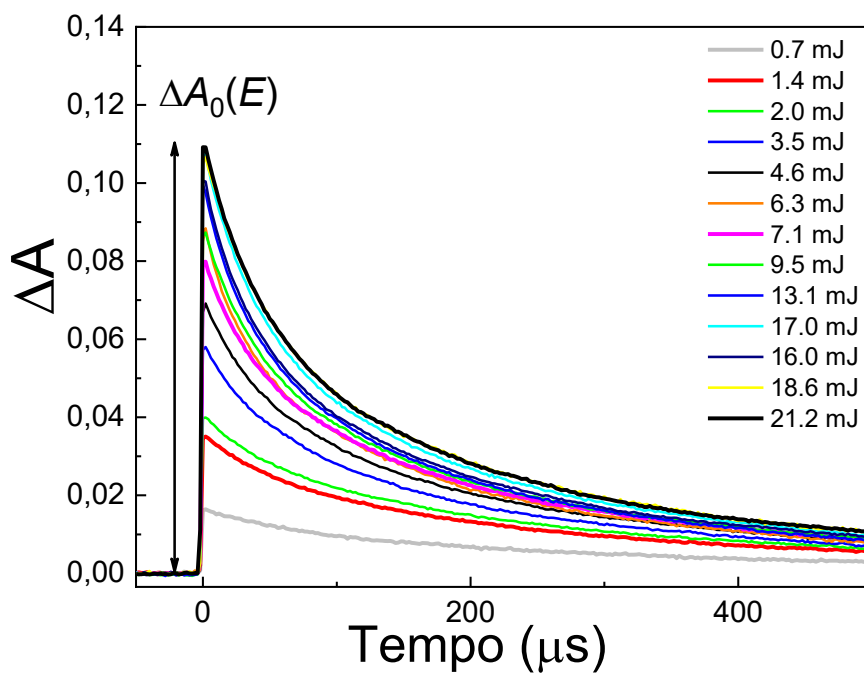
As porfirinas foram preparadas em DMSO, e suas concentrações ajustadas por medidas espectrofotométricas, de forma que a absorbância no comprimento de onda de excitação do laser ( $\lambda = 532$  nm) permanecesse em torno de 0,2. Essa condição foi adotada para atender aos requisitos da Eq. 26 e, ao mesmo tempo, evitar efeitos indesejados, como processos bifotônicos e autoabsorção.

Durante os experimentos cada porfirina foi analisada em diferentes pontos distintos (10 pontos), em cubeta de quartzo com volume de 2,5 mL, e em temperatura ambiente (22°C). Os espectros de absorção UV-Vis das amostras foram coletados antes e depois da análise de LFF. Para garantir a reprodutibilidade, todos os experimentos foram conduzidos em duplicata, e, a cada ponto de energia, a amostra foi substituída por uma nova solução, evitando assim possíveis alterações fotofísicas decorrentes de exposições sucessivas ao feixe do laser.

A variação da energia do pulso do feixe de bombeio do laser (E) resultou em alterações na magnitude da absorção transiente diferencial ( $\Delta A$ ) de todas as porfirinas. A figura 20 apresenta o perfil de decaimento cinético do estado  $T_1$  da porfirina PdMPyP obtido em diferentes energias do pulso, além de mostrar a amplitude inicial do decaimento do estado tripleto ( $\Delta A_0$ ), medida imediatamente após o término da excitação.

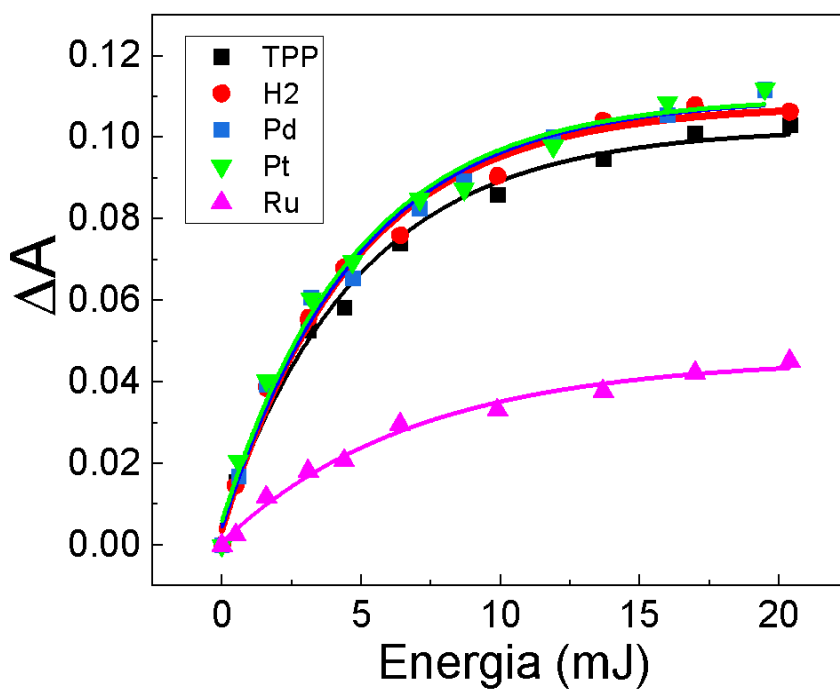
Com base nessas medições, foi possível construir o gráfico  $\Delta A_0$  versus E, conforme mostrado na Figura 21, e, a partir do ajuste exponencial desse gráfico, foi possível determinar os parâmetros  $\Delta A_{max}^s$  e  $\Delta A_{max}$  para todas as amostras. Nos *insets* das curvas (Figura 22.b-e), são apresentadas as variações das absorções transientes das amostras ( $\Delta A_0$ ) em função da absorção transiente do padrão ( $\Delta A_0^s$ ), nas regiões da curva de energias mais baixas. Ao proceder o ajuste linear dessas curvas, o coeficiente angular obtido fornece o parâmetro  $\Delta A_0 / \Delta A_0^s$  da Eq.26.

Figura 20 - Curvas de Cinética de Decaimento do estado tripleto  $T_1$  da PdMPyP, para diferentes energias de pulso de excitação.



Fonte: Aatoria Própria.

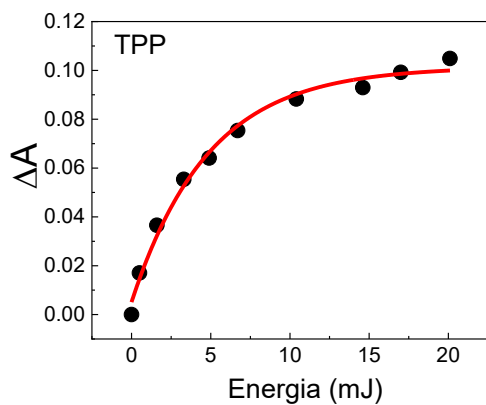
Figura 21-  $\Delta A_0$  em função da energia do pulso de laser para todas as porfirinas estudadas.



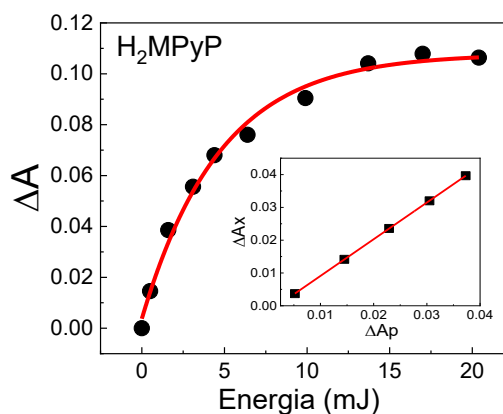
Fonte: Aatoria Própria.

Figura 22- Absorção transiente ( $\Delta A$ ) em função da energia do pulso de excitação da luz de bombeio: (a) TPP; (b)  $H_2MPyP$ , (c)  $PdMPyP$  e (d)  $PtMPyP$  e e)  $RuMPyP$ . Os insets apresentam a variação de  $\Delta A$  da amostra com o  $\Delta A$ s do padrão.

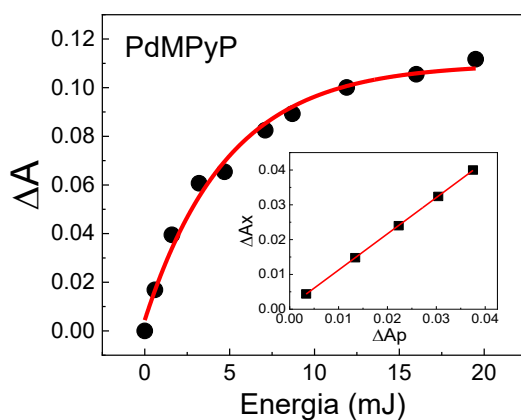
a)



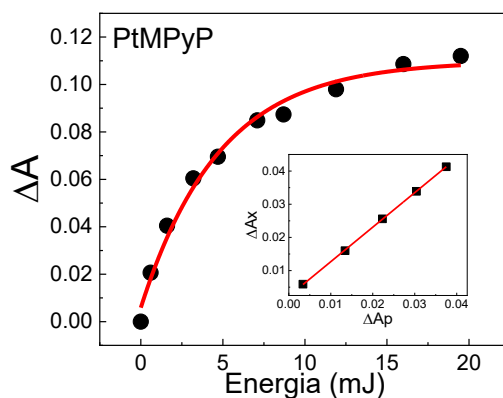
b)



c)



d)



e)

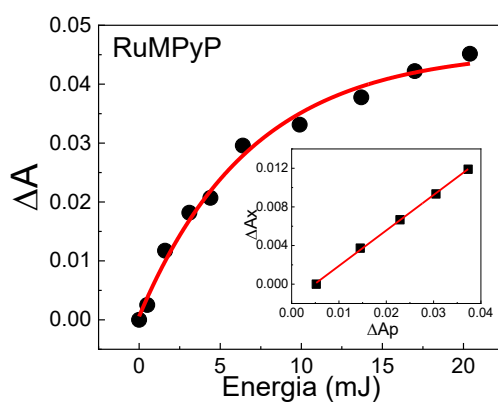


Tabela 5- Parâmetros fotofísicos das porfirinas estudadas em DMSO: tempo de vida  $T_1(\tau_{T_1})$ ; tripleto ( $\Phi_T$ ) e conversão interna ( $\Phi_{ic}$ ); constantes de taxa de decaimento radiativo ( $k_r$ ), cruzamento intersistema ( $k_{isc}$ ) e interconversão ( $k_{ic}$ ).

| PORFIRINAS          | $\tau_{T_1}$<br>( $\mu$ s) | $\Phi_T$               | $\Phi_{ic}$            | $k_r$<br>( $s^{-1}$ ) $\times 10^7$ | $k_{isc}$<br>( $s^{-1}$ ) $\times 10^7$ | $k_{ic}$<br>( $s^{-1}$ ) $\times 10^7$ |
|---------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|---|--|
| H <sub>2</sub> MPyP | 144<br>( $\pm 13$ )        | 0,86<br>( $\pm 0,02$ ) | 0,04<br>( $\pm 0,02$ ) | 1,00<br>( $\pm 0,05$ )              | 8,60<br>( $\pm 0,06$ )                  | 0,40<br>( $\pm 0,02$ )                 |
| PdMPyP              | 134<br>( $\pm 12$ )        | 0,84<br>( $\pm 0,04$ ) | 0,05<br>( $\pm 0,02$ ) | 1,05<br>( $\pm 0,03$ )              | 8,04<br>( $\pm 0,06$ )                  | 0,48<br>( $\pm 0,02$ )                 |
| PtMPyP              | 122<br>( $\pm 12$ )        | 0,86<br>( $\pm 0,02$ ) | 0,03<br>( $\pm 0,02$ ) | 1,11<br>( $\pm 0,03$ )              | 8,64<br>( $\pm 0,06$ )                  | 0,30<br>( $\pm 0,02$ )                 |
| RuMPyP              | 88<br>( $\pm 10$ )         | 0,40<br>( $\pm 0,05$ ) | 0,50<br>( $\pm 0,05$ ) | 0,96<br>( $\pm 0,09$ )              | 3,85<br>( $\pm 0,06$ )                  | 4,85<br>( $\pm 0,06$ )                 |

Fonte: Autoria Própria.

O rendimento quântico e o tempo de vida do estado tripleto das porfirinas H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP, PtMPyP e de RuMPyP estão listados na Tabela 5.

A porfirina contendo o grupo colateral Ru (II) apresentou o menor valor de  $\Phi_T$  em comparação com as outras porfirinas estudadas. Esse comportamento pode estar relacionado à presença de uma banda de transferência de carga metal-ligante (MLCT), típica de complexos de rutênio (II), a qual favorece processos de desativação não radiativa do estado excitado S<sub>1</sub>. Além disso, a supressão desse estado pelo complexo de rutênio (II) pode ocorrer também pelo efeito do átomo pesado ou por uma transferência parcial de carga entre o substituinte periférico e o anel porfirínico (Silva et al., 2025).

Em estudo correlato, Gonçalves e colaboradores analisaram a porfirina tetracatiônica de base livre contendo rutênio (II). Verificaram que o rendimento quântico do estado tripleto do RuTPyP, bem como o de outras espécies de vida curta geradas sob excitação direta por luz, apresentou-se bastante reduzido.

Além disso, verificaram que o tempo de vida dos estados tripletos associados a grupos periféricos contendo Ru (II) foi menor do que o geralmente reportado para tripletos de outras porfirinas, resultado que reforça os baixos valores obtidos neste trabalho para a porfirina RuMPyP. Segundo os autores, esse comportamento pode estar relacionado à dissipação da energia do estado tripleto da porfirina de Ru (II) por meio da formação lenta de espécies intermediárias. Esse processo pode decorrer, por exemplo, da interação entre moléculas de RuMPyP em seus estados tripletos e moléculas em estados fundamentais, ou ainda de uma

transferência de carga reversível intramolecular entre a unidade colateral  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$  e o núcleo da porfirina excitado em seu estado tripleto.

Em relação à formação de tripletos as porfirinas de  $\text{H}_2\text{MPyP}$ ,  $\text{PdMPyP}$  e  $\text{PtMPyP}$  exibem alta formação de estados tripletos com valores de  $\Phi_T$  de aproximadamente 0,85. Esses valores elevados de  $\Phi_T$  contribuem diretamente para a geração eficiente de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente oxigênio singleto.

### 5.6 Ensaio de determinação do coeficiente de partição ( $P_{ow}$ )

Os coeficientes de partição na mistura n-octanol/água é usado para avaliar como um composto tende a se distribuir entre uma fase orgânica e uma fase aquosa. Numericamente, quanto mais negativo for o valor de  $\log P_{ow}$ , mais hidrofílica é a porfirina.

Na Tabela 6, são apresentados os valores obtidos para as porfirinas analisadas. O  $\log P_{ow}$  foi determinado com o objetivo de estimar a afinidade das moléculas pelas membranas biológicas, com base na razão entre suas concentrações nas fases aquosa e orgânica.

Tabela 6- Coeficientes de partição na mistura n-octanol/água ( $\log P_{ow}$ ) das porfirinas estudadas.

| Porfirina               | $\log P_{ow}$ |
|-------------------------|---------------|
| $\text{H}_2\text{MPyP}$ | +3,60         |
| $\text{PdMPyP}$         | +2,05         |
| $\text{PtMPyP}$         | +2,10         |
| $\text{RuMPyP}$         | +2,40         |

Fonte: Autoria Própria.

A porfirina livre  $\text{H}_2\text{MPyP}$  apresentou o maior  $\log P_{ow}$ , refletindo sua maior lipofilicidade devido à ausência de grupos metálicos. Nos derivados metálicos,  $\text{PdMPyP}$ ,  $\text{PtMPyP}$  e  $\text{RuMPyP}$ , os valores de  $\log P_{ow}$  foram menores, indicando que os complexos metálicos aumentam ligeiramente a polaridade e as interações soluto-solvente, confirmando que a carga é diretamente responsável por sua maior solubilidade em meio aquoso. Esses valores estão de acordo com a literatura, em um trabalho realizado por Engelmann et al. (2007), observou-se que, em porfirinas monocatiônicas, os substituintes periféricos têm efeito relativamente pequeno sobre o  $\log P_{ow}$ , sendo o principal determinante o termo de cavitação do solvente, relacionado ao volume e à hidrofobicidade da molécula.

## 5.7 Ensaios de ligação de BSA

### 5.7.1 Análise de docking molecular para BSA: H<sub>2</sub>MPyP, PtMPyP, PdMPyP e RuMPyP.

Existem três principais sítios de ligação eminentes para moléculas pequenas: sítio I (localizado no subdomínio IIA) onde podem ser encontrados os resíduos Trp-212, sítio II (localizado no subdomínio IIIA), ambos situados em bolsos hidrofóbicos, e sítio III (localizado no subdomínio IB) situado em um bolso externo onde o resíduo Trp-134 pode ser encontrado (PAZ et al., 2023).

Visando elucidar em nível atômico a capacidade de ligação de cada porfirina à BSA, colaboradores realizaram cálculos do *docking* molecular (Silva et al., 2025). Os resultados estão resumidos na Tabela 7, que apresenta as pontuações de *docking* (adimensionais) para as interações BSA:porfirinas nos sítios I, II e III, correspondentes aos subdomínios IIA, IIIA e IB, respectivamente.

Os valores de *docking score* foram positivos em todos os bolsos da proteína analisada, indicando potencial de interação; entretanto, a diferença significativa observada para o sítio III, que apresentou a maior pontuação, corrobora com o número experimental de sítios de ligação ( $n \sim 1,0$ ) e sugere que o subdomínio IB, exposto ao meio aquoso, seja o principal local de ligação para H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP, PtMPyP e RuMPyP.

Essa preferência pode ser explicada pelo alto volume estérico das moléculas, que dificulta sua incorporação em bolsos mais internos da proteína, tornando regiões mais acessíveis mais favoráveis à interação (Santos et al., 2020).

Na literatura, alguns derivados de porfirina apresentaram a mesma tendência observada, sendo relatado por diferentes autores que o principal sítio de ligação dessas moléculas na BSA corresponde ao sítio III. Chaves et al. (2019), ao investigarem a meso-tetra(4-piridil)porfirina complexada com rutênio (II), verificaram que a interação predominante ocorria no subdomínio IB da albumina. De maneira semelhante, Santos et al. (2020) demonstraram que complexos de Pd(II)-bpy, ligados periféricamente nas posições meta e para (3-PdTPyP e 4-PdTPyP), apresentaram preferência pelo sítio III. Mais recentemente, Tisoco et al. (2022) confirmaram esse mesmo padrão ao estudarem meso-tetra (tienil) porfirinas contendo complexos periféricos de Pt (II) e Pd (II). Esses achados reforçam que, independentemente das variações estruturais dos derivados de porfirinas analisados, o sítio III se mantém como o local de ligação mais favorável.

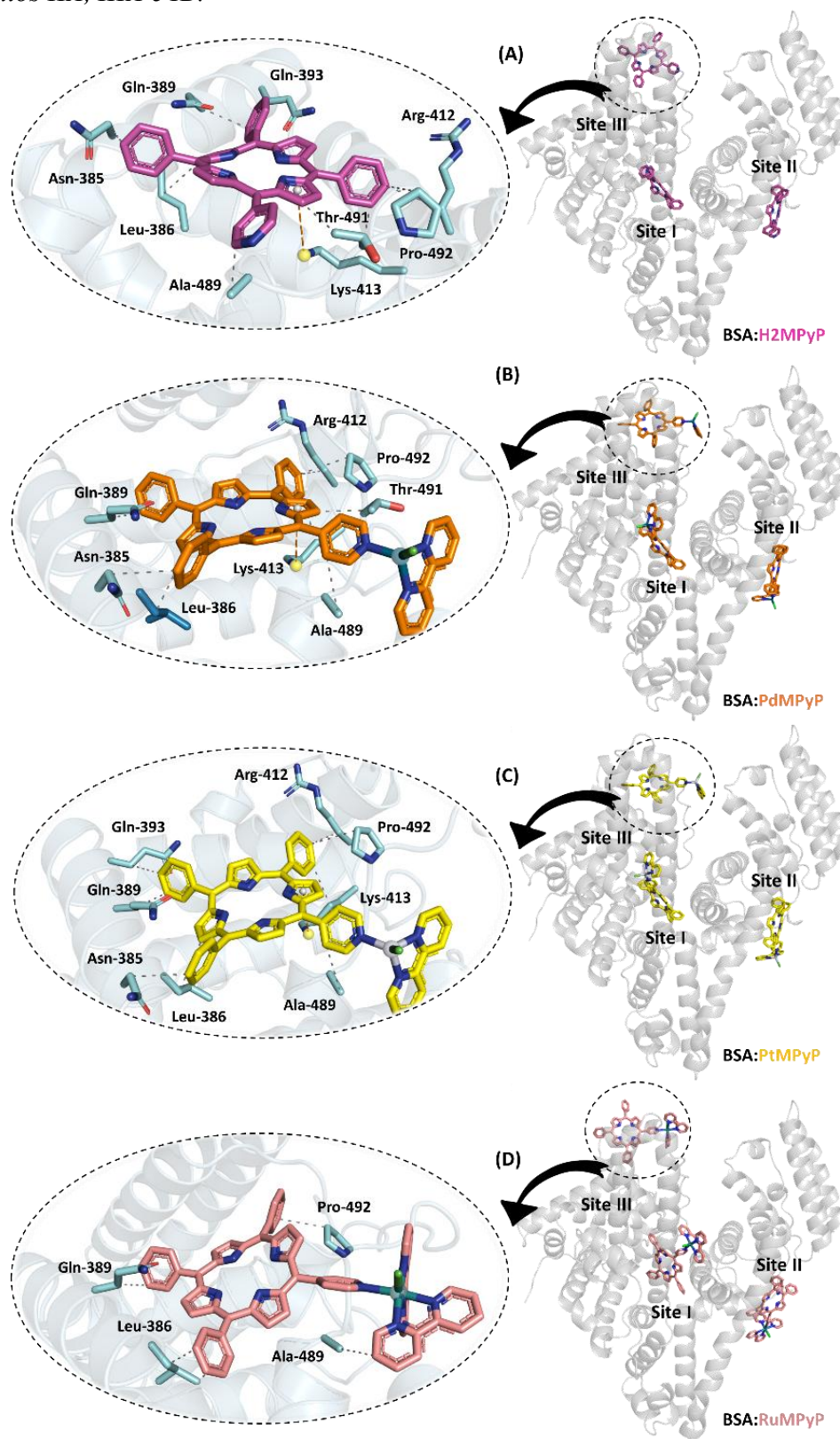
Tabela 7- Valores de pontuação de encaixe molecular (adimensional) para a interação BSA: H<sub>2</sub>MPyP / PdMPyP / PtMPyP / RuMPyP.

| Porfirinas          | Sítio I | Sítio II | Sítio III |
|---------------------|---------|----------|-----------|
| H <sub>2</sub> MPyP | 55,9    | 55,4     | 62,5      |
| PdMPyP              | 59,4    | 66,5     | 68,0      |
| PtMPyP              | 48,3    | 60,3     | 67,2      |
| RuMPyP              | 18,2    | 47,5     | 66,7      |

Fonte: Aatoria Própria.

A Figura 23 ilustra a superposição da melhor posição de encaixe das porfirinas nos três principais sítios de ligação, com a representação ampliada correspondente indicando os principais resíduos de aminoácidos que interagem com os tetramacrociclos dentro do subdomínio IB. Neste caso, interações hidrofóbicas foram sugeridas como as principais forças intermoleculares responsáveis pela estabilização do complexo albumina:porfirina. No entanto, também foi sugerida a interação do cátion  $\pi$  entre o resíduo Lys-413 com as porfirinas estudadas, dentro da distância correspondente de 3,41, 4,80 e 1,34 Å, respectivamente. Nessa representação, os resíduos que interagem com cada porfirina estão exibidos em bastão, nas seguintes cores: H<sub>2</sub>MPyPor (ciano), PdMPyPor (rosa), PtMPyPor (laranja), RuMPyPor (amarelo) e MPor (bege). Os elementos químicos foram coloridos conforme a convenção: oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul-escuro), cloro (verde-escuro), Pd (II) (verde-claro), Pt (II) (cinza) e Ru (II) (verde), sendo que, para facilitar a visualização, os átomos de hidrogênio foram omitidos. As interações hidrofóbicas e de cátion- $\pi$  estão indicadas por pontos pretos e laranja, respectivamente.

Figura 23- Superposição da melhor pose de encaixe para interação entre (A) BSA:  $H_2MPyPor$ , (B) BSA:  $PdMPyPor$ , (C) BSA:  $PtMPyPor$  e (D) BSA:  $RuMPyPor$  nos subdomínios IIA, IIIA e IB.

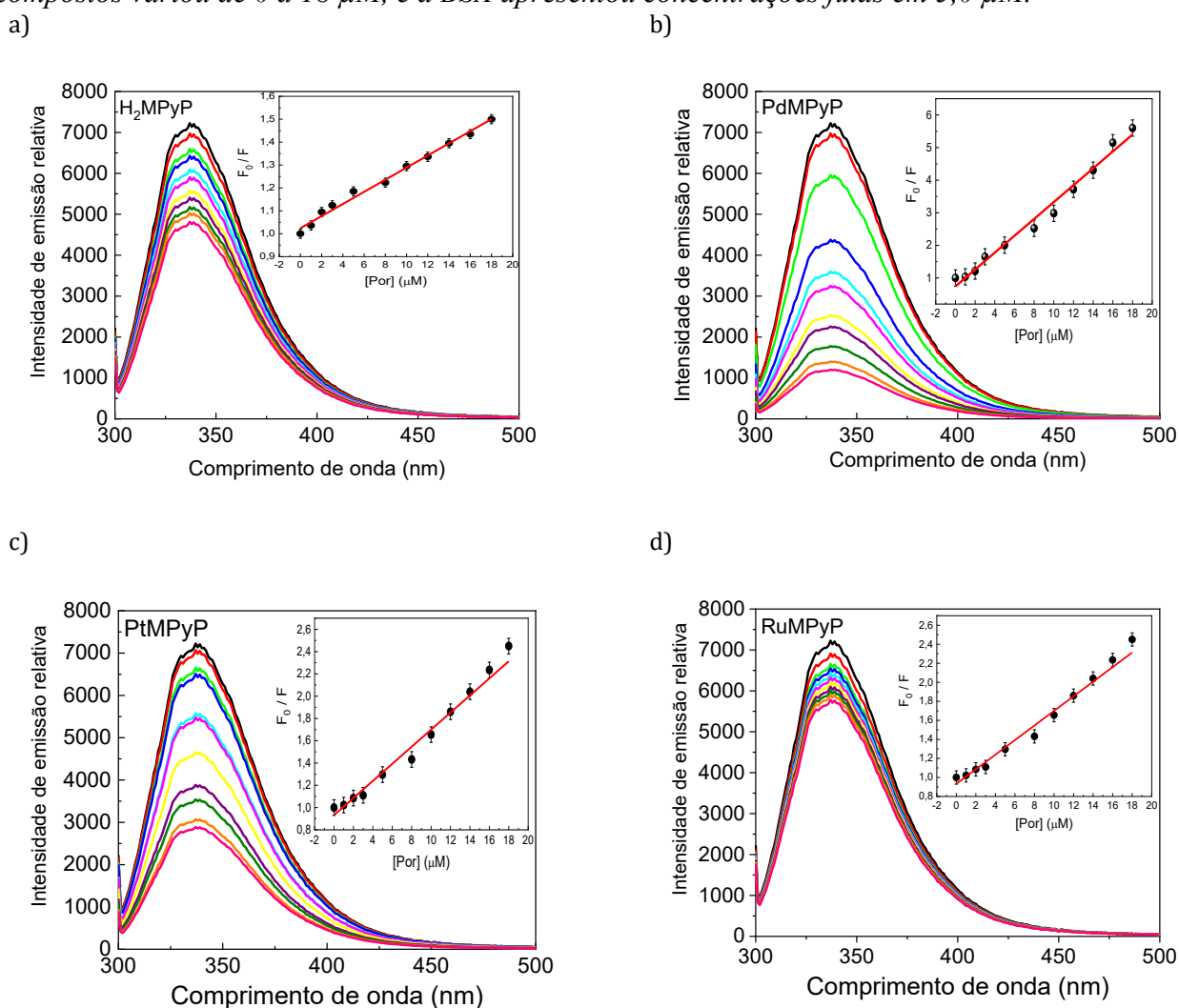


Fonte: Silva et al., 2025.

### 5.7.2 Análise de emissão de fluorescência em estado estacionário.

Os espectros de fluorescência com e sem adições sucessivas dos compostos selecionados (variando de 0 a 18  $\mu\text{M}$ ) a 298 K, obtidos a partir de ensaios de competição para a ligação das porfirinas  $\text{H}_2\text{MPyP}$ ,  $\text{PdMPyP}$ ,  $\text{PtMPyP}$  e  $\text{RuMPyP}$  com a BSA, são mostrados na Figura 24.

Figura 24- Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para à interação entre o composto BSA e as porfirinas de (a)  $\text{H}_2\text{MPyP}$ , (b)  $\text{PdMPyP}$ , (c)  $\text{PtMPyP}$  e (d)  $\text{RuMPyP}$ , a 298 K em uma solução de mistura DMSO (5%)/PBS (pH 7,4). Os insets mostram os diagramas de Stern-Volmer para as interações com BSA. A concentração dos compostos variou de 0 a 18  $\mu\text{M}$ , e a BSA apresentou concentrações fixas em 5,0  $\mu\text{M}$ .



Fonte: Silva et al., 2025.

A BSA apresentou um pico máximo de emissão de fluorescência próximo a 338 nm, devido aos dois resíduos de triptofano, a excitação ocorreu em 295 nm. Os parâmetros

competitivos — extinção de Stern-Volmer, taxa de extinção bimolecular e parâmetros de ligação ( $K_{sv}$ ,  $k_q$ ,  $K_b$ , respectivamente) — para interações BSA:porfirinas são detalhados na Tabela 8.

*Tabela 8- Parâmetros de ligação da BSA das porfirinas estudadas: supressão (Q%), constante de supressão de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), constante de taxa de supressão de Stern-Volmer bimolecular ( $k_q$ ), constante de associação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ), número de fluoróforos ( $f$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ).*

| Porfirina            | $P$<br>(%) <sup>a</sup> | $K_{sv}$<br>( $M^{-1}$ ) <sup>b</sup> x10 <sup>4</sup> | $k_q$<br>( $M^{-1} s^{-1}$ ) <sup>c</sup> x10 <sup>12</sup> | $K_a$<br>( $M^{-1}$ ) <sup>d</sup> x10 <sup>4</sup> | $f$ <sup>e</sup> | $\Delta G^\circ$<br>( $kcal mol^{-1}$ ) <sup>f</sup> |
|----------------------|-------------------------|--|---|---|------------------|--|
| H <sub>2</sub> MpPyP | 33,5                    | 2,65<br>(±0,08)  | 4,30<br>(±0,16)   | 3,73<br>(±0,01)                                     | 1,66<br>(±0,01)  | -6,25<br>(±0,05)                                     |
| PdMPyP               | 83,5                    | 25,9<br>(±0,10)  | 42,1<br>(±0,20)   | 36,7<br>(±0,25)                                     | 1,70<br>(±0,02)  | -7,60<br>(±0,05)                                     |
| PtMPyP               | 60,0                    | 7,67<br>(±0,03)  | 12,5<br>(±0,06)   | 2,08<br>(±0,03)                                     | 0,84<br>(±0,03)  | -5,90<br>(±0,05)                                     |
| RuMPyP               | 20,0                    | 1,37<br>(±0,04)  | 2,22<br>(±0,08)   | 5,28<br>(±0,02)                                     | 0,40<br>(±0,02)  | -6,45<br>(±0,05)                                     |

<sup>a</sup> Supressão (%) =  $(F_0 - F) / F_0 \times 100$ ; <sup>b</sup> Constante de supressão de Stern -Volmer; <sup>c</sup> Constante da taxa de supressão biomolecular de Stern-Volmer, usando tempo de vida de BSA ( $\tau = 6,15$  ns) (Rodrigues et al. 2025); <sup>d</sup> Constante de associação de Stern-Volmer modificada; <sup>e</sup> Número de fluoróforos; <sup>f</sup> Energia livre de Gibbs, usando  $R = 1,9875$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> e  $T = 298,15$  K.

Fonte: Silva et al., 2025.

Os maiores valores de  $K_{sv}$  ( $10^4 M^{-1}$ ) e  $k_q$  ( $10^{12} M^{-1} s^{-1}$ ) foram observados para a porfirina PdMPyP, sugerindo um possível mecanismo de extinção de fluorescência estática para BSA: PdMPyP. Os valores de  $k_q$  observados são três vezes maiores que a constante de extinção de colisão difusional ( $k_{diff} \approx 7,40 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ , de acordo com a teoria de Smoluchowski - Stokes-Einstein a 298 K) (Lakowicz et al., 2006) corroborando com a discussão de mecanismos de extinção estática (associação estado fundamental, com base nos valores de  $k_q$  (Tabela 8).

Os valores de  $K_a$  para cada porfirina indicam moderada capacidade de interação ( $\sim 10^4 M^{-1}$ ), com destaque para o derivado PdMPyP, que apresentou o maior valor de  $K_a$  (Tabela 8). A ausência ou inclusão dos compostos de coordenação na posição periférica da porfirina resultou em variações nos parâmetros de ligação com a BSA, ressaltando a significância desses complexos metálicos na interação com a biomolécula. De acordo com os valores de  $f$  obtidos, foi possível notar que os derivados H<sub>2</sub>MpPyP e PdMPyP tendem a interagir com até dois resíduos de triptofano, enquanto os derivados PtMPyP e RuMPyP tendem a interagir com apenas um

deles (Tabela 8). Também foram observados valores negativos para as energias livres de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) para todos os derivados de porfirina, destacando a espontaneidade dessa interação.

### 5.7.3 *Análise de fluorescência síncrona*

Para avaliar o ambiente molecular ao redor dos resíduos de aminoácidos tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) na ausência e na presença das porfirinas estudadas, foi realizada a análise de SF. Dessa forma, a SF é considerada uma técnica mais sensível do que a fluorescência em estado estacionário para detectar perturbações no microambiente ao redor dos resíduos de Tyr ( $\Delta\lambda = 15$  nm) e Trp ( $\Delta\lambda = 60$  nm).

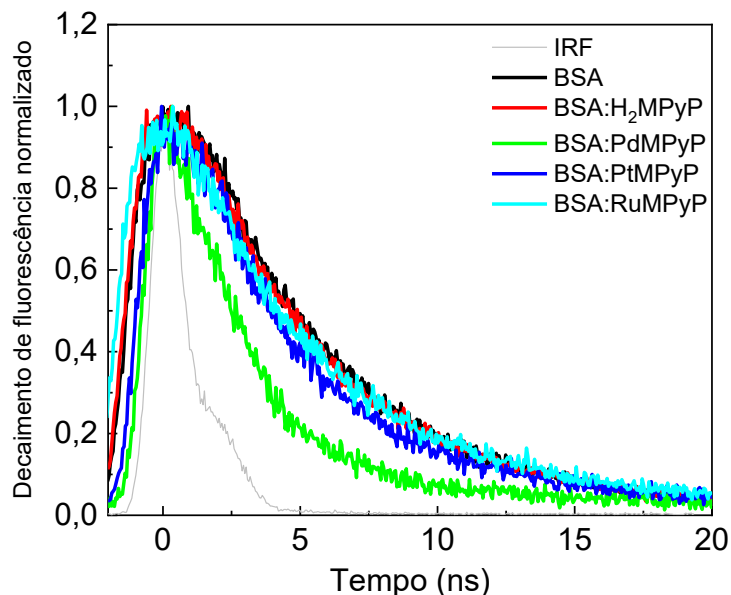
A introdução de porfirinas de base livre, com ou sem fração complexa periférica, resultou em uma diminuição na intensidade de emissão de fluorescência sem desvios significativos para azul ou vermelho no pico máximo de emissão de fluorescência. Isso sugere que essas porfirinas se ligam à BSA sem perturbar o microambiente ao redor dos resíduos de Tyr ou Trp, alinhando-se com os resultados de análises anteriores de fluorescência em estado estacionário (Silva et al., 2025).

### 5.7.4 *Análise de fluorescência resolvida no tempo*

A espectroscopia de fluorescência com resolução temporal é um método útil para identificar o principal mecanismo de extinção da fluorescência. A não variância dos valores de tempo de vida da albumina ( $\tau$ ) na presença de cada derivado de porfirina provavelmente indica um mecanismo de extinção da fluorescência estática, enquanto reduções significativas nos valores de tempo de vida revelam a ocorrência de um processo de extinção dinâmica (Bolívar et al., 2016).

Os decaimentos de fluorescência resolvidos no tempo estão representados na Figura 25 e seus parâmetros correspondentes para a interação BSA:derivados de porfirina H<sub>2</sub>MPyP, PdMPyP, PtMPyP e RuMPyP ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) foram representados na Tabela 4. A BSA apresentou dois valores de tempos de vida de fluorescência, sendo o segundo o percentual mais relativo (84,3%). Comportamento distinto pode ser notado apenas para a porfirina PdMPyP, onde uma grande variação no valor de  $\tau_2$  é observada em relação à BSA livre, seguida pelo derivado PtMPyP (Tabela 4). Os outros derivados H<sub>2</sub>MPyP e RuMPyP não afetam diretamente a dinâmica de interação com a BSA, levando à crença de que o mecanismo de supressão dos derivados Pd (II) e Pt (II) pode ser uma mistura de porções estáticas e dinâmicas.

Figura 25- Gráficos de decaimento de fluorescência normalizados entre a BSA e as porfirinas estudadas, em solução de DMSO (5%) / tampão PBS (pH 7,4), com excitação em  $\lambda = 284 \text{ nm}$  (fonte NanoLED).



Fonte: Silva et al., 2025.

Tabela 9- Parâmetros resolvidos no tempo de BSA com porfirinas em DMSO (5%) /PBS (pH 7,4).  $[BSA] = 5,0 \mu\text{M}$ ;  $[porfirinas] = 18 \mu\text{M}$ ;  $\lambda \text{ exc} = 284 \text{ nm}$  (NanoLED).

|                              | $\tau_1$ (ns)       | %<br>relativa | $\tau_2$ (ns)       | %<br>relativa | $\chi^2$ |
|------------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|----------|
| <b>BSA</b>                   | 2,49 ( $\pm 0,02$ ) | 15,7          | 5,65 ( $\pm 0,01$ ) | 84,3          | 1.093    |
| <b>BSA:H<sub>2</sub>MPyP</b> | 1,95 ( $\pm 0,02$ ) | 12,4          | 5,67 ( $\pm 0,01$ ) | 87,6          | 1.014    |
| <b>BSA:PdMPyP</b>            | 0,98 ( $\pm 0,02$ ) | 38,4          | 3,02 ( $\pm 0,07$ ) | 61,6          | 1.055    |
| <b>BSA:PtMPyP</b>            | 1,53 ( $\pm 0,05$ ) | 18,6          | 4,93 ( $\pm 0,01$ ) | 81,4          | 1.077    |
| <b>BSA:RuMPyP</b>            | 2,46 ( $\pm 0,05$ ) | 8,9           | 5,54 ( $\pm 0,01$ ) | 91,1          | 0,987    |

Fonte: Silva et al., 2025.

### 5.8 Oxidação fotodinâmica de BSA e constante de Stern-Volmer.

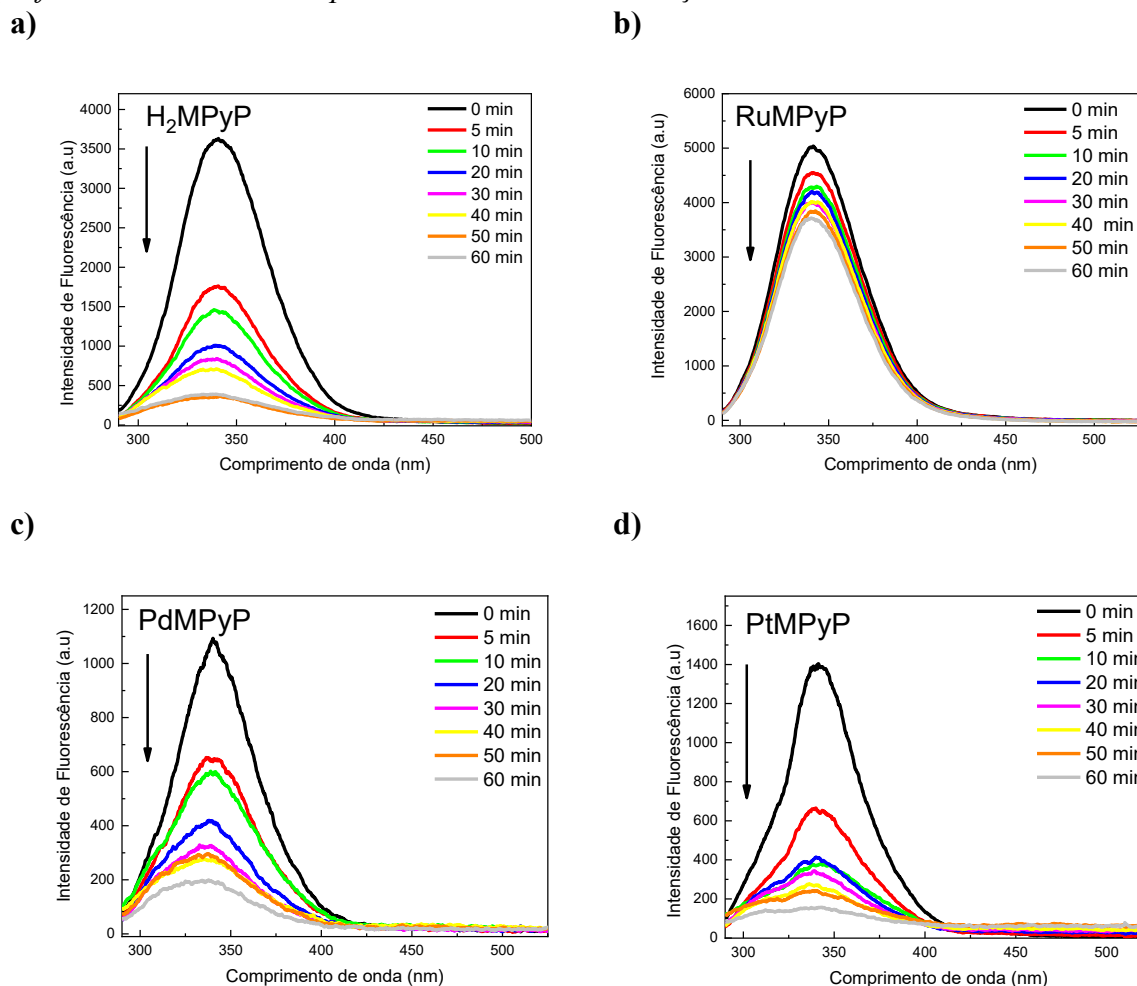
A BSA é suscetível a processos foto-oxidativos principalmente devido a ROS, como espécies radicais de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e hidroperoxila ( $\bullet\text{OOH}$ ) (Santos et al., 2020). Isso ocorre porque a oxidação de proteínas por macrociclos tetrapirrólicos é mediada pela fotodegradação de resíduos de aminoácidos, o que pode levar a alterações conformacionais na estrutura da proteína, perda de função e,

potencialmente, à sua agregação. Aminoácidos como cisteína, histidina, metionina, triptofano e tirosina podem sofrer degradação durante o processo de foto-oxidação. As albuminas, que apresentam absorção máxima em 280 nm e fluorescência em torno de 340 nm, têm sua emissão extinta por ligantes como as porfirinas. A foto-oxidação da BSA ocorre principalmente em dois sítios: o resíduo Cys-34, que gera um radical tiil ( $RS\cdot$ ), e os resíduos Trp-134 e/ou Trp-214, cuja oxidação leva à formação de radicais terciários e à ruptura do anel indólico, reconhecidos como pontos altamente susceptíveis à oxidação em proteínas (Santos et al., 2020; Bonacorso et al., 2019; Silvester et al., 1998).

Os ensaios de fotooxidação de BSA na presença de porfirinas foram avaliados monitorando as alterações no pico de emissão de fluorescência de BSA durante a fotooxidação sob irradiação com lâmpada halógena. A irradiação foi conduzida com uma taxa de fluência de  $240 \text{ mW cm}^{-2}$  por 60 minutos, sob concentração fixa dos reagentes, totalizando uma dose de luz de  $864 \text{ J cm}^{-2}$ .

Levando em consideração os espectros de fluorescência (Figura 26), podemos observar que para todos os compostos testados, ocorreu uma redução da intensidade da fluorescência da proteína ao longo das consecutivas irradiações de luz. Isso é um indicativo significativo de uma interação dos compostos com a proteína.

Figura 26 - Ensaio de fotooxidação de BSA em solução de DMSO/PBS (1:1) na presença de porfirinas usando um comprimento de onda de excitação de 290 nm.



Fonte: Autoria Própria.

O ajuste desses gráficos foi usado para determinar a constante da taxa de fotodegradação ( $k_{pd}$ ), mostrada na Tabela 10.

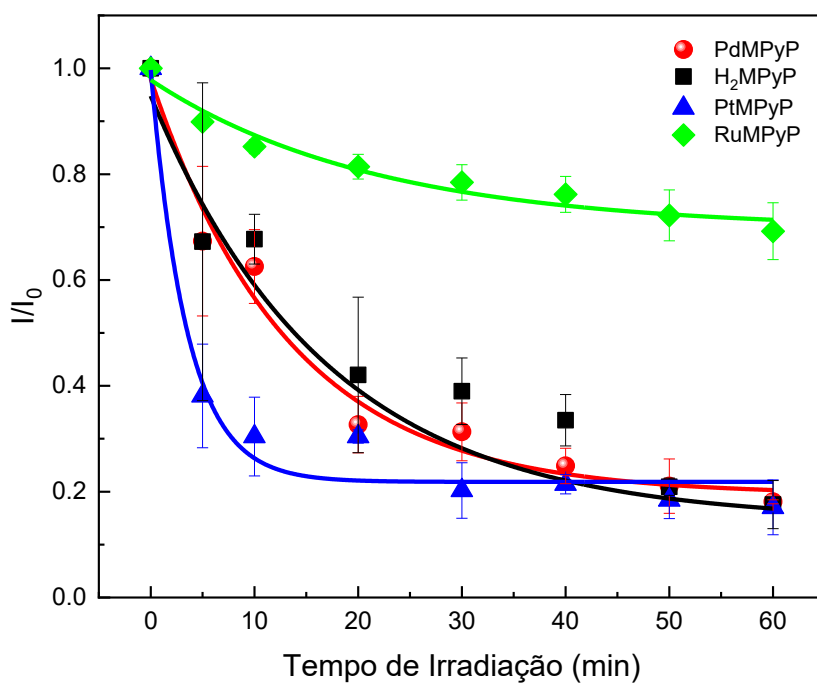
Tabela 10 – Constantes da taxa de fotodegradação ( $k_{pd}$ ) obtidas a partir de ensaios de fotooxidação BSA.

| Porfirina           | $k_{pd}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) |
|---------------------|--------------------------------|
| H <sub>2</sub> MPyP | 0,059                          |
| PdMPyP              | 0,075                          |
| PtMPyP              | 0,286                          |
| RuMPyP              | 0,046                          |

Fonte: Autoria Própria.

A Figura 27 mostra a intensidade de fluorescência normalizada de BSA em função do tempo de irradiação. Os resultados sugerem que sob iluminação, a porfirina de PtMPyP exibe uma constante de fotodegradação mais alta ( $k_{pd}$ ) se compararmos com as outras porfirinas seguindo a ordem: Pt > Pd > H<sub>2</sub> > Ru (Tabela 10).

Figura 27- Intensidade de fluorescência normalizada da BSA a 340 nm ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) em função do tempo de irradiação.



Fonte: Autoria Própria.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho esclarece como a metalação e a ligação proteica governam conjuntamente a fotooxidação da albumina sérica bovina (BSA) por porfirinas monocatiônicas sob irradiação com lâmpada halógena. Todos os derivados exibiram os perfis de absorção esperados; notavelmente, o RuMPyP apresentou características intensificadas da banda Q, consistentes com contribuições MLCT, enquanto as propriedades de emissão permaneceram comparáveis na série. Em relação aos análogos tetracatiônicos, as porfirinas monocatiônicas foram mais eficientes em povoar o estado triplete e gerar oxigênio singlete, reforçando seu potencial para aplicações fotodinâmicas. Entre elas, o H<sub>2</sub>MPyP alcançou o maior rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta} = 0,70$ ). Apesar de PtMPyP e PdMPyP exibirem  $\Phi_{\Delta}$  semelhante em solução ( $\approx 0,52$ ), o PtMPyP proporcionou a fotooxidação proteica mais eficiente, indicando que fatores além do  $\Phi_{\Delta}$  determinam o desempenho na interface proteica. Nossos resultados mostram que todas as porfirinas se ligam espontaneamente à BSA e preferencialmente se localizam no sítio III (subdomínio IB), estabilizadas por interações hidrofóbicas e  $\pi$ -catiônicas (ex.: Lys-413). Os dados sustentam uma janela de exposição-afinidade: uma fotooxidação produtiva requer uma ligação suficiente para colocalizar o fotossensibilizador com a BSA, porém não tão forte – nem tão profundamente enterrada – que o acesso do O<sub>2</sub> ao estado triplete seja prejudicado ou que vias de desativação mediadas pela proteína predominem. Neste contexto, os rendimentos de triplete e oxigênio singlete comparativamente mais baixos observados para o RuMPyP são consistentes com a desativação não radiativa assistida por efeito de átomo pesado/transferência de carga, enquanto o desempenho superior do PtMPyP em relação ao PdMPyP – apesar de  $\Phi_{\Delta}$  semelhante – destaca o papel da topologia de ligação, da disponibilidade microambiental de oxigênio e do possível *quenching* assistido pela proteína na determinação da formação efetiva de EROs próximo a resíduos suscetíveis.

Em conjunto, estas descobertas demonstram que a coordenação metálica ajusta finamente tanto a fotofísica quanto os resultados de oxidação biomolecular. Elas fornecem diretrizes práticas de projeto para fotossensibilizadores de próxima geração: (i) priorizar estruturas monocatiônicas com altos rendimentos de triplete; (ii) modular a hidrofobicidade e a força de ligação para manter a acessibilidade do O<sub>2</sub> na interface proteica; e (iii) selecionar metais/campos de ligantes que evitem perdas não radiativas por MLCT. Estes princípios traçam um caminho claro para o desenvolvimento de fotossensibilizadores com eficiência e seletividade terapêuticas aprimoradas.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, foi possível observar que as porfirinas monocatiônicas exibem propriedades fotofísicas promissoras, destacando-se como potenciais candidatos a agentes fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica. Em particular, os rendimentos quânticos de estado triplete e de oxigênio singlete dessas moléculas foram superiores aos observados para porfirinas tetracatiônicas similares, conforme dados disponíveis na literatura, reforçando seu potencial fotobiológico.

Entretanto, algumas limitações importantes foram identificadas, principalmente relacionadas à baixa solubilidade dessas porfirinas, atribuída ao seu caráter hidrofóbico. Esse fator pode comprometer a eficiência em aplicações biológicas, dificultando a administração e a disponibilidade do fotossensibilizador nos sistemas-alvo.

Dessa forma, como perspectiva futura, torna-se necessária a busca e o desenvolvimento de veículos de entrega que contornem essas limitações, promovendo maior solubilidade, estabilidade e eficiência das porfirinas monocatiônicas em aplicações de terapia fotodinâmica. A otimização dessas formulações poderá ampliar significativamente o potencial de aplicação dessas moléculas.

# Capítulo V

## Referências Bibliográficas

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd February 15, 2016, pp 347–364. doi:10.1042/BJ20150942.

Acunha, T. V.; Rodrigues, B. M.; da Silva, J. A.; Galindo, D. D. M.; Chaves, O. A.; da Rocha, V. N.; et al. Unveiling the photophysical, biomolecule binding and photo-oxidative capacity of novel Ru(II)-polypyridyl corroles: A multipronged approach. *Journal of Molecular Liquids* **2021**, *340*. doi:10.1016/j.molliq.2021.117223.

Aebisher, D.; Szpara, J.; Bartusik-Aebisher, D. Advances in Medicine: Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) August 1, 2024. doi:10.3390/ijms25158258.

Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J.; Sibata, C. H. Photosensitizers in Clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1* (1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9).

Alonso, L.; Sampaio, R. N.; Souza, T. F. M.; Silva, R. C.; Neto, N. M. B.; Ribeiro, A. O.; et al. Photodynamic evaluation of tetracarboxy-phthalocyanines in model systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**, *161*, 100–107. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.05.008.

Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M.; Tomé, J. P.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; et al. Charge effect on the photoinactivation of gram-negative and gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology* **2009**, *9*. doi:10.1186/1471-2180-9-70.

Atkins, P.; de Paula, J. *Físico-Química*, 10<sup>a</sup> ed.; LTC – Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 2018; Vol. 1.

ATKINS, P.; PAULA, J. de. *Físico-Química*. Oitava Edied. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 2008

Bagnato, VS; Aquino Junior, AE de; Carbinatto, FM *Simplifying photodynamic therapy for healthcare professionals*. São Carlos: Institute of Physics of São Carlos - IFSC, 2023. Available at: <https://repositorio.usp.br/directbitstream/2e81c8e7-b141-4c17-b5a7-ccc01005f85/3172736.pdf>. Accessed on: October 15, 2024.

Bakun, P.; Wysocki, M.; Stachowiak, M.; Musielak, M.; Długaszewska, J.; Mlynarczyk, D. T.; et al. Quaternized Curcumin Derivative—Synthesis, Physicochemical Characteristics, and Photocytotoxicity, Including Antibacterial Activity after Irradiation with Blue Light. *Molecules* **2024**, *29*(19). doi:10.3390/molecules29194536.

Bastos, M. M.; Boechat, N.; Gomes, A. T. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. The use of porphyrins in photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*(3), 257–267. doi:10.5935/1984-6835.20120021.

Behera, S.; Mohanty, P.; Dash, P. P.; Mohapatra, P.; Shubhadarshinee, L.; Behura, R.; et al. Selective Binding of Bovine Serum Albumin (BSA): A Comprehensive Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. AMG Transcend Association 2023. doi:10.33263/BRIAC136.555.

- Belatik, A.; Hotchandani, S.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H. A. Locating the binding sites of pb(II) ion with human and bovine serum albumins. *PLoS ONE* **2012**, *7*(5). doi:10.1371/journal.pone.0036723.
- Bezerra, F. C.; Vieira, E. D.; Gonçalves, P. J.; Borissevitch, I. E. Nonlinear van't Hoff Behavior in the Interaction of Two Water-Soluble Porphyrins with Bovine Serum Albumin (BSA). *ACS Omega* **2024**, *9*(48), 47699–47709. doi:10.1021/acsomega.4c07367.
- Bonacorso, H. G.; Calheiro, T. P.; Acunha, T. V.; Iglesias, B. A.; Franceschini, S. Z.; Ketzer, A.; et al. Novel aryl(heteroaryl)-substituted (pyrimidyl)benzamide-based BF<sub>2</sub> complexes: Synthesis, photophysical properties, BSA-binding, and molecular docking analysis. *Dyes and Pigments* **2019**, *161*, 396–402. doi:10.1016/j.dyepig.2018.09.076.
- Borissevitch, I. E.; Gonçalves, P. J.; Schaberle, F. A. *Fundamentos de Espectroscopia de Absorção Óptica*; Editora Livraria da Física: São Paulo, 2015.
- Bourassa, P.; Hasni, I.; Tajmir-Riahi, H. A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry* **2011**, *129*(3), 1148–1155. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.094.
- Bujacz, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2012**, *68*(10), 1278–1289. doi:10.1107/S0907444912027047.
- Cadenas E, Sies H. Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods Enzymol.* 1984;105:221-231. doi:10.1016/s0076-6879(84)05029-1
- Calixto, G. M. F.; Bernegossi, J.; De Freitas, L. M.; Fontana, C. R.; Chorilli, M.; Grumezescu, A. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*. MDPI AG March 1, 2016. doi:10.3390/molecules21030342.
- Canassa, T. Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções. *Journal of Experimental Techniques and Instrumentation* **2018**, *1*(2), 23–30. doi:10.30609/jeti.2018-2.5930.
- Caramori, G. F. *Aromaticidade-evolução histórica do conceito e critérios quantitativos*; 2009; Vol. 32.
- Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994;45:153-203. doi:10.1016/s0065-3233(08)60640-3.
- Cavalcante, R. S.; Imasato, H.; Bagnato, V. S.; Perussi, J. R. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Laser Physics Letters* **2009**, *6*(1), 64–70. doi:10.1002/lapl.200810082.
- Ceulemans, A.; Van Caemelbecke, E.; Gouterman, M. Gouterman's "Four-Orbital" Model and the MCD Spectra of High-Symmetry Metalloporphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (6), 1575–1581. <https://doi.org/10.1021/ja00266a015>
- Chaves, O. A.; Menezes, L. B.; Iglesias, B. A. Multiple spectroscopic and theoretical investigation of meso-tetra-(4-pyridyl)porphyrin-ruthenium(II) complexes in HSA-binding

studies. Effect of Zn(II) in protein binding. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, 294. doi:10.1016/j.molliq.2019.111581.

Cocca, L. H. Z.; Gotardo, F.; Sciuti, L. F.; Acunha, T. V.; Iglesias, B. A.; de Boni, L. Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra(pyridyl)porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum(II) complexes. *Chemical Physics Letters* **2018**, 708, 1–10. doi:10.1016/j.cplett.2018.07.061.

Couto, G. K.; Pacheco, B. S.; Borba, V. M.; Junior, J. C. R.; Oliveira, T. L.; Segatto, N. V.; et al. Tetra-cationic platinum(II) porphyrins like a candidate photosensitizers to bind, selective and drug delivery for metastatic melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, 202. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.111725.

Cugnasca, B. dos S., & Santos, A. A. dos. Fluorescência: princípios e algumas aplicações. In *9<sup>o</sup> Workshop do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP-AMPT*. 2021, São Paulo: Blucher. doi:10.5151/9786555501407

Da Silva, A. C. P.; De Freitas, C. F.; Tessaro, A. L.; Caetano, W.; De Oliveira Santin, S. M.; Hioka, N.; et al. Photodynamic activity and concepts: A demonstrative experiment. *Química Nova* **2018**, 41(6), 706–712. doi:10.21577/0100-4042.20170215.

Da Silva, A. R.; Pelegrino, A. C.; Tedesco, A. C.; Jorge, R. A. *Photodynamic Activity of Chloro(5,10,15,20-Tetraphenylporphyrinato)Indium(III)*; 2008; Vol. 19.

Da Silveira Santos, F.; Da Silveira, C. H.; Souza Nunes, F.; Ferreira, D. C.; Victória, H. F. V.; Krambrock, K.; et al. Photophysical, photodynamical, redox properties and BSA interactions of novel isomeric tetracationic peripheral palladium(ii)-bipyridyl porphyrins. *Dalton Transactions* **2020**, 49(45), 16278–16295. doi:10.1039/d0dt01063d.

Dąbrowski, J. M.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Monteiro, C. J. P.; Peixoto, A. F.; Karocki, A.; et al. Synthesis, photophysical studies and anticancer activity of a new halogenated water-soluble porphyrin. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, 83(4), 897–903. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00073.x.

De Oliveira, K. T.; De Souza, J. M.; Da Silva Gobo, N. R.; De Assis, F. F.; Brocksom, T. J. Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. *Revista Virtual de Química* **2015**, 7(1), 310–335. doi:10.5935/1984-6835.20150016.

De Simone, G.; Di Masi, A.; Ascenzi, P. Serum albumin: A multifaced enzyme. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI September 1, 2021. doi:10.3390/ijms221810086.

Deda, D. K.; Pavani, C.; Caritá, E.; Baptista, M. S.; Toma, H. E.; Araki, K. Correlation of photodynamic activity and singlet oxygen quantum yields in two series of hydrophobic monocationic porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2012**, 16(1), 55–63. doi:10.1142/S1088424611004336.

Deng, J.; Li, H.; Yang, M.; Wu, F. Palladium porphyrin complexes for photodynamic cancer therapy: Effect of porphyrin units and metal. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2020**, 19(7), 905–912. doi:10.1039/c9pp00363k.

Dhalla, N. S.; Temsah, R. M.; Netticadan, T. *Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases*.

Dolphin, D.; Traylor, T. G.; Xie, L. Y. *Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations*; 1997.

Engelmann, F. M.; Losco, P.; Winnischofer, H.; Araki, K.; Toma, H. E. *Synthesis, Electrochemistry, Spectroscopy and Photophysical Properties of a Series of Meso-Phenylpyridylporphyrins with One to Four Pyridyl Rings Coordinated to [Ru(Bipy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> Groups*; 2002. <[www.worldscientific.com](http://www.worldscientific.com)>.

Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Gabrielli, D. S.; Toma, H. E.; Kowaltowski, A. J.; Araki, K.; et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **2007**, *39*(2), 175–185. doi:10.1007/s10863-007-9075-0.

Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*(1), 340–362. doi:10.1039/b915149b.

Felsher, D. W. Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*. May 2003, pp 375–380. doi:10.1038/nrc1070.

Ferreira, I., Rahal, S. C., Ferreira, J., & Corrêa, T. P. Terapêutica no carcinoma de células escamosas cutâneo em gatos. *Ciência Rural*, 2006, *36*(3), 1027–1033. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300051>

Fujii, J.; Homma, T.; Osaki, T. Superoxide Radicals in the Execution of Cell Death. *Antioxidants*. MDPI March 1, 2022. doi:10.3390/antiox11030501.

Gonçalves, P. J.; Almeida, L. M.; Lima, A. R.; Teles, A. V.; Oliveira, T. M. A.; Bezerra, F. C.; Silveira-Alves Jr, E.; Leite, C. K.; Souza, G. R. L. de. Inativação Fotodinâmica: Aspectos Fotofísicos e Aplicações no Combate a Microrganismos. In *Infectologia: Bases Epidemiológicas e Clínicas*; [s.n.]: [S.l.], 2021; pp 14–31. <https://doi.org/10.37885/210303817>.

Gonçalves, P. J.; Bezzerra, F. C.; Teles, A. V.; Menezes, L. B.; Alves, K. M.; Alonso, L.; et al. Photoinactivation of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) by tetra-cationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> units. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2020**, *391*. doi:10.1016/j.jphotochem.2020.112375.

Gouterman, M. Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings. In *The Porphyrins*; Elsevier, 1978; pp 1–165. doi:10.1016/b978-0-12-220103-5.50008-8.

Gouterman, M. Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, v. 6, p. 138- 163, 1961.

Gutteridge, J. M. C. *Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage*; 1995; Vol. 12. <<https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/41/12/1819/5646128>>.

Hahn da Silveira, C.; Chaves, O. A.; Marques, A.; Rosa, N. M. P.; Costa, L. A. S.; Iglesias, B. A. Síntese, Fotofísica, Abordagens Computacionais e Propriedades Fotossensibilizadoras de

Oxigênio Singlete de Porfirinas com Substituintes  $\beta$ -Piridil Fluorados. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2022**, 2022 (20), e202200075. <https://doi.org/10.1002/ejic.202200075>.

Hu, Y. J.; Liu, Y.; Sun, T. Q.; Bai, A. M.; Lü, J. Q.; Pi, Z. B. Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2006**, 39(4–5), 280–285. doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.04.004.

Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38(5), 468–481. doi:10.1002/lsm.20361.

JR Lakowicz, Princípios da Espectroscopia de Fluorescência, primeira edição, Springer, Nova York, 2006.

Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(3):389-416. doi:10.1016/s0190-9622(00)90209-3

Khan, A. U.; Kasha, M. Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *The Journal of Chemical Physics* **1963**, 39(8), 2105–2106. doi:10.1063/1.1734588.

Kolic, P. E.; Siraj, N.; Hamdan, S.; Regmi, B. P.; Warner, I. M. Synthesis and Characterization of Porphyrin-Based GUMBOS and NanoGUMBOS as Improved Photosensitizers. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, 120(9), 5155–5163. doi:10.1021/acs.jpcc.5b12013.

Kubista, M.; Sjoback, R.; Eriksson, S.; Albinsson, B. *Experimental Correction for the Inner-Filter Effect in Fluorescence Spectra*; 1994; Vol. 119.

Kumar Panigrahi, S.; Kumar Mishra, A. Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. Elsevier B.V. December 1, 2019. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2019.100318.

Lakowicz, Joseph. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. 10.1007/978-0-387-46312-4.

Lalli, P. M.; Iglesias, B. A.; Deda, D. K.; Toma, H. E.; De Sa, G. F.; Daroda, R. J.; et al. Resolution of isomeric multi-ruthenated porphyrins by travelling wave ion mobility mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, 26(3), 263–268. doi:10.1002/rcm.5314.

Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascua, L.; Durantini, E. N. *Photodynamic studies and photoactivation of escherichia coli using hesesubstituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution*; 2004; Vol. 80.

Lee, S. Y.; Kim, C. Y.; Nam, T. G. Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives. *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd 2020, pp 5375–5392. doi:10.2147/DDDT.S275007.

Lin, S.; Liu, C.; Han, X.; Zhong, H.; Cheng, C. Viral nanoparticle system: An effective platform for photodynamic therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG February 2, 2021, pp 1–15. doi:10.3390/ijms22041728.

Lopes, J. M. S.; Costa, S. N.; Silveira-Alves, E.; Batista, A. A.; Dinelli, L. R.; Gonçalves, P. J.; et al. Singlet Oxygen Generation and Spectroscopic Properties of Supramolecular Zinc Meso-tetra(4-pyridyl) Porphyrin Bearing Outlying Ruthenium Groups. *Brazilian Journal of Physics* **2022**, 52(5). doi:10.1007/s13538-022-01166-9.

Lopes, J. M. S.; Sampaio, R. N.; Ito, A. S.; Batista, A. A.; Machado, A. E. H.; Araujo, P. T.; et al. Evolution of electronic and vibronic transitions in metal(II) meso-tetra(4-pyridyl) porphyrins. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2019**, 215, 327–333. doi:10.1016/j.saa.2019.02.024.

Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology* **2012**, 52(3–4), 174–182. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011.

Makarska-Bialokoz, M.; Lipke, A. Study of the binding interactions between uric acid and bovine serum albumin using multiple spectroscopic techniques. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, 276, 595–604. doi:10.1016/j.molliq.2018.12.026.

Martins, F. M.; Durigon, D. C.; Chaves, O. A.; Peralta, R. A.; Back, D. F.; Terenzi, H. Zwitterionic dioxidovanadium(v) complexes containing fluorinated triphenylphosphonium ligands: structure and biomacromolecule studies. *New Journal of Chemistry* **2024**, 48(41), 17722–17733. doi:10.1039/d4nj03087g.

Merchat, M.; Spikes, J. D.; Bertoloni, G.; Jofi, G. *Studies on the Mechanism of Bacteria Photosensitization by Meso-Substituted Cationic Porphyrins*; 1996; Vol. 35.

Meti, M. D.; Byadagi, K. S.; Nandibewoor, S. T.; Chimatadar, S. A. Multi-spectral characterization & effect of metal ions on the binding of bovine serum albumin upon interaction with a lincosamide antibiotic drug, clindamycin phosphate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, 138, 324–330. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.05.024.

Molina-Bolívar, J. A.; Ruiz, C. C.; Galisteo-González, F.; Medina-Ó Donnell, M.; Parra, A. Simultaneous presence of dynamic and sphere action component in the fluorescence quenching of human serum albumin by diphthaloylmaslinic acid. *Journal of Luminescence* **2016**, 178, 259–266. doi:10.1016/j.jlumin.2016.06.005.

Morgan, J.; Oseroff, A. R. *Mitochondria-Based Photodynamic Anti-Cancer Therapy*; 2001; Vol. 49. <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

Mukherjee, S. K.; Gautam, S.; Biswas, S.; Kundu, J.; Chowdhury, P. K. Do Macromolecular Crowding Agents Exert Only an Excluded Volume Effect? A Protein Solvation Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, 119(44), 14145–14156. doi:10.1021/acs.jpcc.5b09446.

Nasri, H. *Porphyrins and Metalloporphyrins: An Overview*; IEEE, 2020; pp 1–6. <https://doi.org/10.1109/DTS48731.2020.9196129>.

Naveenraj, S.; Anandan, S. Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. March 2013, pp 53–71. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001.

Oliveira, V. A.; Terenzi, H.; Menezes, L. B.; Chaves, O. A.; Iglesias, B. A. Evaluation of DNA-binding and DNA-photocleavage ability of tetra-cationic porphyrins containing peripheral

[Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> complexes: Insights for photodynamic therapy agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, 211. doi:10.1016/j.jphotobiol.2020.111991.

OriginLab Corporation. *OriginPro 2017*; OriginLab: Northampton, MA, 2017.

Ormond, A. B.; Freeman, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*. 2013, pp 817–840. doi:10.3390/ma6030817.

Park, J. M.; Hong, K. I.; Lee, H.; Jang, W. D. Bioinspired Applications of Porphyrin Derivatives. *Accounts of Chemical Research* **2021**, 54(9), 2249–2260. doi:10.1021/acs.accounts.1c00114.

Peters, T., Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*; Academic Press: San Diego, CA, 1995.

Pinto, S. C.; Acunha, T. V.; Santurio, J. M.; Denardi, L. B.; Iglesias, B. A. Investigation of powerful fungicidal activity of tetra-cationic platinum(II) and palladium(II) porphyrins by antimicrobial photodynamic therapy assays. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, 36. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102550.

Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*. March 2009, pp 259–268. doi:10.1007/s10103-008-0539-1.

Przygoda M, Bartusik-Aebisher D, Dynarowicz K, Cieślak G, Kawczyk-Krupka A, Aebisher D. Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 29;24(23):16890. doi: 10.3390/ijms242316890.

R. S. Paz, E.; Isoppo, V. G.; dos Santos, F. S.; Machado, L. A.; de Freitas, R. P.; Silva Junior, H. C.; et al. Imidazole-based optical sensors as a platform for bisulfite sensing and BSA/HSA interaction study. An experimental and theoretical investigation. *Journal of Molecular Liquids* **2023**, 387. doi:10.1016/j.molliq.2023.122666.

Ribeiro, J. N.; Jorge, R. A.; da Silva, A. R.; Flores, A. V.; Ronchi, L. M.; Tedesco, A. C. Avaliação Da Atividade fotodinâmica De Porfirinas Para Uso Em Terapia fotodinâmica através Da fotoxidação De Triptofano. *Eclét. Quím.* **2007**, 32, 07-14.

Rodrigues Perussi, J. *Inativação fotodinâmica de microrganismos*; 2007; Vol. 30.

Rodrigues, B. M.; Diniz, C. C.; Köhler, M. H.; Chaves, O. A.; Iglesias, B. A. Fluorenyl-corroles: Characterization, photophysical, photobiological, and DNA/BSA-binding properties of novel examples. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2025**, 460. doi:10.1016/j.jphotochem.2024.116112.

Ronsein, Graziella & Miyamoto, Sayuri & Bechara, Etelvino & Di Mascio, Paolo & Martinez, Glaucia. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*. 29. 10.1590/S0100-40422006000300027.

Rossi, G. G.; Guterres, K. B.; da Silveira, C. H.; Moreira, K. S.; Burgo, T. A. L.; Iglesias, B. A.; et al. Peripheral tetra-cationic Pt(II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing

mycobacteria: First application in mycobacteriology. *Microbial Pathogenesis* **2020**, *148*. doi:10.1016/j.micpath.2020.104455.

Samperi, M.; Vittorio, S.; De Luca, L.; Romeo, A.; Monsù Scolaro, L. Interaction of Aggregated Cationic Porphyrins with Human Serum Albumin. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*(3). doi:10.3390/ijms24032099.

Sánchez-Moreno, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*. 2002, pp 121–137. doi:10.1106/108201302026770.

Sarbadhikary, P.; George, B. P.; Abrahamse, H. Potential Application of Photosensitizers With High-Z Elements for Synergic Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. June 28, 2022. doi:10.3389/fphar.2022.921729.

Savelyeva, I. O.; Zhdanova, K. A.; Gradova, M. A.; Gradov, O. V.; Bragina, N. A. Cationic Porphyrins as Antimicrobial and Antiviral Agents in Photodynamic Therapy. *Current Issues in Molecular Biology*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) December 1, 2023, pp 9793–9822. doi:10.3390/cimb45120612.

Senge, M. O.; Sergeeva, N. N.; Hale, K. J. Classic highlights in porphyrin and porphyrinoid total synthesis and biosynthesis. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry April 7, 2021, pp 4730–4789. doi:10.1039/c7cs00719a.

Sharma, B.; Kaur, G.; Chaudhary, G. R. Optimization and utilization of single chain metallocatanionic vesicles for antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against: E. coli. *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*(40), 9304–9313. doi:10.1039/d0tb01551b.

Sharma, D.; Sengupta, D. Porphyrins in Photodynamic Therapy: A Review. December 11, 2023. doi:10.26434/chemrxiv-2023-j1tc1.

Sierra, M. M. S.; Giovanela, M. A utilização da Espectroscopia de Fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectiva. *Química Nova*, *19*(3) (1996).

Sies, H.; Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research July 1, 2020, pp 363–383. doi:10.1038/s41580-020-0230-3.

Silva, J. N. M.; Desordi, J. C.; Ducas, E. S. A.; Chaves, O. A.; Carmo, M. E. G.; Patrocinio, A. O. T.; et al. Insights into bovine serum albumin (BSA) photooxidation mediated by monocationic porphyrins with Pd(II), Pt(II), and Ru(II) bipyridyl complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2025**, *472*. doi:10.1016/j.jphotochem.2025.116793.

Silvester, J. A.; Timmins, G. S.; Davies, M. J. *Protein Hydroperoxides and Carbonyl Groups Generated by Porphyrin-Induced Photo-Oxidation of Bovine Serum Albumin*; 1998; Vol. 350.

Smith, K. M. Syntheses and Chemistry of Porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2000**, *4* (4), 319–324.

Su, Y.; Wu, J.; Gu, Y. Photodynamic therapy in combination with ranibizumab versus ranibizumab monotherapy for wet age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V. June 1, 2018, pp 263–273. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.05.002.

Tasso, T. T.; Tsubone, T. M.; Baptista, M. S.; Mattiazzi, L. M.; Acunha, T. V.; Iglesias, B. A. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Transactions* **2017**, 46(33), 11037–11045. doi:10.1039/c7dt01205e.

Tisoco, I.; Donatoni, M. C.; Fernandes, H.; Victória, V.; Roberto De Toledo, J.; Krambrock, K.; et al. *Supporting Information Photophysical, Photooxidation, and Biomolecule-Interaction of Meso-Tetra(Thienyl)Porphyrins Containing Peripheral Pt(II) and Pd(II) Complexes. Insights for Photodynamic Therapy Applications Electronic Supplementary Material (ESI) For*; 2022.

Toma, H. E.; Araki, K. Supramolecular assemblies of ruthenium complexes and porphyrins. *Coordination Chemistry Reviews*, [s. l.], v. 196, n. 1, p. 307–329, 2000.

Toma, H. E.; Araki, K. *Supramolecular Assemblies of Ruthenium Complexes and Porphyrins*; 2000; Vol. 196. <[www.elsevier.com/locate/ccr](http://www.elsevier.com/locate/ccr)>.

Tong, Jq., Zhang, Hx., Yang, Hm. *et al.* Estudos fotoquímicos sobre a ligação de um fluoreto orgânico à albumina sérica bovina. *Mol Biol Rep* **37**, 1741–1747 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9598-z>

Uddin, J. (Ed.). (2012). *Espectroscopia de Macro para Nano*. InTech. doi: 10.5772/2503

Valeur, Bernard. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*; Wiley-VCH, 2002.

Vatansever, F.; de Melo, W. C. M. A.; Avci, P.; Vecchio, D.; Sadasivam, M.; Gupta, A.; et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species - bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*. Blackwell Publishing Ltd 2013, pp 955–989. doi:10.1111/1574-6976.12026.

Vidal, A.; Battistin, F.; Balducci, G.; Iengo, E.; Alessio, E. A Flexible Synthetic Strategy for the Preparation of Heteroleptic Metallacycles of Porphyrins. *Inorganic Chemistry* **2021**, 60(15), 11503–11513. doi:10.1021/acs.inorgchem.1c01511.

Vinodh, M.; Alipour, F. H.; Mohamod, A. A.; Al-Azemi, T. F. Molecular assemblies of porphyrins and macrocyclic receptors: Recent developments in their synthesis and applications. *Molecules*. October 2012, pp 11763–11799. doi:10.3390/molecules171011763.

Wang, X. Y.; Del Guerzo, A.; Schmehl, R. H. Photophysical behavior of transition metal complexes having interacting ligand localized and metal-to-ligand charge transfer states. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. May 20, 2004, pp 55–77. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2004.01.002.

Yin, W. H.; Li, P. Y.; Huang, H. H.; Feng, L.; Liu, S. H.; Liu, X.; et al. Porphyrin photosensitizer molecules as effective medicine candidates for photodynamic therapy: electronic structure information aided design. *RSC Advances* **2024**, 14(40), 29368–29383. doi:10.1039/d4ra05585c.

Yu, L.; Hua, Z.; Luo, X.; Zhao, T.; Liu, Y. Systematic interaction of plasma albumin with the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V. January 1, 2022. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188655.

Yu, W.; Zhen, W.; Zhang, Q.; Li, Y.; Luo, H.; He, J.; et al. Porphyrin-Based Metal–Organic Framework Compounds as Promising Nanomedicines in Photodynamic Therapy. *ChemMedChem*. John Wiley and Sons Ltd October 5, 2020, pp 1766–1775. doi:10.1002/cmdc.202000353.

Zhang, Y.; Ma, J.; Wang, D.; Xu, C.; Sheng, S.; Cheng, J.; et al. Fe-TCPP@CS nanoparticles as photodynamic and photothermal agents for efficient antimicrobial therapy. *Biomaterials Science* **2020**, 8(23), 6526–6532. doi:10.1039/d0bm01427c.

Zhao, Y.; Cai, X.; Zhang, Y.; Chen, C.; Wang, J.; Pei, R. *Porphyrin-Based Metal-Organic Frameworks: Hydrogen Protonation Induced Q Band Absorption*; 2019.

Zhou, Z.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Liu, Z. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Shenyang Pharmaceutical University November 1, 2021, pp 668–686. doi:10.1016/j.ajps.2020.12.003.