

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

Leandro de Oliveira da Cunha

**CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO
LIPÍDICA EM MEMBRANAS MIMÉTICAS GERADOS PELA
FOTOSENSIBILIZAÇÃO COM PORFIRAZINAS**

Belo Horizonte
2025

UFMG/ICEx/DQ. 1.677
D. 917

CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO LIPÍDICA EM MEMBRANAS MIMÉTICAS GERADOS PELA FOTOSENSIBILIZAÇÃO COM PORFIRAZINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Teixeira Tasso

Ficha Catalográfica

Cunha, Leandro de Oliveira da.
C972c Caracterização de produtos de fotooxidação lipídica em membranas miméticas
2025 gerados pela fotossensibilização com porfirazinas [manuscrito] / Leandro de
D Oliveira da Cunha. 2025.
126 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Thiago Teixeira Tasso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais –
Departamento de Química.
Bibliografia: f. 90-99.
Apêndices: f. 100-126.

1. Química farmacêutica – Teses. 2. Bioquímica – Teses. 3. Fotoquimioterapia
– Teses. 4. Porfirina e compostos de porfirina – Teses. 5. Fotoquímica – Teses. 6.
Carcinoma de células escamosas – Teses. 7. Espectroscopia de ressonância
paramagnética eletrônica – Teses. 8. Lipídios – Teses. I. Tasso, Thiago Teixeira,
Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEx



"Caracterização de Produtos de Fotooxidação Lipídica Em Membranas Miméticas Gerados Pela Fotossensibilização Com Porfirazinas"

Leandro de Oliveira da Cunha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Thiago Teixeira Tasso - Orientador
UFMG

Profa. Tayana Mazin Tsubone
UFU

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG

Belo Horizonte, 05 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Teixeira Tasso, Professor do Magistério Superior**, em 06/08/2025, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Tayana Mazin Tsubone, Usuária Externa**, em 07/08/2025, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do



[Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2025, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4427361** e o código CRC **F9EBD4B4**.

Referência: Processo nº 23072.246851/2025-15

SEI nº 4427361

AGRADECIMENTO

A conclusão deste trabalho não seria possível sem o apoio e a colaboração de diversas pessoas e instituições, às quais registro aqui minha mais sincera gratidão. Agradeço primeiramente às agências de fomento **FAPEMIG, CNPq, CAPES e Finep** pelo apoio financeiro e pela confiança no desenvolvimento da ciência no país. O suporte dessas instituições foi fundamental para a realização desta pesquisa. Expresso meu reconhecimento aos centros de pesquisa e laboratórios que acolheram e possibilitaram a execução deste trabalho: **NEPS, CEI, LAREMAR e LPFI**. Cada um deles contribuiu de maneira significativa com estrutura, recursos e ambiente científico.

De forma especial, quero expressar minha profunda gratidão aos professores **Heveline Silva, Gabriel Heerdt, Rodinei Augusti, Brenda Porto, Klaus Krambrock e Maurício Baptista**. Cada um, com sua trajetória e generosidade intelectual, contribuiu significativamente para minha formação e para o fortalecimento deste trabalho. Suas orientações, críticas construtivas, sugestões e disposição para colaborar em diferentes momentos foram verdadeiramente enriquecedoras. Mais do que colaboradores, foram inspirações ao longo da caminhada. Não posso deixar de mencionar **Helena, Alê, Lucas e Lohanna**, técnicos e alunos do laboratório LPFI, cuja competência, dedicação e constante disponibilidade foram fundamentais para a execução experimental deste projeto. Sua ajuda foi sempre precisa, atenciosa e indispensável.

Àqueles que compartilharam comigo as alegrias – e muitas vezes as tristezas – nos laboratórios 206 e 208, meus sinceros agradecimentos. Amigos de boa conversa, de escuta generosa e de grande ajuda nos momentos desafiadores do cotidiano experimental, foram essenciais para tornar a jornada mais leve, produtiva e significativa. Um agradecimento especial aos professores **Gilson de Freitas e Dayse Martins**, por sua presença constante, palavras encorajadoras e apoio em momentos-chave da pesquisa. Aos colegas do laboratório 205, coordenado pelo professor Thiago Tasso, meu reconhecimento e gratidão. Conviver com esse grupo foi uma fonte constante de aprendizado, troca e crescimento. Cada conversa, colaboração e momento compartilhado foram fundamentais para o meu fortalecimento e amadurecimento científico. Em especial, agradeço à **Anielle, Pedro Pinheiro, Matheus e Thiaguinho**, pela parceria, incentivo e amizade ao longo desta trajetória.

Aos meus queridos amigos **Humberto e Felipe**, mesmo com a distância geográfica, vocês estiveram incrivelmente presentes durante todo esse caminho. Em meio aos dias difíceis, suas palavras me alcançaram como abraços, seus conselhos me trouxeram clareza, e o simples gesto de perguntar como eu estava fez toda a diferença. A saudade foi constante, mas o carinho e a amizade de vocês sempre ultrapassaram qualquer fronteira. Saber que podia contar com vocês, mesmo longe, me deu força para continuar. Obrigado por fazerem parte disso de forma tão verdadeira e essencial.

À **Patrícia** e ao **Gustavo**, não sei bem como colocar em palavras tudo o que vivemos juntos neste laboratório, porque o que construímos vai muito além da pesquisa ou da rotina acadêmica. Vocês estiveram comigo em absolutamente todos os momentos, nos dias bons e nos dias em que eu quis desistir. A leveza de vocês, o carinho, a parceria incansável e a amizade sincera foram essenciais para que eu chegasse até aqui com sanidade, coragem e esperança. Muito do que construí nesta dissertação tem o toque silencioso da presença de vocês.

Por fim, não menos importante, meu orientador **Thiago Tasso** que me aturou por longos anos ao seu lado, meu mais sincero e emocionado agradecimento. Tua presença ao longo dessa jornada foi mais do que apoio — foi um verdadeiro alicerce nos dias em que tudo parecia desmoronar. Em cada conversa, cada troca de ideia, cada silêncio respeitado e cada riso espontâneo, você fez com que esse caminho, por vezes árduo e solitário, se tornasse mais leve, mais possível, mais humano. Obrigado por caminhar comigo, por acreditar quando eu duvidei.

Meus amigos, “my friends”, **amo vocês**.

RESUMO

Desde o primeiro relato feito por Thomas J. Dougherty em 1974, a terapia fotodinâmica (TFD) evoluiu consideravelmente para se tornar um protocolo médico consolidado por diversas agências de regulamentação. Atualmente, esse procedimento é prescrito para tratamento de inúmeras enfermidades, tais como diversos tipos de câncer, pé diabético, acne inflamatória, degeneração macular, entre outros. A TFD utiliza-se de um fotossensibilizador (FS) capaz de gerar espécies reativas quando na presença de oxigênio e luz visível. Tais espécies são responsáveis por oxidar biomoléculas e consequentemente induzir a morte celular. Durante o processo de fotossensibilização, os lipídeos que constituem as membranas são os principais alvos de oxidação, uma vez que essas estruturas representam a primeira barreira de entrada em células e organelas. Um estudo prévio mostrou que duas porfirazinas (Pzs) contendo os substituintes 3-trifluorometilfenil (3-CF₃Pz) e 4-fluorofenil (4-FPz) apresentaram eficiência semelhante de produção de espécies reativas, porém demonstraram uma nítida diferença na eficiência de permeabilização de membranas miméticas. O motivo desta diferença não foi completamente elucidado e não se sabe ainda se isto afeta a fototoxicidade dos compostos em células tumorais. Dito isso, o principal objetivo deste trabalho é comparar a eficiência fotodinâmica das porfirazinas 3-CF₃Pz e 4-FPz em células *in vitro*, e explicar eventuais diferenças por meio da identificação dos tipos de espécies radicalares e produtos formados durante o processo de fotooxidação lipídica. Para isso, as Pzs foram veiculadas em lipossomos de 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), di-oleil-fosfatidilcolina (DOPC) e fosfatidilcolina de soja (SOY 95%), na proporção de 0,5 mol% de FS e foram excitadas por diferentes fontes luminosas na região do vermelho a depender do experimento. Os ensaios para a detecção de espécies reativas foram feitos com espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e os produtos de fotooxidação lipídica foram caracterizados por espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI-MS) e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). Foi analisada também a eficiência fotodinâmica dos compostos tanto em membranas miméticas, por meio do ensaio de vazamento de membrana acompanhado por medidas de fluorescência, quanto *in vitro*, utilizando-se ensaios de viabilidade celular para as linhagens celulares HaCaT e A431. Por fim, realizou-se um estudo conformacional e uma caracterização espacial dos compostos em membrana por meio de cálculos teóricos realizados no GROMACS. Quando carregados em lipossomos, observou-se que a 3-CF₃Pz apresentou atividade fototóxica 3,6 vezes maior (IC₅₀ = 0,23 μM) contra a A431 (linhagem tumoral) quando comparada a 4-FPz (IC₅₀ = 0,83 μM). Estes dados estão em concordância com os dados do experimento de vazamento de membrana, no qual, após 30 minutos de irradiação, a permeabilização da 3-CF₃Pz chegou a 96% contra apenas 16% da 4-FPz. Os dados de EPR não demonstraram uma diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio para ambas as Pzs e os resultados de ESI-MS indicam que a produção de lipídeos hidroperoxidados também é similar. Todavia os resultados de CG-MS indicam que a 4-FPz possui uma eficiência maior na formação de ácidos graxos enquanto a 3-CF₃Pz produz aldeídos lipídicos, espécies responsáveis pela permeabilização de membranas. Os dados de dinâmica molecular demonstram que

após a hidroperoxidação lipídica, a 4-FPz tende a se localizar na parte hidrofílica dos lipídeos enquanto a 3-CF₃Pz se difunde pela membrana até a região mais lipofílica, onde se concentram as insaturações lipídicas. Reações na insaturação que resultam em clivagem da cadeia carbônica induzem a formação de poros em membranas, o que justifica a maior eficiência fototóxica da 3-CF₃Pz. Diante do exposto, conclui-se que há uma diferença significativa de fototoxicidade entre as Pzs, que pode estar associada à formação de lipídeos de cadeia curta, como aldeídos lipídicos, proveniente em parte do posicionamento assumido pela 3-CF₃Pz após a hidroperoxidação lipídica que ocorre durante o processo de fotossensibilização das espécies.

Palavras-chave: tetraazoporfirinas, câncer, queratinócitos, terapia fotodinâmica, células escamosas.

ABSTRACT

Since the first report by Thomas J. Dougherty in 1974, photodynamic therapy (PDT) has evolved significantly to become an established medical protocol recognized by various regulatory agencies. Today, this procedure is prescribed for the treatment of numerous conditions, including several types of cancer, diabetic foot ulcers, inflammatory acne, macular degeneration, among others. PDT relies on a photosensitizer (PS) capable of generating reactive species in the presence of oxygen and visible light. These species are responsible for oxidizing biomolecules and, consequently, inducing cell death. During the photosensitization process, the lipids that constitute biological membranes are the primary targets of oxidation, as these structures represent the first barrier for entry into cells and organelles. A previous study demonstrated that two porphyrazines (Pzs), bearing 3-trifluoromethylphenyl (3-CF₃Pz) and 4-fluorophenyl (4-FPz) substituents, showed similar efficiencies in generating reactive species. However, they exhibited a clear difference in their ability to permeabilize model membranes. The reason for this discrepancy is still unknown, and it was not investigated yet if this difference impacts their phototoxicity in tumor cells. Considering this, the main objective of this work is to compare the photodynamic efficiency of 3-CF₃Pz and 4-FPz in cells *in vitro* and to explain any differences through the identification of radical species and oxidation products formed during lipid photooxidation. For this purpose, the Pzs were incorporated into liposomes composed of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and soybean phosphatidylcholine (SOY 95%) at a concentration of 0.5 mol% PS and were irradiated with red-region light sources depending on the experimental setup. Reactive species detection was performed using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, while lipid photooxidation products were characterized using mass spectrometry and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Photodynamic efficiency was also assessed in model membranes through membrane leakage assays monitored by fluorescence, as well as *in vitro* using cell viability assays on HaCaT and A431 cell lines. Finally, a conformational and spatial characterization study of the compounds in membrane environments was carried out using theoretical calculations performed in GROMACS. When encapsulated in liposomes, 3-CF₃Pz showed a 3.6-fold greater phototoxic activity (IC₅₀ = 0.23 μM) against A431 (tumor cell line) compared to 4-FPz (IC₅₀ = 0.83 μM). These results align with the membrane leakage assay, in which, after 30 minutes of irradiation, 3-CF₃Pz induced 96% permeabilization, whereas 4-FPz reached only 16%. EPR data revealed no significant difference in oxygen reactive species production between the two Pzs, and ESI-MS results showed comparable levels of lipid hydroperoxides. However, GC-MS analysis indicated that 4-FPz is more efficient at producing fatty acids, while 3-CF₃Pz favors the formation of lipid aldehydes, which are known to compromise membrane integrity. Molecular dynamics simulations demonstrated that following lipid hydroperoxidation, 4-FPz tends to reside in the hydrophilic region of the lipid bilayer, whereas 3-CF₃Pz diffuses deeper into the lipophilic region, rich in unsaturated lipid chains. Reactions occurring at these unsaturations can lead to carbon chain cleavage and pore formation in membranes, thereby explaining the greater phototoxic efficiency of 3-CF₃Pz. In conclusion, a significant difference in phototoxicity between the two Pzs was observed, which may

be attributed to the formation of short-chain lipid species particularly lipid aldehydes arising, at least in part, from the preferential positioning of 3-CF₃Pz following lipid hydroperoxidation during the photosensitization process.

Keywords: tetraazoporphyrins, cancer, keratinocytes, photodynamic therapy, squamous cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática do tratamento de uma lesão cutânea com TFD em um paciente.....23
- Figura 2** - Diagrama de Jablonski aplicado à terapia fotodinâmica, ilustrando: (A) excitação eletrônica, (C) decaimento não-radiativo, (B) fluorescência, (D) fosforescência e formação de ROS (Tipo I e II).....24
- Figura 3** - Principais reações e produtos gerados pelo mecanismo tipo I na terapia fotodinâmica utilizando fotossensibilizadores. Fonte: Adaptado de [12]...25
- Figura 4** - Ilustração representativa da capacidade de penetração da luz na pele, que varia conforme o comprimento de onda.27
- Figura 5** - Estruturas químicas de lipídios de membrana: fosfatidilcolina (PCs) e fosfatidiletanolamina (PEs).....27
- Figura 6** - Representação de vesículas lipossomais multilamelares (MLVs) e unilamelares (ULVs) e estruturas químicas de lipídios usados em sua formulação, como POPC, DPPC, DSPC, DOPG, DOTAP e colesterol, que modulam propriedades como carga, fluidez e estabilidade da membrana.29
- Figura 7** - Estruturas químicas representativas de três estruturas análogas as porfirinas, com destaques para os carbonos passíveis de substituição, sendo os círculos destacados em azul representando os carbonos meso e os círculos verdes os carbonos β -pirrólicos e α e β fenólicos.30
- Figura 8** - Representação estrutura das metaloporfirinas de magnésio substituídas no carbono β -pirrólico (círculos verdes) pelos grupos 3-trifluorometilfenil (3-CF₃MgPz, destacada em vermelho) e 4-fluorofenil (4-FMgPz, destacada em azul).....32
- Figura 9** - Demonstração do processo de criação da caixa para a realização da simulação da dinâmica molecular.....43
- Figura 10** - Curvas de viabilidade celular em função da concentração do fotossensibilizador para formulações lipossomais de lecitina de soja contendo a 3-CF₃Pz e 4-FPz, em ensaios com e sem irradiação (LED, 620 nm a 630 nm, 2,2 J cm⁻²). As barras de erro representam o desvio padrão

entre o resultado dos poços em uma mesma concentração de experimentos distintos.....	45
Figura 11 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF ₃ Pz e 4-FPz em linhagem de célula normal (HaCaT) a 1 μM fotossensibilizados por LED em 650 nm com uma dose de 2,2 J cm ⁻²	49
Figura 12 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF ₃ Pz e 4-FPz em linhagem de célula cancerosa (A431) a 1mM fotossensibilizados por LED em 650 nm com uma dose de 2,2 J cm ⁻²	51
Figura 13 - Porcentagem de permeabilização de membrana acompanhada pela liberação de carboxifluoresceína ao longo do tempo, realizada com fotossensibilização de lipossomos contendo as Pzs sob irradiação com laser em 648 nm.....	53
Figura 14 - Decaimento da absorbância da sonda ABDA (400 nm) indicando a geração de oxigênio singlete por meio da fotossensibilização do azul de metileno, 3-CF ₃ Pz e 4-FPz, excitados por laser em 648 nm. As barras de erro representam o desvio padrão entre o resultado obtidos entre as triplicatas do experimento.....	54
Figura 15 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete (1270 nm), comparando a 3-CF ₃ Pz e a 4-FPz em THF, com fotossensibilização realizada por laser (650 nm) e LED (633 nm).....	55
Figura 16 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete (1270 nm), comparando a 3-CF ₃ Pz e a 4-FPz, em DMPC com fotossensibilização realizada por (a) Laser (650 nm) e (b) LED (633 nm).....	57
Figura 17 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete (1270 nm), comparando a 3-CF ₃ Pz e a 4-FPz, em Lecitina de soja com fotossensibilização realizada por LED (633 nm).....	58

- Figura 18** - Comparação da absorbância dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz em mesma concentração molar. A área sombreada indica a faixa espectral de emissão da lâmpada utilizada para excitação.60
- Figura 19** - Espectros de EPR obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em THF, evidenciando a geração de oxigênio singleto pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz, ambos a 12,5 μM fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).60
- Figura 20** - Espectros de EPR em THF mostrando variação na largura de linha do aduto formados pela reação da sonda TEMP com oxigênio singleto gerado pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz.....61
- Figura 21** – Espectros de calibração da espécie TEMPOL onde (a) corresponde a caracterização do espectro de EPR do radical TEMPOL utilizando a sonda ZnS:Mn em THF e (b) ajuste do espectro experimental com simulação baseada em uma combinação de 80% de perfil lorentziano e 20% gaussiano.62
- Figura 22** - Integração dos sinais de EPR do aduto TEMPOL formado na presença dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm), comparados com uma solução padrão de TEMPOL 1,00 mM63
- Figura 23** - Análise cinética nos tempos iniciais da formação do aduto TEMPOL formado na presença dos FS's 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).64
- Figura 24** - Espectros de EPR obtidos com a sonda DMPO a 50 mM em THF, mostrando a formação de adutos induzida pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).65
- Figura 25** - Simulação espectral dos sinais obtidos para os adutos formados pela sonda DMPO após fotossensibilização.65
- Figura 26** - Obtenção dos espectros de EPR utilizando a sonda PBN a 50 mM em THF, evidenciando a degradação da sonda pela geração de ¹O₂ ao longo do tempo para ambas as Pzs fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).66

- Figura 27** - Simulação espectral dos sinais obtidos para o aduto formado pela sonda PBN após fotossensibilização da 3-CF₃Pz.....67
- Figura 28** - Espectros de EPR a uma modulação de 1G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM, fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).67
- Figura 29** - Espectros de EPR a uma modulação de 0,5 G obtidos com a sonda TEMP a 50mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM, fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm). Sendo o primeiro sinal o resultado obtido experimentalmente e os demais correspondentes a simulações.68
- Figura 30** - Cinética da formação dos adutos TEMPOL e TEMPONE em sistema aquoso gerados pela fotossensibilização da suspensão lipídica de DMPC contendo a 3-CF₃Pz (a) e a 4-FPz (b). As linhas sólidas representam os ajustes dos dados experimentais.69
- Figura 31** - Espectros de EPR a uma modulação de 1G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm)..70
- Figura 32** - Espectros de EPR a uma modulação de 0,5G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm)..70
- Figura 33** - Cinética da formação dos adutos TEMPOL e TEMPONE em sistema aquoso gerados pela fotossensibilização da suspensão lipídica de DOPC contendo a 3-CF₃Pz (a) e a 4-FPz (b). As linhas sólidas representam os ajustes dos dados experimentais.71

- Figura 34** - Espectros de massas obtidos antes e após 30 minutos de fotossensibilização com laser (648 nm) do fotossensibilizador 3-CF₃Pz carregado em lecitina de soja. A análise evidencia a oxidação lipídica ao longo do tempo. O sinal de m/z 700,60 refere-se ao padrão interno utilizado para normalização.72
- Figura 35** - Cinética da oxidação lipídica induzida por fotossensibilização da 3-CF₃Pz e 4-FPz carregada em lecitina de soja, obtida a partir da análise dos espectros de massas em diferentes tempos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão entre o resultado obtidos entre as triplicatas do experimento.73
- Figura 36** - Espectros de ¹H RMN, obtidos em campo de 400 MHz utilizando clorofórmio deuterado como solvente, demonstram a fotooxidação lipídica induzida por 3-CF₃Pz em filme lipídico após fotossensibilização por laser (648 nm). As regiões destacadas com as letras a–e correspondem a sinais característicos dos produtos de oxidação, como hidroperóxidos (a - c) e possível formação de aldeído (c–e).74
- Figura 37** - Cromatograma comparativo entre o lipídio puro e os produtos formados após fotossensibilização da 3-CF₃Pz e 4-FPz, seguido de derivatização.76
- Figura 38** - Recorte do cromatograma. (a) as principais espécies derivadas detectadas para a 3-CF₃Pz após sua fotossensibilização. (b) Estruturas propostas para os compostos identificados, com base em perfis de fragmentação e dados do NIST.77
- Figura 39** - (a) Recorte do cromatograma mostrando as principais espécies derivadas detectadas para a 4-FPz após sua fotossensibilização. (b) Estruturas propostas para os compostos identificados, com base em perfis de fragmentação e dados do NIST.77
- Figura 40** - Visualização inicial das membranas lipídicas construídas com o software Packmol, antes das suas respectivas equilibrações. (I) Bicamada lipídica pura (POPC), (II) bicamada contendo a 3-CF₃Pz, e (III) bicamada contendo a 4-FPz.79
- Figura 41** - Perfil de densidade eletrônica da bicamada lipídica pura ao longo do eixo normal à membrana (z). As curvas representam a densidade relativa a cada

grupo específico da bicamada sendo as esferas de cor roxa, os grupos fosfato e as ligações destacadas em amarelo as insaturações lipídicas. .81

- Figura 42** - (a) Perfis de densidade eletrônica ao longo do eixo normal à membrana (z) para sistemas com bicamadas constituídas apenas por POPC contendo 3-CF₃Pz e 4-FPz. (b) São mostradas representações estruturais de frames representativos extraídos da simulação, evidenciando a inserção e localização dos fotossensibilizadores nas bicamadas.82
- Figura 43** - Gráficos em que demonstram a média da distância entre o átomo de magnésio dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz e dois grupos distintos da bicamada lipídica na triplicada das simulações, constituídos apenas por POPC.83
- Figura 44** - (a) Perfis de densidade eletrônica ao longo do eixo normal à membrana (z) para sistemas com bicamadas de POPC mescladas a 18 moléculas de POPC hidroperoxidado contendo 3-CF₃Pz e 4-FPz. (b) São mostradas representações estruturais de frames representativos extraídos da simulação, evidenciando a inserção e localização dos fotossensibilizadores nas bicamadas.85
- Figura 45** - Gráficos que demonstram a média de distância entre o átomo de magnésio dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz e dois grupos distintos da bicamada lipídica na triplicada das simulações, constituídas por POPC junto a 18 moléculas de POPC hidroperoxidado.86
- Figura 46** - Estrutura dos marcadores utilizados no experimento de dano subcelular. 100
- Figura 47** - Microscopia de fluorescência demonstrando uma visão expandida das marcações no grupo controle da linhagem de células normais HaCaT. .101
- Figura 48** - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células normais HaCaT tratados a 1 µM. 102
- Figura 49** - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, irradiados, na linhagem de células normais HaCaT tratados a 1 µM. 103

Figura 50 - Microscopia de fluorescência demonstrando uma visão expandida das marcações no grupo controle da linhagem de células cancerosas A431.	104
Figura 51 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF ₃ Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células cancerosas A431 tratados a 1 µM.	105
Figura 52 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF ₃ Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células cancerosas A431 tratados a 1 µM.	106
Figura 53 - Representação esquemática da reação do composto ABDA (ácido 9,10-antracenediacarboxílico) com oxigênio singlete (¹ O ₂). À esquerda, a estrutura do ABDA em seu estado inicial; à direita, o produto de oxidação resultante da adição de oxigênio singlete formando um endoperóxido. .	107
Figura 54 - Espectros de emissão de fluorescência evidenciando o decaimento do sinal do composto ABDA após a fotossensibilização com 3-CF ₃ Pz (648 nm), carregada em DMPC, indicativo da geração de oxigênio singlete (¹ O ₂)...	108
Figura 55 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singlete (¹ O ₂) monitorados em 1270 nm, após excitação por pulso de laser (650 nm) em presença dos compostos Mb, 3-CF ₃ Pz e 4-FPz, sendo as Pz's carregadas em lipossoma de DMPC.....	109
Figura 56 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singlete (¹ O ₂) monitorados em 1270 nm, após excitação pelo módulo de LED (633 nm) em presença dos compostos Mb, 3-CF ₃ Pz e 4-FPz, sendo as Pz's carregadas em lipossoma de DMPC.	109
Figura 57 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singlete (¹ O ₂) monitorados em 1270 nm, após excitação pelo módulo de LED (633 nm) em presença dos compostos MB e DMMB realizado em água somente para o MB e etanol para ambos.	110
Figura 58 - Espectros ampliados do decaimento temporal da fosforescência emitida pelo oxigênio singlete em 1270 nm, após fotossensibilização por LED dos FS.....	111
Figura 59 - Reações da sonda Hidroxi-TEMP, PBN e DMPO reagindo com um EROs produzido pela fotossensibilização dos FS.....	112

Figura 60 - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula de lecitina de soja com a fotossensibilização da 3-CF₃Pz.. 113

Figura 61 - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula de lecitina de soja com a fotossensibilização da 4-FPz..... 114

Figura 62 - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 3-CF₃Pz. Evidenciando sua proximidade com as duplas.
..... 115

Figura 63 - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 4-FPz. Evidenciando sua proximidade com os grupos fosfatos..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
3-CF ₃ Pz	3-trifluorometilfenil porfirazina
^3FS	Estado tripleto excitado do fotossensibilizador
4-FPz	4-fluorofenil porfirazina
CF	5(6)-carboxifluoresceína
ABDA	Ácido 9,10-antracenediil-bismetilenodimalônico
ATB	Automated Topology Builder and Repository
a_N	Acoplamento hiperfino
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CDCl ₃	Clorofórmio-d
CIS	Cruzamento intersistema
DMMB	Dimetil azul de metileno
DMMP	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPC	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina- <i>N</i> -óxido
DOPC	Di-oleil-fosfatidilcolina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(10- <i>rac</i> -glicerol)
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DLPC	1,2-di-(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> -octadecadienoil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	Espectrometria de massas por ionização por eletrospray
EtOH	Álcool etílico
FDA	Food and Drug Administration
Fcs	Ftalocianinas
FS	Fotossensibilizador
CG-MS	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
Hidroxi-TEMP	4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
HO \cdot	Radicais alcoxilas
L	Lipídio
LAREMAR	Laboratório de Ressonância Magnética multiusuário
LOOH	Lipídeos hidroperóxidos
LOO \cdot	Radical hidroperóxido
LPFI	Laboratório de Processos Fotoinduzidos
LUVs	Large unilamellar vesicles
MB	Azul de metileno
MeOH	Álcool metílico
MLVs	Multilamelares
mTHPC	Temoporfirina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NPT	Equilibração para sistema fechado com temperatura constante e pressão constantes
NVT	Equilibração para sistema fechado com temperatura constante
$O_2^{\cdot-}$	Radicais superóxido
O-MtAm	Cloridrato de <i>O</i> -metil-hidroxilamina
PBN	<i>N</i> -ter-Butil- α -fenilnitrona
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCs	Fosfatidilcolinas
PEs	Fosfatidiletanolaminas
PFA	Paraformaldeído
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
PSs	Fosfatidilserina
PZs	Porfirazinas
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S_0	Estado fundamental
S_1	Estado singlete excitado de mais baixa energia
SFB	Soro fetal bovino
S_n	Estado singlete excitado de mais alta energia
SOY	Fosfatidilcolina de soja
SOYPC	Lecitina de soja
SUVs	Small unilamellar vesicles
TEMPOL	2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol 1-oxil
TEMPONE	2,2,6,6-Tetrametil-4-oxo-piperidin-1-oxil
TFD	Terapia fotodinâmica
THF	Tetrahidrofurano
T_1	Estado tripleto de menor energia
TMCS	Cloreto de trimetilsilil
ULVs	Unilamelares
$\phi\Delta$	Rendimento quântico de oxigênio singlete

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1	TERAPIA FOTODINÂMICA	23
1.2	MECANISMOS DE AÇÃO DOS FS	24
1.3	SISTEMAS DE IRRADIAÇÃO E ABSORÇÃO DE LUZ NA PELE	26
1.5	FOTOSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS	29
2.	OBJETIVO GERAL	33
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3.	MATERIAIS	34
4.	METODOLOGIA.....	35
4.1	PREPARO DO FILME LIPÍDICO	35
4.2	PREPARO DA SUSPENSÃO LIPÍDICA.....	35
4.3	CULTURA CELULAR.....	35
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	36
4.5	ENSAIOS DE DANO SUBCELULAR.....	37
4.6	ENSAIO DE VAZAMENTO DE MEMBRANA.....	38
4.7	EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO INDIRETO.....	39
4.8	EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO DIRETO	39
4.9	CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO'S) ANALISADAS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	40
4.10	CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	40
4.11	CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN - ¹ H)	41
4.12	ENSAIOS DE DERIVATIZAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	42
4.13	SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	VIABILIDADE CELULAR	45

5.2	DANO SUBCELULAR.....	47
5.3	ENSAIOS DE PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANA	52
5.4	ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO INDIRETO	54
5.5	ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO DIRETO.....	55
5.6	ENSAIOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - EPR	59
5.7	ENSAIOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS – ESI-MS.....	71
5.8	ENSAIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN.....	74
5.9	ENSAIOS DE DERIVATIZAÇÃO ANALISADOS NO CG-MS.....	75
5.10	DINÂMICA MOLECULAR	78
6.	CONCLUSÕES	88
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICE.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

A busca pelo desenvolvimento de novos compostos e metodologias que possam auxiliar no tratamento dos diversos tipos de câncer ocorre há mais de meio século. Desde que Rosenberg, em 1965, observou a inibição da divisão celular em *Escherichia Coli* pela cisplatina,¹ inúmeras descobertas foram feitas, e com isso, novas abordagens foram sendo desenvolvidas. Dentre estas abordagens, pode-se citar a Terapia Fotodinâmica (TFD), que ganha destaque por ser menos invasiva e mais seletiva aos tumores, quando comparada à quimioterapia e radioterapia, podendo substituir ou complementar essas técnicas de tratamento padrão. Desde o primeiro relato feito por Thomas J. Dougherty em 1974,² a TFD evoluiu consideravelmente para se tornar um protocolo médico consolidado por diversas agências de regulamentação. Atualmente, esse procedimento é prescrito não apenas para tratamento de tumores, mas também de inúmeras outras enfermidades, tais como pé diabético, acne inflamatória, degeneração macular, entre outros.³⁻⁷ A TFD tem também sido amplamente investigada para inativação de microrganismos como bactérias, protozoários e fungos que apresentam multirresistência aos medicamentos convencionais.⁸⁻¹⁰

A TFD utiliza-se de um fotossensibilizador (FS), que quando na presença de oxigênio e de luz, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), que são responsáveis por oxidar biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e consequentemente induzir a morte celular.¹¹ A Figura 1 ilustra o protocolo de um tratamento, no qual o paciente é administrado com uma formulação contendo o FS e, após aguardado um intervalo de tempo para acúmulo deste fármaco, a lesão é irradiada com luz (geralmente visível), resultando na destruição das células tumorais e cura do paciente.

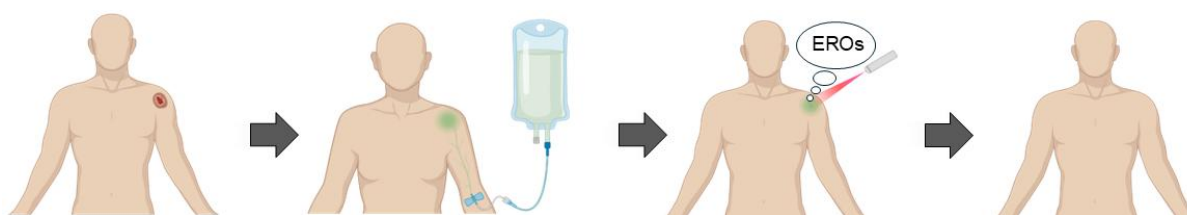


Figura 1 - Representação esquemática do tratamento de uma lesão cutânea com TFD em um paciente.

1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS FS

Há um consenso na literatura de que, nesse tipo de intervenção, o FS pode operar por meio de dois mecanismos distintos, sendo eles nomeados de tipo I e tipo II. Em ambos os mecanismos, um elétron do FS no estado fundamental (S_0) é excitado para o estado singleto de mais alta energia (S_n), por meio de uma fonte luminosa. A partir daí, este elétron sofre processos de conversão interna, passando para estados eletrônicos excitados de mais baixa energia, seguido de decaimento não radiativo até assumir o estado singleto excitado de mais baixa energia (S_1). Em seguida, esse elétron pode sofrer basicamente três processos: (i) decair para o estado fundamental de forma não radiativa, (ii) decair emitindo energia em forma de luz, fenômeno conhecido como fluorescência, ou (iii) sofrer um cruzamento intersistema (CIS) passando a ocupar um estado excitado tripleto. Uma vez que ocorra o CIS, este elétron pode sofrer novamente conversão interna e decaimento não radiativo, passando a ocupar o estado tripleto de menor energia (T_1). Em seguida, ele pode seguir novamente com o decaimento para o S_0 de forma não radiativa ou emitindo energia (fosforescência), ou participar de um dos dois tipos de mecanismos (tipo I ou tipo II) mencionados anteriormente. Um esquema contendo estes processos descritos acima está representado na Figura 2, por meio de um diagrama de Jablonsky simplificado.

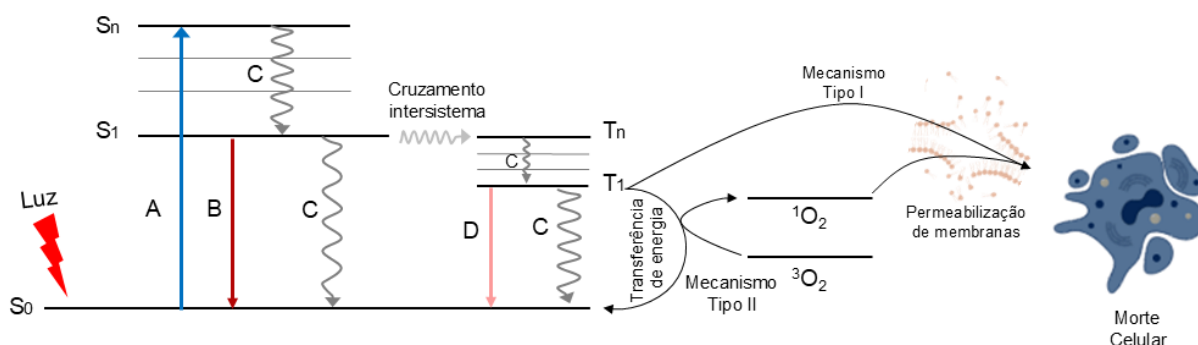


Figura 2 - Diagrama de Jablonski aplicado à terapia fotodinâmica, ilustrando: (A) excitação eletrônica, (C) decaimento não-radiativo, (B) fluorescência, (D) fosforescência e formação de ROS (Tipo I e II).

No mecanismo do tipo I, o FS no estado excitado (3FS) pode interagir com o oxigênio molecular ou diretamente com alvos biológicos por meio da transferência de elétrons ou de hidrogênio favorecendo a formação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e alcóxilas (HO^{\cdot}). No caso de lipídeos, a interação com um FS no estado tripleto pode

resultar em um radical lipídico L^\bullet , que ao reagir com oxigênio molecular resulta na formação de um radical hidroperóxido (LOO^\bullet). Este por sua vez, pode levar à formação de outros produtos de oxidação em reações de propagação, tal qual representados na Figura 3. Dentre estes produtos, pode-se citar epóxidos, álcoois, cetonas e aldeídos lipídicos. É válido ressaltar que a formação de aldeídos pelo processo denominado cisão beta resulta na quebra da cadeia alquílica, formando lipídeos truncados, ou seja, de cadeia curta.

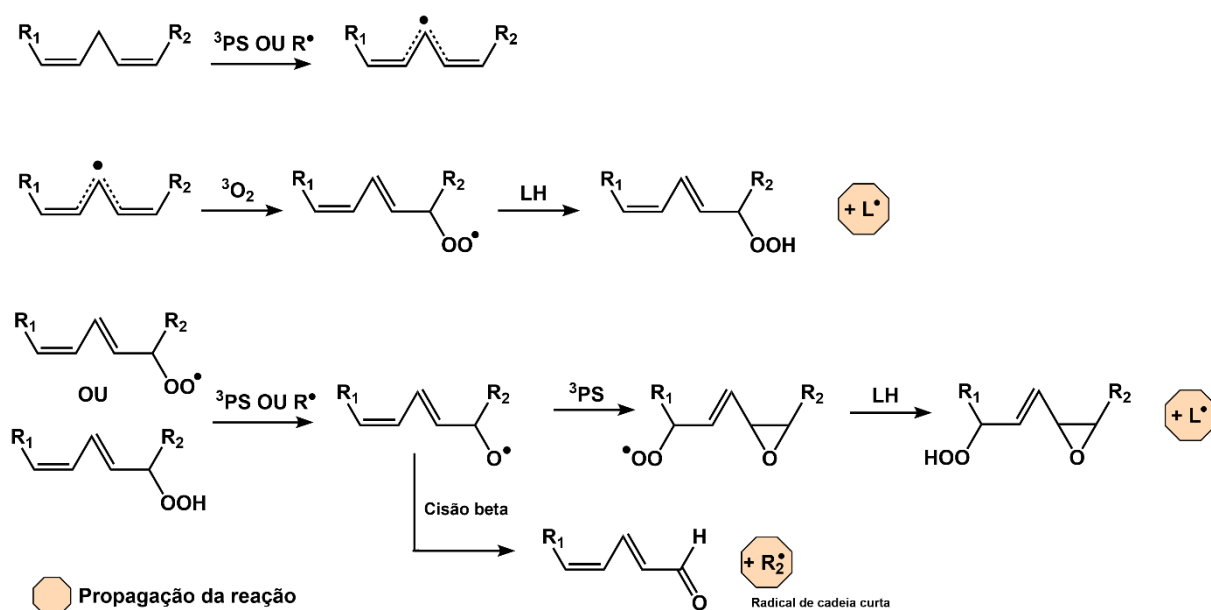


Figura 3 - Principais reações e produtos gerados pelo mecanismo tipo I na terapia fotodinâmica utilizando fotossensibilizadores. Fonte: Adaptado de [12].

Por outro lado, no mecanismo do tipo II, o FS no estado tripleto interage especificamente com o oxigênio molecular do meio, mediante transferência de energia, convertendo-o de um estado tripleto (3O_2) para singleto (1O_2), como mostrado no diagrama apresentado pela Figura 2.^{12,13} Ao interagir com lipídeos insaturados, o oxigênio singleto reage com a dupla ligação da cadeia alquílica, produzindo apenas o hidroperóxido correspondente, por meio de reações do tipo “Alder-eno”, em que o hidrogênio alílico interage com uma espécie enófila com o intuito de formar uma nova ligação química com a migração da ligação dupla e deslocamento do hidrogênio.¹²

Em ambos os casos, as EROs formadas podem interagir não somente com lipídeos, mas com diferentes biomoléculas e oxidá-las, resultando em um dano irreversível para células e organelas, que perderão sua função.¹³

1.3 SISTEMAS DE IRRADIAÇÃO E ABSORÇÃO DE LUZ NA PELE

Dada a vasta diversidade de fotossensibilizadores disponíveis e suas respectivas aplicações, é possível observar que diferentes sistemas de irradiação foram desenvolvidos para atender a essas especificidades em clínica. A considerar a região a ser tratada e o espectro de absorção destes FSs, fontes de irradiação como lasers,¹⁴⁻¹⁶ LED's^{17,18}, sistemas acoplados a fibra óptica¹⁹ e até mesmo a luz do sol são ou já foram utilizados.²⁰ Por se tratar de uma fonte monocromática, os lasers tornam-se um opção para a realização de tratamentos mais localizado, de difícil acesso e um pouco mais profundos, enquanto o LED está voltado a casos mais superficiais, com uma área de exposição maior e que necessite baixas doses de luz. Devido a estes aspectos e à alta disponibilidade comercial, essas duas fontes de luz se tornaram as mais utilizadas na TFD.

Um outro fator a ser considerado é que o corpo humano é composto por uma série de microestruturas complexas que se interligam, de forma a constituir ossos, órgãos e tecidos.²¹ Os tecidos que constituem a pele possuem componentes intra e extracelulares capazes de interagir e absorver luz em determinados comprimentos de onda, a depender de suas estruturas moleculares.²² Moléculas como a melanina absorvem luz em praticamente toda a faixa visível, mas apresentam mais alta absorção na região do ultravioleta e azul. Processos de reflexão e difração da luz também ocorrem na pele, de forma que o grau de penetração da luz nos tecidos é altamente dependente do comprimento de onda. A faixa específica do espectro eletromagnético que vai de 600 nm a 800 nm, chamada de janela terapêutica²³⁻²⁵ é a que apresenta maior penetração nos tecidos (até 1 cm) (Figura 4),²⁶ dessa forma, fotossensibilizadores ideais apresentam alta absorção de luz nessa região do espectro.

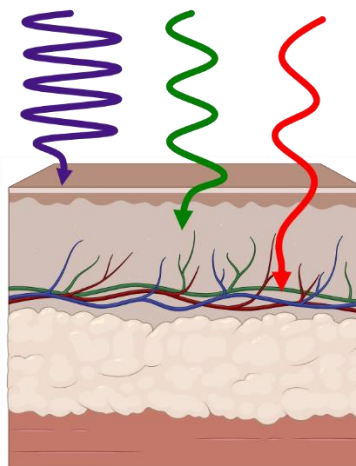


Figura 4 - Ilustração representativa da capacidade de penetração da luz na pele, que varia conforme o comprimento de onda.

1.4. Interação entre um FS e membrana lipídica

Em geral, a eficácia dos fotossensibilizadores nas células alvo dependem não apenas da capacidade de absorção de luz e de produção de EROs, mas também de sua interação com as estruturas lipídicas da membrana celular e de organelas. Ao longo do tempo a composição e estrutura da membrana celular foi alvo de grandes discussões com modelos que a definiram como uma parede celular (1682), evoluindo aos poucos para uma representação em que levava em consideração a existência de uma bicamada lipídica (1925).²⁷ Anos depois, adotou-se o modelo do mosaico fluido que descreve a membrana celular como uma estrutura composta majoritariamente por fosfolipídios, como fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidiletanolaminas (PEs) e fosfatidilserina (PSs),²⁸ junto a glicolipídios, colesterol e proteínas²⁸ dispostos em uma bicamada. A Figura 5 apresenta a estrutura química de PCs e PEs, lipídeos abundantes nas membranas.

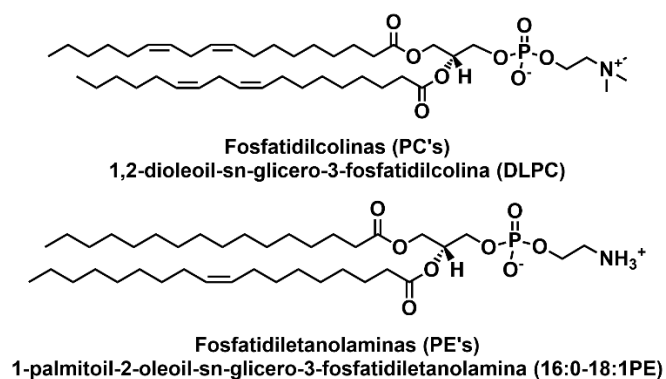


Figura 5 - Estruturas químicas de lipídios de membrana: fosfatidilcolina (PCs) e fosfatidiletanolamina (PEs).

A membrana citoplasmática é a primeira barreira a ser transposta por qualquer fármaco para a entrada na célula. Dessa maneira, os FSs de maneira geral, especialmente os mais lipofílicos, tenderão a interagir fortemente com a bicamada lipídica. As insaturações lipídicas tornam-se alvos fáceis para EROs produzidas por esses FSs, uma vez que os hidrogênios alílicos e bisalílicos se tornam mais reativos e suscetíveis a ataques oxidativos. Uma vez oxidados, estes lipídios podem vir a reagir novamente com o FS no estado excitado, ou um outro radical, resultando em um radical alcóxila que, através de um processo chamado cisão beta (beta scission), gera um aldeído lipídico junto a radicais de cadeia curta (Figura 3).²⁹ Essa conversão pode gerar danos estruturais nas membranas celulares, resultando em processo de morte celular, como necrose ou apoptose, por exemplo.³⁰

A alta interação de alguns FS com membranas lipídicas tem sido explorada para o carregamento dessas substâncias até as células tumorais, por meio de nanoestruturas denominadas lipossomos. Estes nanocarreadores correspondem a vesículas que podem ser constituídas por lipídios, esteróis, surfactantes e polissacarídeos. De acordo com a metodologia de preparo, os lipossomos apresentam variação no número de camadas, sendo unilamelares (do inglês *unilamellar vesicles*, ULV's) ou multilamelares (do inglês *multilamellar vesicles*, MLV's), assim como podem variar em tamanho. Vesículas de 20 a 100 nm são consideradas como vesículas pequenas (do inglês *small unilamellar vesicles*, SUV's) e de 100 a 1 µm, vesículas grandes (do inglês *large unilamellar vesicles*, LUV's). Diferentes lipídeos puros e suas misturas podem compor os lipossomos. Lipídeos como POPC, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(10-rac-glicerol) (DOPG), 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) e colesterol (Figura 6) são amplamente utilizados em formulações para carregamento de fármacos. Estas composições levam em consideração a carga, difusibilidade e estabilidade da membrana.

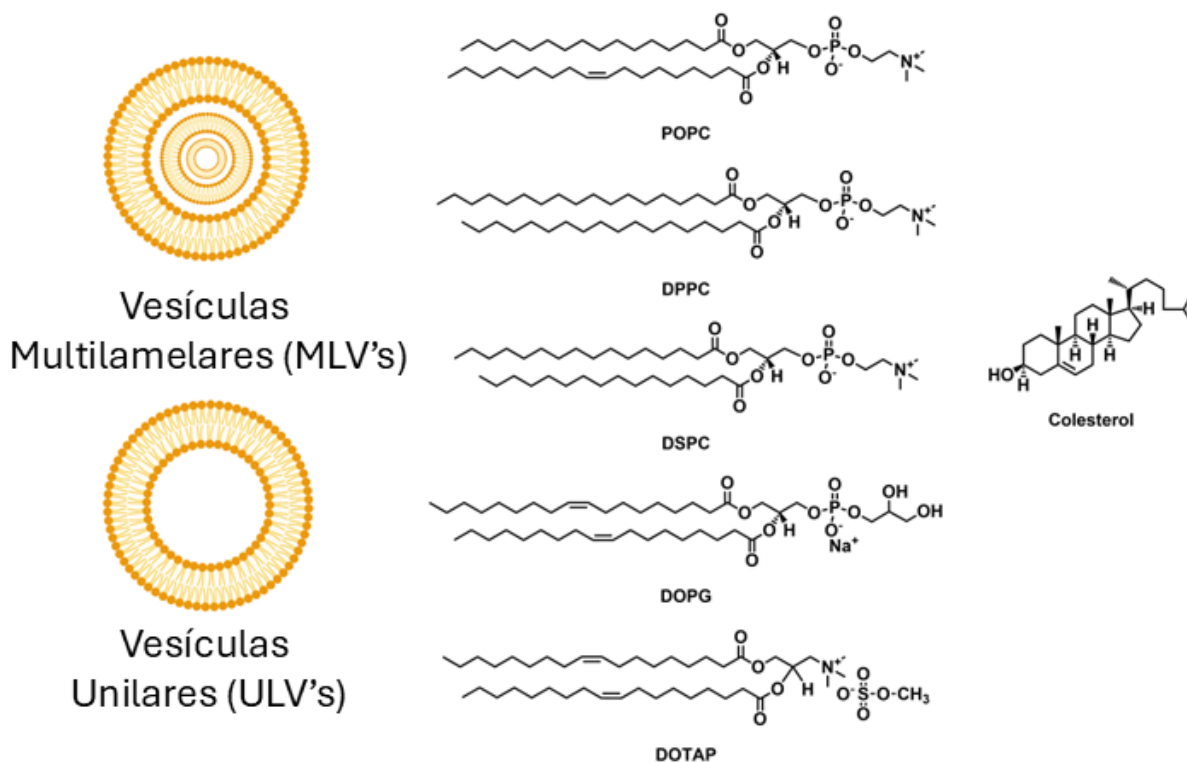


Figura 6 - Representação de vesículas lipossomais multilamelares (MLVs) e unilamelares (ULVs) e estruturas químicas de lipídios usados em sua formulação, como POPC, DPPC, DSPC, DOPG, DOTAP e colesterol, que modulam propriedades como carga, fluidez e estabilidade da membrana.

Por serem em sua grande maioria estruturas endógenas, os lipossomos possuem uma alta biocompatibilidade e sua alta variabilidade pode conferir a suas formulações características e funcionalidades únicas.³¹ Quimioterápicos como DaunoXome®, Myocet® e Onivyde™, aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), são encapsulados em lipossomos cuja composição é variável; entretanto, todos possuem uma fração de colesterol. No mesmo contexto, destaca-se também o Visudyne®, um fotossensibilizador encapsulado em lipossomo, que foi aprovado pelo mesmo órgão regulador nos anos 2000 para o tratamento da degeneração macular.³² Além disso, estudos demonstraram que fotossensibilizadores como curcumina, hipericina e temoporfirina (mTHPC), quando aplicados à linhagem celular SK-OV-3 (célula epitelial de ovário), foram carregados por lipossomos contendo DSPC ou DPPC em sua formulação³³.

1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES PORFIRÍNICOS

Macroscopos constituídos por quatro grupos pirróis são amplamente reconhecidos por formarem a classe dos compostos porfirínicos, sendo sua forma

mais conhecida o grupo “Heme” presente na hemoglobina, que é uma das principais proteínas presente nas hemácias que constituem o sangue. As porfirinas, clorinas, porfirazinas e ftalocianinas (Fcs) pertencem a esta classe e apresentam inúmeras aplicações decorrentes de sua capacidade de modulação eletrônica e de suas propriedades ópticas, por meio da modificação estrutural do anel com diferentes substituintes ou coordenação com diversos íons metálicos.³⁴

Evidências disponíveis na literatura demonstram que, atualmente, alguns dos fármacos amplamente utilizados como FSs na TFD pertencem a essa classe de compostos, como é o caso do Photofrin[®] (porfirina), AlaCare[®] (porfirina), Foscan[®] (clorina), Cytalux[®] (ftalocianina) e Laserphyrin[®] (clorina), além dos que estão em fases de testes clínicos e pré-clínicos.^{35,36} Macrosciclos porfirínicos são vantajosos devido a sua diversidade com relação aos seus substituintes, visto que, as substituições podem ocorrer no carbono *meso* do macrociclo, destacado na Figura 7 com círculos azuis para porfirinas e clorinas, além dos carbonos β -pirrólicos, destacados com círculos verdes para as porfirinas, clorinas e porfirazinas. Para as ftalocianinas os círculos verdes destacam os carbonos α e β fenólicos.

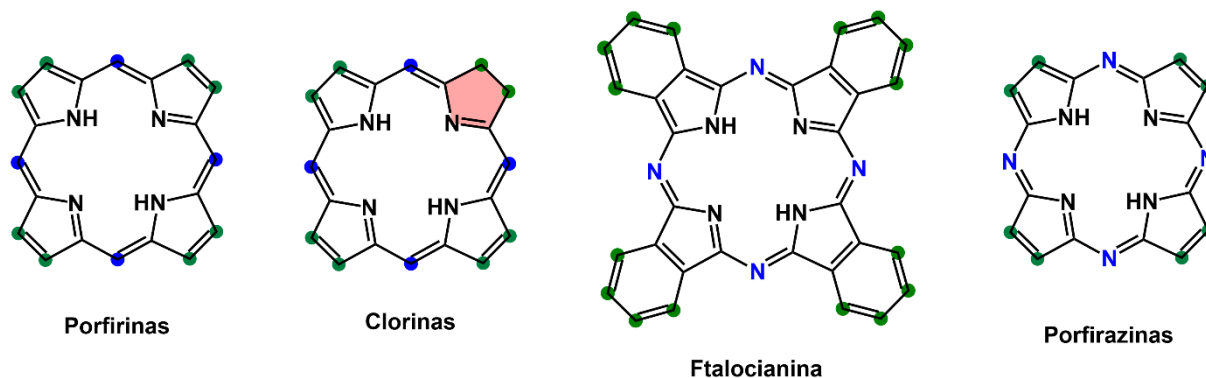


Figura 7 - Estruturas químicas representativas de três estruturas análogas as porfirinas, com destaques para os carbonos passíveis de substituição, sendo os círculos destacados em azul representando os carbonos *meso* e os círculos verdes os carbonos β -pirrólicos e α e β fenólicos.

Essa gama de possibilidades torna essa classe de compostos bastante versáteis, seja com substituições que favoreçam a modulação de suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas ou substituições que priorizem a sua interação com membranas ou alvos de interesse biológico.

As Pzs e Pcs apresentam uma alteração estrutural em relação às porfirinas, na qual cada carbono vinílico do macrociclo é substituído por um átomo de nitrogênio. Apesar de provocar a inativação das posições *meso* à substituição, isso resulta num

aumento significativo da absorção de luz na região do vermelho e aumento na localização da densidade eletrônica no centro do macrociclo e na polarização das ligações N-H dos nitrogênios do pirrol, facilitando sua coordenação com íons metálicos.^{37,38} (Figura 7). Além disso, observa-se para as Pzs uma maior reatividade nas posições β -pirrónicas, comparado às porfirinas, possibilitando reações de substituição,³⁸ em que os substituintes utilizados podem atuar como doadores ou retiradores de densidade eletrônica, moldando assim suas propriedades eletrônicas.³⁹

As Pzs podem ser empregadas em diversas áreas, dentre elas destacam-se a sua utilização como sensores ópticos não lineares, sensores químicos e cristais líquidos. Apesar das interessantes propriedades fotofísicas destes compostos, ainda são poucos os grupos de pesquisa que buscam estudar a atuação das Pzs em campos voltados à área da saúde, explorando sua emissão de fluorescência e produção de espécies reativas de oxigênio para aplicação em bioimagem, inativação microbiana e TFD.^{34,40}

Apesar de baixa solubilidade em água, porfirazinas simétricas são estudadas em meio biológico ao serem carregada em lipossomas.^{41,42} De acordo com a literatura, porfirazinas metaladas com magnésio e substituídas com os grupos morfolinoetil carregados em uma formulação de POPC:POPG aplicadas as linhagens celulares SCC-25 e CAL-27 (carcinomas de células escamosas de língua) apresentaram atividade fototóxica, porém com IC₅₀ em concentrações superiores a 2 μ M.⁴³ Em contrapartida, outro estudo demonstra que a sulfanil tribenzoporfirazina, também metalada com magnésio, em uma formulação de DOTAP:POPC, apresentou fototoxicidade bastante superior. Para as linhagens HSC-3, carcinoma de célula escamosa da boca, HeLa, linhagem celular humana imortalizada, e CAL-27, valores de IC₅₀ de 0,013, 0,042 e 0,007 μ M, foram encontrados, respectivamente,^{44,45} revelando alta eficiência fotodinâmica para esse composto.

Em um estudo prévio realizado pelo grupo, foram sintetizadas e caracterizadas algumas Pzs em que variou-se as propriedades indutivas dos substituintes β -pirrónicos a fim de modular as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do macrociclo.³⁹ Nesse estudo, viu-se que duas delas (Figura 8) apresentaram uma capacidade de permeabilização de membranas miméticas bem distintas, onde a porfirazina substituída com grupos 3-trifluorometilfenil apresentou uma eficiência muito maior do que a 4-fluorofenil. Não se investigou até o momento, porém, se existe distinção nos

mecanismos de ação destes compostos, nem se há uma diferença significativa de eficiência fotodinâmica em células tumorais para ambas essas Pzs.

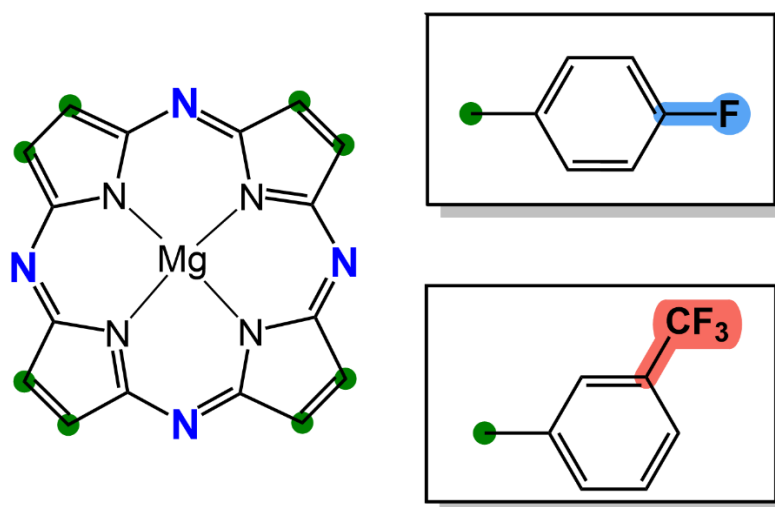


Figura 8 - Representação estrutura das metaloporfirinas de magnésio substituídas no carbono β -pirrólico (círculos verdes) pelos grupos 3-trifluorometilfenil (3-CF₃MgPz, destacada em vermelho) e 4-fluorofenil (4-FMgPz, destacada em azul).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade fotodinâmica de duas porfirazinas, substituídas pelo grupo 3-trifluorometilfenil e 4-fluorofenil, e caracterizar produtos de fotooxidação lipídica provenientes da fotossensibilização de membranas miméticas com o intuito de identificar seus mecanismos de ação na terapia fotodinâmica.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficiência fotodinâmica das porfirazinas nas linhagens celulares A431 e HaCaT *in vitro*;
- Comparar a capacidade de produção de oxigênio singlete e de outras espécies reativas de oxigênio das porfirazinas em solução isotrópica e em suspensões lipossomais;
- Caracterizar e quantificar diferentes tipos de produtos de fotooxidação lipídicas formados após a fotossensibilização dos compostos em membranas miméticas;
- Identificar a interação e localização das porfirazinas em bicamadas lipídicas por cálculos de dinâmica molecular.

3. MATERIAIS

As substâncias usadas, sem tratamento prévio, para as reações de obtenção dos compostos porfirínicos, estudos fotofísicos e estudos biológicos são: ácido 9,10-antracenediil-bismetilenodimalônico (ABDA, $\geq 90\%$, Sigma), álcool etílico (EtOH, P.A., Synth, Neon, Moderna), alumina básica (0.05-0.15 mm, Fluka), azul de metileno (P.A., Grupo Química), clorofórmio-d (CDCl_3 , 99,9%, Cambridge, I.L.), sulfato de sódio anidro (P.A., Synth), sulfito de sódio (P.A., Neon), álcool metílico (MeOH, P.A., Synth, Moderna), Dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99\%$, Neon), Cloridrato de O-metil-hidroxilamina (O-MtAm, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), Cloreto de trimetilsilil (TMCS, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), paraformaldeído (PFA, 95%, Sigma-Aldrich), Heptano (HPLC, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), Lecitina de soja (SOYPC, $>95\%$, Avanti), POPC ($>99\%$, Avanti), DOPC($>99\%$, Avanti), DMPC($>99\%$, Avanti). Tetrahidrofurano (THF, $\geq 99,5\%$, Synth, Merck) foi passado por alumina básica, destilado e armazenado em recipientes com peneiras moleculares antes do uso. As peneiras moleculares (4 Å, Strem Chemicals) foram ativadas com o auxílio de um maçarico em um sistema com vácuo constante. Os meios de cultura RPMI 1640 com indicador e sem indicador foram preparados pela Prof^a. Dr^a. Heveline Silva.

4. METODOLOGIA

4.1 PREPARO DO FILME LIPÍDICO

O preparo das vesículas lipídicas contendo as porfirazinas foi realizado através do método de hidratação de filme lipídico⁴⁶, no qual uma solução do lipídio em THF foi transferida para um balão de fundo redondo envolto por papel alumínio, em que se adicionou a solução do fotossensibilizador com concentração correspondente a 0,5 mol% em relação aos lipídios. A mistura foi rapidamente homogeneizada e o solvente foi evaporado em um Rotavapor R-124 com banho aquecido B-481 (Büchi Labortechnik AG™) sob rotação constante. O banho do equipamento foi aquecido em uma faixa de 45°C a 50°C e a pressão interna do sistema regulada para a faixa de 3,8 mPa a 4,0 mPa. Uma vez seco, diminui-se a rotação do equipamento e regulou-se a pressão para 8,0 mPa, deixando o sistema em aquecimento por mais uma hora para eliminação total do solvente. O balão foi armazenado em um dessecador sob vácuo e guardado no escuro por 12 horas.

4.2 PREPARO DA SUSPENSÃO LIPÍDICA

Após o preparo do filme lipídico contendo o fotossensibilizador, adicionou-se 1,0 mL de água Milli-Q ao balão, que foi conectado novamente ao evaporador rotativo e submetido a uma faixa de temperatura de 45°C a 50°C. Agitando vigorosamente a pressão atmosférica por 10 minutos. O conteúdo do balão foi em seguida passado 13 vezes por uma membrana de policarbonato de 0,1 µm (Avanti™) acoplada a uma mini-extrusora de lipossomos (Avanti™, catálogo #610000-1EA) aquecida a 45°C. A suspensão de lipossomos extrusada foi armazenada em um eppendorf envolto por papel alumínio até o uso. A concentração de FS encapsulado foi calculada por espectrometria de absorção UV-VIS, adicionando-se um volume da suspensão lipídica em 2 mL de THF e utilizando o coeficiente de absorvidade molar da porfirazina correspondente para cálculo da concentração.

4.3 CULTURA CELULAR

O estudo da eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores foi realizado em duas linhagens celulares: HaCaT, queratinócitos humanos de tipologia normal, e A431,

carcinoma não melanoma, utilizando a infraestrutura do laboratório SibLab coordenado pela Profa. Heveline Silva. As células HaCaT foram cultivadas em meio DMEM com pH = 7,2, suplementado com 1% de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB), HEPES em uma concentração de 4,0 mM, bicarbonato de sódio a 14,0 mM, ampicilina a 0,27 mM e estreptomicina a 0,06 mM. Já as células A431 foram propagadas em meio RPMI 1640, suplementado pelos reagentes descritos acima com exceção do piruvato de sódio. As linhagens foram mantidas em incubadora a uma temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e a uma concentração de 5% de CO₂ até atingir 70% de confluência.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O estudo de viabilidade celular foi executado simultaneamente para as duas linhagens celulares, HaCaT e A431, ambas ressuspensas utilizando-se uma solução de tripsina/EDTA, e em seguida distribuídas em placas de 96 poços, a uma concentração de 5×10^3 células viáveis por poço. As placas foram incubadas nas mesmas condições utilizadas para a propagação celular por 24 horas. Em seguida, o meio foi removido e substituído por 100 µL de uma solução contendo meio de cultura junto a suspensão lipossomal do FS preparada com lecitina de soja nas concentrações de 10,0 µM, 5,0 µM, 1,0 µM, 0,5 µM, 0,1 µM, 0,05 µM e 0,01 µM. O volume final foi ajustado com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) e as placas permaneceram na incubadora por mais 4 horas cobertas com papel alumínio.

Após este intervalo, as placas tiveram o meio de cultura substituído por 100 µL de meio sem vermelho de fenol e, em seguida, foram irradiadas durante 10 minutos com um arranjo de LEDs vermelhos (620 nm a 630 nm), correspondendo a uma dose de luz igual a 2,2 J cm⁻². Após a irradiação, substituiu-se o meio utilizado na irradiação pelos respectivos meios de cultura suplementados, incubando na estufa novamente por 48 horas. Para a quantificação da viabilidade celular, preparou-se uma solução aquosa de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 2,5 mg mL⁻¹, adicionando-se 20 µL por poço e incubando por mais 4 horas. O meio de cultura foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A medida de absorbância de cada poço em 570 nm foi realizada em um leitor de placas.⁴⁷

4.5 ENSAIOS DE DANO SUBCELULAR

O estudo de dano subcelular foi realizado no Instituto de Química da USP São Paulo no Laboratório de Processos Fotoinduzidos (LPFI) coordenado pelo Prof. Maurício Baptista. As células de cada uma das linhagens celulares HaCaT e A431 foram distribuídas e incubadas em placas de 24 poços, a uma concentração de 8×10^4 células viáveis por poço, utilizando-se da mesma metodologia descrita anteriormente. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído por uma suspensão lipossomal dos FS preparada com lecitina de soja, diluída em meio de cultura suplementado com 10% de SFB até atingir a concentração de $1 \mu\text{M}$ para ambas as porfirazinas. Na sequência, as placas foram levadas para a incubadora por mais 4 horas. Após isso, o meio foi aspirado e substituído por PBS para que, logo em seguida, as placas fossem fotossensibilizadas utilizando-se do irradiador LED BOX 650 nm (Biolambda), durante 10 minutos, correspondente a uma dose de luz de $2,2 \text{ J cm}^{-2}$. Feito isso, o PBS foi aspirado e substituído por meio de cultura suplementado para que a placa fosse incubada novamente por 30 minutos.

Posteriormente, o meio foi aspirado e substituído por soluções contendo meio de cultura e um dos marcadores LysoTracker Deep Red (LTDR) ou MitoTracker Green FM (MTG) a uma concentração de 100 nM e 200 nM respectivamente.⁴⁸ As células foram incubadas na estufa por mais 20 minutos e, em seguida, o meio contendo os marcadores foi aspirado e uma solução de PBS com o marcador de núcleo Hoechst 33258 (H258), a uma concentração de $4 \mu\text{M}$, foi inserida nos poços. Após 15 minutos de incubação na estufa, as placas tiveram suas soluções aspiradas e os poços lavados com PBS. Para a fixação celular, adicionou-se uma solução a 4% de paraformaldeído (PFA), incubando-se as células por mais 10 minutos, seguido de três lavagens sucessivas com PBS com intervalos de 5 minutos. As placas foram analisadas em um microscópio de fluorescência Leica DMI8, com a utilização dos filtros representados no catálogo do fabricante como, A-DAPI (Excitação: 340 nm – 380nm; Emissão: LP 425 nm) para o Hoechst, L5-FITC (Excitação: 460 nm – 500 nm; Emissão: BP 512 nm – 542 nm) para o MTG e o Y3-CY3 (Excitação: 510 nm – 560 nm; Emissão: BP 573 nm – 647 nm) para o LTDR.

4.6 ENSAIO DE VAZAMENTO DE MEMBRANA

Para a realização desse experimento, utilizou-se 0,5 mol% de FS carregados em 30 mg de POPC para o preparo do filme lipídico, hidratado com uma solução de 5(6)-carboxifluoresceína (CF) a 50 mM em tampão Trizma® a 10 mM e pH = 8,0. As vesículas formadas foram submetidas ao processo de extrusão por membrana, conforme descrito anteriormente, e a suspensão resultante foi purificada por cromatografia em coluna utilizando Sephadex G-50 como fase estacionária e uma solução tampão Trizma® acrescida de NaCl a 300 mM como eluente para remoção da CF não encapsulada. Antes de sua utilização, a coluna foi pré-saturada com uma solução contendo MLV de DOPC. Em seguida, 100 µL da suspensão lipossomal obtida foram diluídos em 400 µL de tampão em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm, exposta a luz monocromática vermelha (648 nm) de um laser por até 30 minutos. A emissão de fluorescência da CF foi acompanhada em intervalos de 3 minutos nos quais 10 µL da solução irradiada eram diluídos em 2 mL de tampão em uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico e com as 4 faces polidas. O espectro de emissão foi registrado em um fluorímetro Cary Varian Eclipse (Agilent Technologies) entre 480 nm e 650 nm previamente configurado para utilizar 470 nm como comprimento de excitação e 5 nm para a abertura das fendas de emissão e de excitação. Após a realização de cada leitura da solução fotossensibilizada, adicionou-se 10 µL de uma solução a 1% v/v de Triton X-100 e mediu-se novamente a emissão de fluorescência da solução. A permeabilização relativa dos compostos foi calculada pela Equação 1, apresentada abaixo.

$$\text{Liberação de CF (\%)} = \frac{A_{T_n}}{A_{T_n \text{ após triton}} \times A_{T_0}} \quad (1)$$

Onde “ A_{T_n} ” corresponde ao valor da integração da área do sinal obtido após um determinado tempo de irradiação. T_0 representa o tempo inicial.

4.7 EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO INDIRETO

A eficiência na produção de oxigênio singleto foi medida pelo método indireto de análise, utilizando a sonda hidrossolúvel ABDA, que reage especificamente com esta espécie⁴⁹⁻⁵¹. As porfirazinas foram inseridas em lipossomos de DMPC, preparados seguindo a metodologia descrita anteriormente. A solução para a medida foi preparada em uma cubeta de quartzo, com 10 mm de caminho óptico e duas faces polidas, sob agitação constante de tal forma a obter-se uma absorbância da sonda em 400 nm igual a 1,0 u.a. e dos compostos em 648 nm igual a 0,03 u.a..^{52,53} A cubeta foi irradiada com um laser (648 nm) por um intervalo de tempo definido e o decaimento da sonda foi acompanhado pelo espectômetro UV-VIS Hewlett Packard 8453 (Agilent Technologies).

4.8 EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO DIRETO

Assim como os experimentos de dano subcelular a eficiência de produção de oxigênio singleto pelo método direto também foi realizada no Instituto de Química da USP São Paulo no Laboratório de Processos Fotoinduzidos (LPFI) sob a supervisão do Prof. Maurício Baptista. A eficiência das porfirazinas na produção de oxigênio singleto foi medida por meio do decaimento de fosforescência desta espécie (1270 nm) após a fotossensibilização de ambos os compostos. A obtenção dos dados foi feita com a utilização do sistema de detecção de luminescência de oxigênio singleto TCMPC1270-LED. Os ensaios ocorreram tanto em THF, quanto em suspensões lipossomais de DMPC e Lecitina de soja (95%), irradiando-as com duas fontes luminosas distintas, sendo uma delas o laser pulsado de 5 ns a 10 ns, OPO-Rainbow, com emissão configurada para 650 nm, e a outra o módulo de LED (633 nm) proveniente do próprio equipamento. As concentrações das porfirazinas foram ajustadas com a utilização de um espectrômetro de absorção UV-VIS (Shimadzu 1800), normalizando todos os valores de absorbância dos compostos no comprimento de emissão da fonte de irradiação, sendo absorbância igual a 0,1 u.a. quando irradiadas com o laser e 0,3 u.a. quando utilizado o módulo de LED. Os resultados foram comparados com dois padrões distintos, sendo eles o azul de metileno (MB) e

o dimetil azul de metileno (DMMB), ambos solubilizados em etanol e submetidos às mesmas condições.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO'S) ANALISADAS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A detecção das espécies reativas de oxigênio foi conduzida no Departamento de Física da UFMG, no Laboratório de Ressonância Magnética sob coordenação do Prof. Klaus Krambrock. Os compostos tiveram sua produção de ERO's como oxigênio singleto, radicais hidroxila e superóxido, analisadas em solução por EPR em solução de THF e em formulações lipossomais de DMPC e DOPC. As soluções estoque dos compostos em solvente orgânico foram preparadas a uma concentração de 25 μM , enquanto as vesículas lipídicas apresentaram uma faixa de concentração de 60 μM a 100 μM , que foram diluídas até a concentração de 25 μM com a utilização de água Milli-Q. As sondas utilizadas na análise foram a 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (Hidroxi-TEMP), 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO) e a *N*-ter-Butil- α -fenilnitrona (PBN), todas preparadas a uma concentração de 0,1 M. A fotossensibilização ocorreu após adicionar 1 mL de cada uma das soluções (do FS e da sonda) a um béquer de 5 mL sob agitação, resultando em uma solução cuja concentração final foi de 12,5 μM e 0,05 M, respectivamente. Esta solução foi irradiada por uma lâmpada LED branca, acoplada a um filtro vermelho, com uma passagem de banda entre 570 nm a 820 nm, com máximo em 623 nm. As amostras foram coletadas em capilares de capacidade de 50 μL (Hirschmann, Alemanha) e seladas com massa especial (Critoseal, EUA). Os capilares então foram inseridos em tubos de quartzo próprios para EPR (Wilmad, EUA), de 250 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro externo e 3 mm de diâmetro interno. Os dados foram obtidos com uma faixa de campo de 332 mT a 340 mT quando utilizado a modulação do campo estático igual a 0,1 mT e 332,5 mT a 338,5 mT com a modulação do campo igual a 0,05 mT.

4.10 CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os ensaios de espectrometria de massas com ionização por eletrospray realizados para ambas as porfirazinas seguiu o protocolo de formação de vesículas lipídicas previamente descrito, porém a suspensão lipossomal não foi extrusada e a

hidratação do filme lipídico foi realizada logo após a evaporação completa do solvente orgânico, com a adição de 0,5 mL de água Milli-Q. A fotooxidação foi conduzida durante 30 minutos, sob agitação constante, em uma cubeta de quartzo, com duas faces polidas e caminho óptico igual a 10 mm. A fonte de irradiação utilizada foi o MTO-laser (648 nm) ajustado para obter uma convergência total de sua abertura focal. Ao longo do experimento foram retiradas alíquotas de 20 μ L da solução, com intervalos de 3 minutos cada, que foram solubilizadas em 1 mL de Metanol e injetadas diretamente no espectrômetro de massas LTQ XL™ Linear Ion Trap (Thermo scientific) comum analisador triplo quadrupolo. As configurações de análises do equipamento foram otimizadas para utilizar a fonte, o capilar e a lente de tubo com tensões iguais a 5 kV, 27 V e 105 V respectivamente. Junto a isso, a temperatura do capilar foi mantida a 270°C, enquanto o gás de arraste utilizou-se de 30 unidades arbitrárias.

4.11 CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN - ^1H)

A caracterização dos produtos de fotooxidação lipídica foram acompanhadas via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), realizados no Laboratório de Ressonância Magnética multiusuário (LAREMAR), utilizando-se do magneto Bruker Ascend Evo 400 MHz. Os produtos analisados foram gerados por duas metodologias distintas, sendo a primeira a fotossensibilização direta do filme lipídico constituído de 0,5 mol% de FS carregado em 5 mg de Lecitina de soja, enquanto a outra utilizou-se de uma suspensão lipossomal. No primeiro método, a solução foi gotejada lentamente em uma placa de vidro na presença de um fluxo leve e contínuo de argônio até que houvesse a formação de um filme em sua superfície. Posteriormente, o filme foi submetido a irradiação por até 10 minutos com o laser MTO (648 nm), ajustado para ter uma dispersão focal equivalente as dimensões do filme lipídico. Já no outro a suspensão coloidal foi submetida à fotossensibilização por até 2 horas com o foco pontual do laser. Após essa etapa, os produtos de fotooxidação foram extraídos da solução aquosa misturando a ela, partes iguais de metanol e clorofórmio⁵⁴. A fração orgânica foi evaporada utilizando-se o rotavapor. As amostras obtidas foram solubilizadas em 0,6 mL de clorofórmio deuterado.

4.12 ENSAIOS DE DERIVATIZAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE FOTOOXIDAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

A derivatização dos produtos de fotooxidação lipídica para caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ocorreu após extração dos produtos formados pelas vesículas lipídicas fotooxidadas. Para isso, utilizou-se 0,5 mol% de FS carregados em 5 mg de lecitina de soja e irradiados com laser vermelho (648 nm) por 30 minutos em uma cubeta de quartzo sob agitação constante. As amostras foram solubilizadas em 50 μ L de uma solução orgânica de piridina contendo Cloridrato de *O*-metil-hidroxilamina (*O*-MtAm) a 4,0 mM, que, em seguida, ficou armazenada à temperatura ambiente e sob o abrigo de luz por 16 horas. Posteriormente, adicionou-se 10 μ L de uma solução a 1% v/v de TMCS em BSTFA e, após sua homogeneização, os frascos foram levados ao aquecimento em banho maria por 1 hora a uma temperatura de 70°C, adicionando-se, por fim, 100 μ L de *n*-Heptano. O equipamento foi configurado para trabalhar na temperatura de 280°C no injetor, com um gradiente de temperatura ao longo da corrida, partindo de 60°C durante 5 minutos, seguido de um aumento de 10°C por minuto até 320°C, mantendo essa temperatura constante por mais 15 minutos. A temperatura da linha de transferência para o detector e da fonte foram de 280°C e 250°C, respectivamente. As análises foram realizadas em um equipamento de cromatografia a gás da Shimadzu, modelo GCMS-QP2010, com injetor tipo *split-splitless*, acoplado a um auto injetor AOC-20i. A coluna utilizada foi a Agilent DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,55 μ m) e o gás de arraste foi o hélio com vazão ajustada para 1 mL por minuto, com a faixa de detecção de massa ajustada para 50-900 m/z.

4.13 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

O estudo teórico foi realizado mediante a utilização de dois softwares distintos, ambos caracterizados como programa de código aberto (open source). O início do estudo se deu com a construção da bicamada lipídica, realizada com o programa PACKMOL.⁵⁵ Nessa etapa, construiu-se um arquivo de input contendo as descrições dimensionais de uma caixa em que X e Y são iguais e possuem 84 Å de comprimento ($X = Y = -12 \text{ \AA} \text{ a } 72 \text{ \AA}$) enquanto o eixo Z recebeu o valor de 103 Å (de -10 Å a 93 Å). Nesse arquivo, foram discriminadas a distribuição da fotossensibilizador, limitada a

uma caixa menor, junto as 144 moléculas de POPC, distribuídas tanto na fração inferior quanto na fração superior da caixa, orientadas paralelamente ao eixo Z. Por fim, adicionou-se, nas extremidades superior e inferior, uma camada espessa de moléculas de água, 50 para cada molécula de lipídio, conforme demonstrado na Figura 9. A quantidade de moléculas de água considerou não apenas a solvatação da bicamada, mas também funcionou como barreira, impedindo que os dois lados da bicamada interagissem verticalmente entre si devido às condições de contorno.⁵⁶

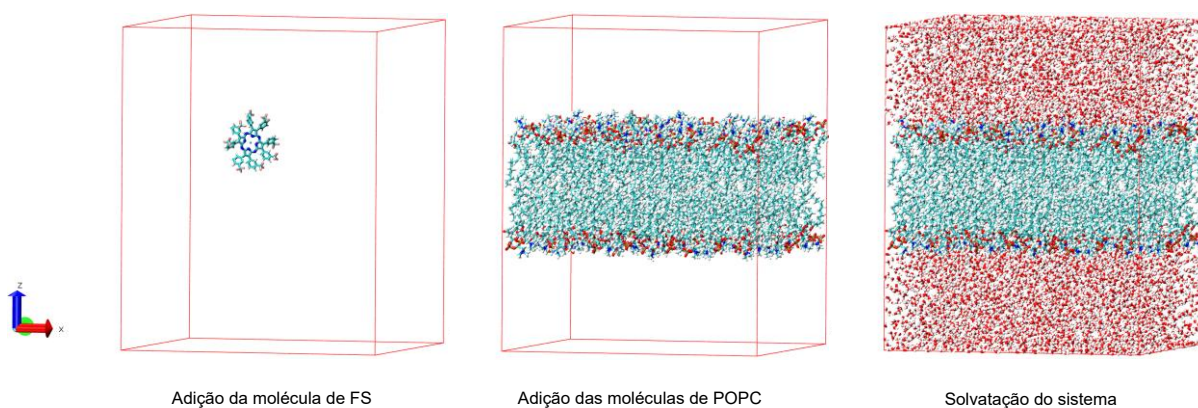


Figura 9 - Demonstração do processo de criação da caixa para a realização da simulação da dinâmica molecular

Todos os arquivos topológicos e estruturais utilizados nesta etapa e nas etapas seguintes foram obtidos após a submissão da estrutura molecular das espécies trabalhadas no Automated Topology Builder and Repository (ATB).⁵⁷ O output gerado no formato “pdb” serviu de input para a criação do arquivo de extensão “gro” utilizado pelo outro programa, o GROMACS v2024.3,⁵⁸ ele foi utilizado para todas as etapas de cálculo e simulações do estudo. Nele realizou-se uma minimização de energia e três equilibrações prévias, sendo duas delas voltadas para a equilibração de pressão (Número de partículas, Pressão, Temperatura (NPT)), com o acoplamento de pressão Parrinello Rahman,⁵⁹ semi-isotópico. As NPT's foram intercaladas por uma equilibração de volume (Número de partículas, Volume, Temperatura (NVT)) e todas as etapas dos cálculos foram realizadas com PME (do termo em inglês Particle-Mesh Ewald)⁶⁰ ativo com ordem igual a 4. A temperatura utilizada pelo sistema se manteve a 300K e o tempo de relaxação escolhido foi de 1,0 ps, junto a isso, aplicou-se também as condições de contorno periódicas aplicadas para XYZ. As simulações da bicamada lipídica foram realizadas em triplicata com o tipo de integração md-vv para o algoritmo leap-frog durante 500 ns com passos de 2 fs.⁶¹ As condições aplicadas pelas equilibrações foram mantidas durante o cálculo da dinâmica molecular, com exceção

do tempo de relaxação que foi modificado para 0,5 ps. Todos os cálculos foram paralelizados para rodar em GPUS alocadas no cluster COARACI, alocado no Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) - Centro de Computação John David Rogers (CCJDR) da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Munir Salomão Skaf.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VIABILIDADE CELULAR

Em estudos prévios realizados para uma série de porfirazinas de magnésio, em que se variou os grupos substituintes para obtenção de propriedades eletrônicas distintas, observou-se que tanto a 3-CF₃Pz quanto a 4-FPz apresentaram potenciais de permeabilização de membranas de lipossomos distintos³⁹. Sob essa ótica, decidiu-se investigar se ambas apresentariam o mesmo comportamento com relação as suas respectivas fototoxicidades, em ensaios celulares *in vitro*. Os ensaios foram conduzidos em células tumorais não-melanoma de pele (A431), e em células normais de pele (HaCaT), com o intuito de obter informações acerca de seus índices fototóxicos para ambas as linhagens, junto a seus respectivos índices de seletividade. O experimento foi conduzido para ambos os compostos carregados em lecitina de soja e irradiados em um sistema de LEDs vermelhos, e as curvas de viabilidade celular obtidas estão apresentadas na Figura 10.

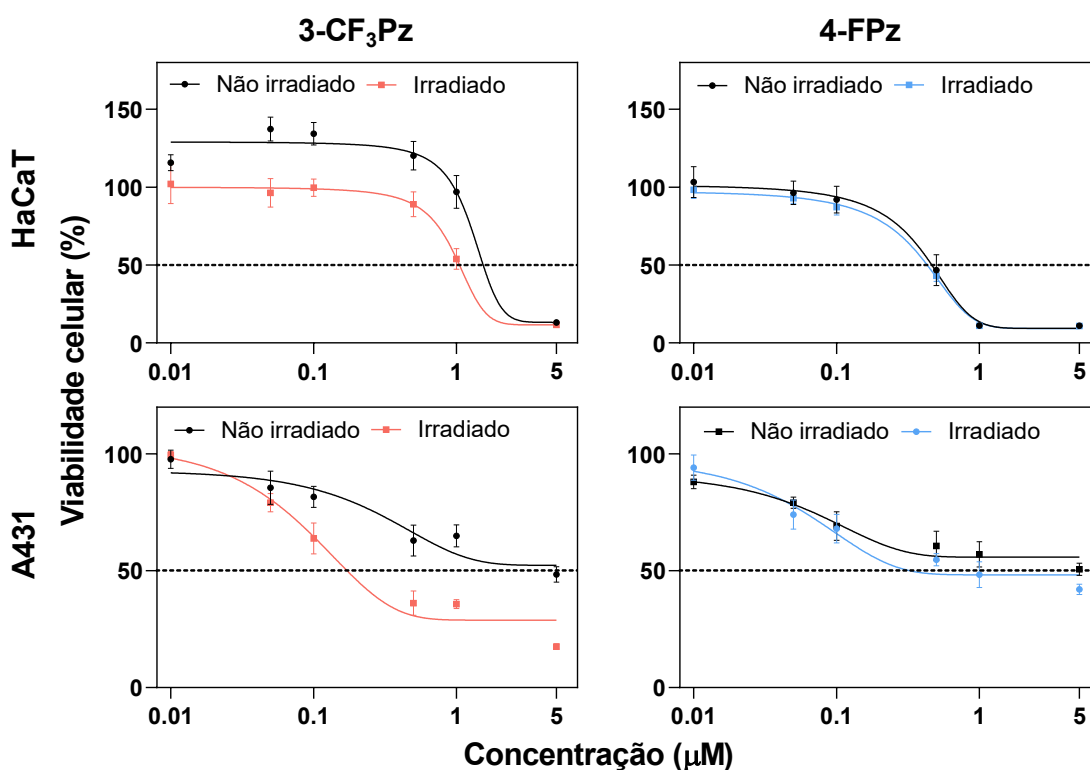


Figura 10 - Curvas de viabilidade celular em função da concentração do fotossensibilizador para formulações lipossomais de lecitina de soja contendo a 3-CF₃Pz e 4-FPz, em ensaios com e sem irradiação (LED, 620 nm a 630 nm, 2,2 J cm⁻²). As barras de erro representam o desvio padrão entre o resultado dos poços em uma mesma concentração de experimentos distintos.

Conforme demonstrado, as curvas de viabilidade celular em função da concentração foram ajustadas utilizando um modelo de regressão não linear sigmoide de Boltzmann para determinação do perfil dose-resposta dos FS. Esse ajuste matemático serve de auxílio para a determinação de alguns valores de IC₅₀, que foram extraídos e compilados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (μM) para as formulações lipossomais de 3-CF₃Pz e 4-FPz nas linhagens HaCaT e A431, com e sem irradiação, incluindo o cálculo do índice fototóxico e do índice de seletividade (IS) entre linhagens.

HaCaT			
	IC₅₀ (μM) não irradiado	IC₅₀ (μM) irradiado	Índice fototóxico
3-CF ₃ Pz	2,48	1,15	2,14
4-FPz	0,45	0,39	1,15
A431			
3-CF ₃ Pz	4,12	0,23	18,30
4-FPz	4,99	0,83	6,06
Índice de seletividade (IS)			
3-CF ₃ Pz	5,13		
4-FPz	0,47		

De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que a atividade citotóxica das Pzs não é significativamente diferente da fototoxicidade para as células HaCaT, visto que os índices fototóxicos, calculados pela razão entre IC₅₀ não irradiado pelo IC₅₀ irradiado, para a 3-CF₃Pz e a 4-FPz foram iguais a 2,14 e 1,15, respectivamente. Já na linhagem tumoral, a presença de luz induziu significativo aumento na morte celular para ambos os FS, sendo que a 3-CF₃Pz se tornou 18 vezes mais ativa quando exposta a luz, enquanto a 4-FPz obteve um terço desse valor.

Ao realizar a mesma análise entre as linhagens celulares considerando apenas os valores de IC₅₀ após irradiação, ou seja, o IC₅₀ resultante da fotossensibilização dos compostos em HaCaT e A431, torna-se possível estimar a seletividade desses compostos em suas condições de maior atividade. Nesse ponto, é possível identificar que a 3-CF₃Pz demonstrou um índice de seletividade 5 vezes maior para as células cancerosas quando comparada às células normais, o que configura uma resposta

altamente desejável para um FS, uma vez que permite destruir células tumorais em concentrações que são pouco tóxicas para os tecidos normais durante o tratamento com TFD. A 4-FPz, por sua vez, demonstrou uma seletividade inversa, chegando a ser mais tóxica para as células HaCaT.

A diferença de atividade entre os FS pode ser correlacionada com alguns fatores como o grau de incorporação celular dos mesmos e uma possível diferenciação em sua localização intracelular. Levando em consideração que as duas Pzs estão carregadas em membranas lipídicas de mesma composição e com distribuição de tamanho similares, supõe-se que a diferença na incorporação dessas vesículas em uma mesma linhagem celular seja mínima, tendo em vista que lipossomos tendem a ser incorporados pelo processo de endocitose.^{62,63} Entretanto, diferenças estruturais entre essas porfirazinas podem resultar num acúmulo preferencial em organelas intracelulares, como por exemplo no lisossomo, responsável pelo processo de digestão celular⁶⁴⁻⁶⁶ ou na mitocôndria, resultando em eficiências fototóxicas diferentes⁶⁷⁻⁷⁰.

5.2 DANO SUBCELULAR

Realizou-se os ensaios de dano subcelular com o intuito de obter informações a respeito da localização intracelular dos FS, visto que, danos em organelas específicas poderiam vir a justificar a diferença na eficiência fotodinâmica dos compostos. Este experimento foi realizado para ambas as linhagens celulares em uma concentração de 1 μ M para ambas as Pzs, que foram fotossensibilizadas com um sistema de irradiação distinto (650 nm) do experimento anterior, porém, buscando-se manter a dose de luz e tempo de irradiação. As organelas alvo do estudo foram núcleo, mitocôndria e lisossomo, levando em consideração as suas respectivas importâncias para o funcionamento regular da célula.

A sonda molecular H258, responsável pela marcação nuclear, torna-se um fluoróforo ao interagir com as duplas hélices do ácido desoxirribonucleico (ADN) por meio dos pares de bases adenina–timina presentes nos sulcos menores de sua estrutura. O MTG, marcador de mitocôndria, se difunde pela célula até chegar na membrana mitocondrial, onde estabelece ligações covalentes entre o grupo funcional clorometilfenil com os grupos tióis que constituem os resíduos de cisteínas presentes na parede mitocondrial,⁷¹⁻⁷³ podendo também interagir com o potencial de membrana

dessa organela.⁷¹ Por fim, o LTDR, marcador de lisossomo, se difunde através da membrana celular até alcançar a membrana lipossomal, onde se torna fluorescente ao ter seu grupo amino protonado pelo meio ácido do lisossomo.⁷⁴⁻⁷⁶

Devido a isso, quaisquer alterações no funcionamento destas organelas são refletidas na fluorescência dos marcadores, indicando um possível dano localizado. Como a ação dos FS é local, devido principalmente ao rápido decaimento do $^1\text{O}_2$ no meio intracelular, limitando sua difusão a curtas distâncias, pode-se correlacionar o dano à localização do FS nas células.

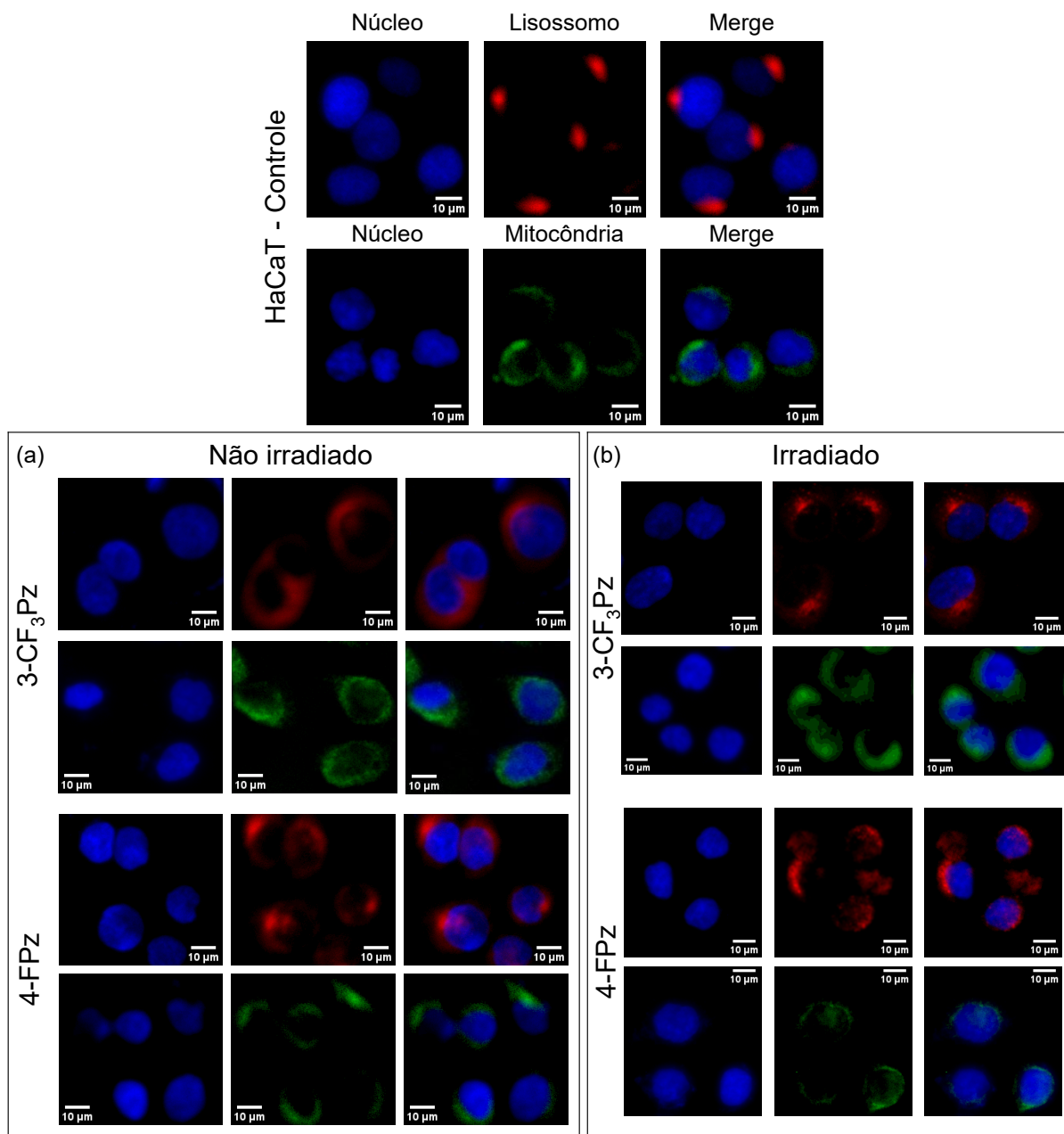


Figura 11 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz em linhagem de célula normal (HaCaT) a 1 µM fotossensibilizados por LED em 650 nm com uma dose de 2,2 J cm⁻².

Ao observar a Figura 11, que apresenta as imagens do ensaio de microscopia feito nas células HaCaT, é possível identificar a integridade das 3 organelas estudadas no grupo de controle, uma vez que as marcações estão nítidas e as organelas apresentam uma morfologia coerente. As células tratadas com os FS na ausência de luz (Figura 11 (a)) demonstraram uma marcação inalterada tanto para o núcleo como para a mitocôndria. No entanto, é perceptível uma alteração no padrão de marcação referente ao lisossomo, sendo possível notar um espalhamento de fluorescência, que indica um possível dano causado pelos compostos a estas organelas.

No grupo de células irradiadas (Figura 11 (b)), a variação na fluorescência dos lisossomos é menos visual, porém visualizando uma área maior do poço, tal qual demonstrado no (Apêndice D, Figura 49) para a FPz, é possível inferir que ocorre uma diminuição da emissão de fluorescência do LTDR. Para o grupo de células exposto a 3-CF₃Pz sob irradiação, é possível identificar uma perda de foco para a marcação com o MTG. Todavia, como essa mesma alteração também é observada para a marcação nuclear, que demonstrou morfologia preservada, pressupõe-se um erro experimental no momento da aquisição das imagens e não uma resposta celular ao composto. Comparando a resposta celular da HaCaT proveniente do dano gerado por ambos os FS, é possível inferir que ambos estão localizados majoritariamente nos lisossomos. Apesar disso, a 4-FPz demonstrou uma maior capacidade de inviabilizar esta organela para essa linhagem, o que pode explicar a maior toxicidade da 4-FPz na HaCaT comparada à da 3-CF₃Pz na concentração utilizada.

Transpondo a mesma lógica do que foi discutido para os ensaios realizados com as células cancerosas, é possível perceber algumas diferenças nos padrões de marcação apresentados pelo grupo controle (Figura 12). Nele observou-se uma deformidade no padrão nuclear, que deve-se ao processo de divisão celular que, por ser mais acelerado em células tumorais, é possível visualizar em mais células neste experimento.⁷⁷ Além disso, observa-se também uma baixa fluorescência para as marcações com MTG, possivelmente relacionada a um erro experimental ocorrido durante o manuseio das placas, o qual pode ter favorecido a replicação celular, resultando assim em uma diluição do marcador devido à maior densidade de células presentes no ensaio. Em contrapartida, o LTDR se manteve coerente com o padrão de marcação observado para as células HaCaT.

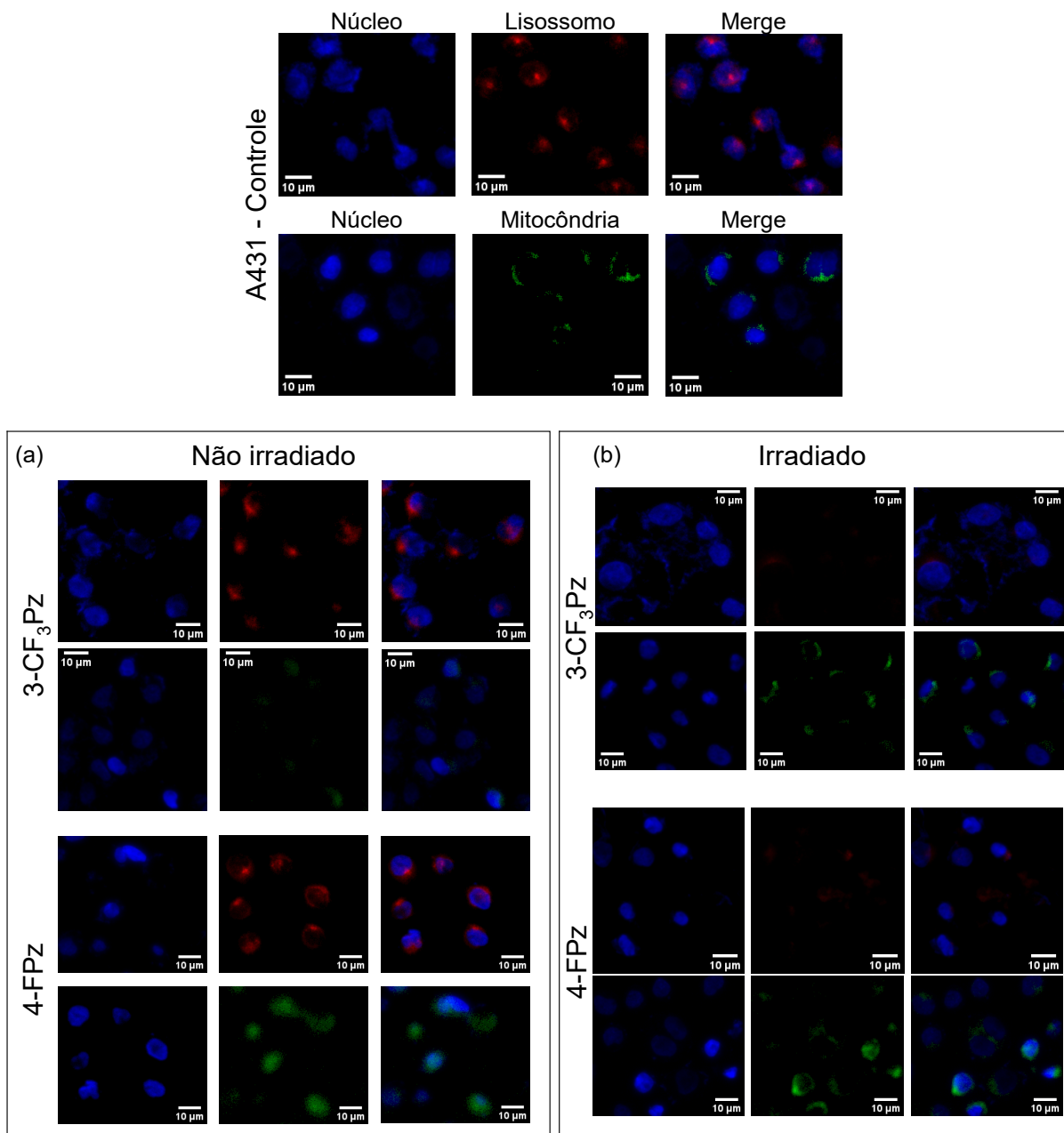


Figura 12 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz em linhagem de célula cancerosa (A431) a 1mM fotossensibilizados por LED em 650 nm com uma dose de 2,2 J cm⁻².

Da mesma forma, ao analisar o grupo de células contendo as Pzs na ausência de luz (Figura 12 (a)), não foi possível observar mudanças significativas na marcação das 3 organelas. Todavia, para o grupo irradiado (Figura 12 (b)), ocorre uma nítida mudança para as marcações do LTDR, cuja intensidade de fluorescência é quase extinta, dando destaque para a 3-CF₃Pz que se demonstra levemente mais eficiente quando comparada a 4-FPz. Outro fator importante a ser discutido é que após a fotossensibilização dos compostos, é possível observar com mais clareza as marcações mitocondriais. Essa resposta pode estar correlacionada com uma possível

permeabilização na membrana citoplasmática causada pela fotossensibilização dos compostos, facilitando o acesso do MTG às mitocôndrias.

Diante disso, é possível afirmar que não houve uma diferença de localização intracelular para ambos os compostos nas linhagens celulares estudadas. O dano observado no lisossomo, indicado pela diminuição da fluorescência do marcador, reflete uma variação no pH interno dessa organela. Essa modificação no pH pode gerar uma redução da atividade de algumas enzimas como a catepsina, que são responsáveis pela degradação de proteínas, além de poder causar um aumento na expressão de receptores $Fc\gamma$, principal agente no início da inflamação tecidual⁶³. Conseqüentemente os resultados sugerem que o dano causado por esses FS pode vir promover a morte por necrose celular.^{67,78}

5.3 ENSAIOS DE PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANA

Como os ensaios de localização intracelular não apresentaram evidências significativas que justificassem a diferença na eficiência fotodinâmica desses compostos, prosseguiu-se com a realização de estudos comparativos em sistemas mais simples, como por exemplo em membranas miméticas. Nesse sentido, com o intuito de comparar a capacidade de permeabilização de membranas entre as Pzs, foram realizados experimentos de vazamento de membrana utilizando vesículas lipídicas constituídas por DOPC e 0,5 mol% de FS, contendo solução de carboxifluoresceína em seu interior. Dentro das vesículas, a concentração de CF é alta, o que provoca uma supressão parcial de sua fluorescência. Quando a membrana é permeabilizada, a CF vaza para o meio extravésicilar, resultando em sua diluição e regeneração da emissão. Logo, um aumento da fluorescência da CF ao longo do experimento é indicativo de vazamento de membrana.

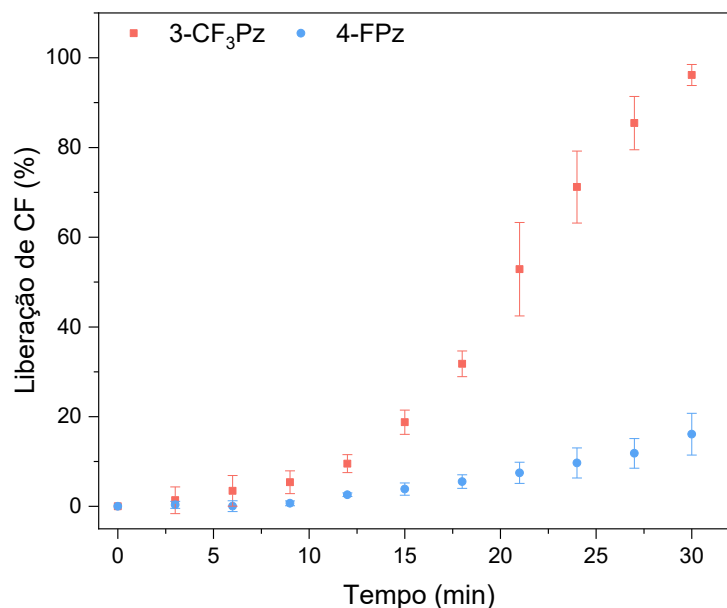


Figura 13 - Porcentagem de permeabilização de membrana acompanhada pela liberação de carboxifluoresceína ao longo do tempo, realizada com fotossensibilização de lipossomos contendo as Pzs sob irradiação com laser em 648 nm.

O experimento resultou nas cinéticas de liberação de CF apresentadas na Figura 13, que demonstra uma diferenciação significativa entre os compostos a partir de 6 minutos de irradiação, com um comportamento exponencial para a 3-CF₃Pz. Após 30 minutos de irradiação sob laser vermelho, a 3-CF₃Pz alcança 100% de permeabilização contra apenas 17% para a 4-FPz. Essa notável diferença na capacidade de permeabilizar membranas pode explicar a maior eficiência fotodinâmica da 3-CF₃Pz frente a 4-FPz nas células tumorais, e pode estar relacionada a dois fatores: (i) diferenças nos mecanismos de fotossensibilização e consequentemente na formação de EROs e (ii) diferenças no posicionamento destes FS na bicamada lipídica. Estes fatores afetam diretamente os produtos de oxidação lipídica formados e a eficiência de geração dos mesmos, que por sua vez se correlacionam com a cinética de vazamento de membrana.¹² Dessa forma, prosseguiu-se com experimentos de quantificação de EROs e caracterização dos produtos de fotooxidação lipídica, além de ensaios de dinâmica molecular em bicamadas para ambas as Pzs.

5.4 ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO INDIRETO

Tendo em vista que, de acordo com a literatura, compostos que possuem um maior rendimento quântico de oxigênio singleto são conseqüentemente mais eficientes quando aplicados a TFD, optou-se por determinar o rendimento quântico para as Pzs em diferentes sistemas, sendo o primeiro em solvente orgânico, devido à alta solubilidade destes compostos, e, em seguida, em uma suspensão lipossomal, para simular um sistema biológico. Em virtude disso, realizou-se dois experimentos distintos para o mesmo propósito: o método direto de detecção de $^1\text{O}_2$, que se baseia na obtenção do sinal referente ao decaimento da fosforescência desta espécie em 1270 nm, e o método indireto, no qual a produção de oxigênio singleto foi acompanhada por meio do decaimento da banda (400 nm) de absorção da sonda molecular ABDA por espectroscopia de UV-VIS (Apêndice I, Figura 54), indicando a formação de um endoperóxido (Apêndice H, Figura 53). O experimento para a quantificação do rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ) realizado pelo método indireto, foi conduzido carreando os FS em vesículas de DMPC e irradiando-os com um laser contínuo em 648 nm.

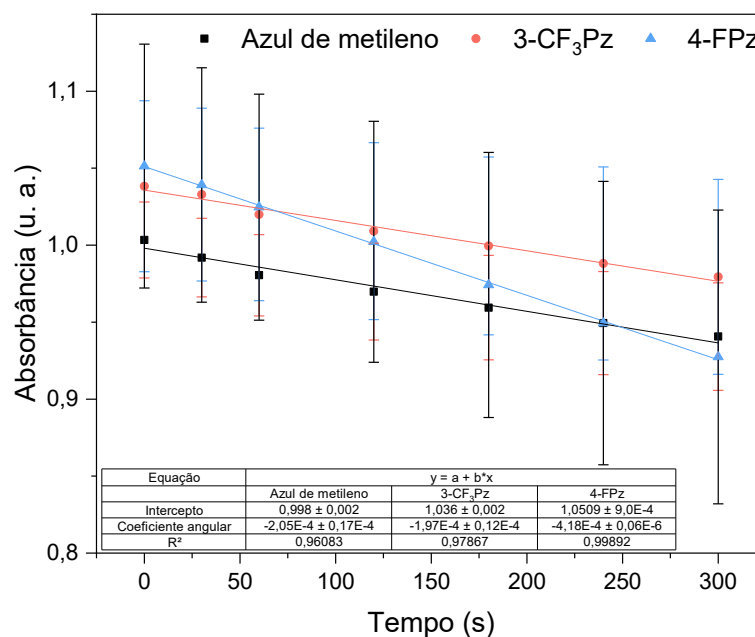


Figura 14 - Decaimento da absorbância da sonda ABDA (400 nm) indicando a geração de oxigênio singleto por meio da fotossensibilização do azul de metileno, 3-CF₃Pz e 4-FPz, excitados por laser em 648 nm. As barras de erro representam o desvio padrão entre o resultado obtidos entre as triplicatas do experimento.

Os resultados obtidos para esse experimento demonstraram que, por meio de seus coeficientes angular (Figura 14), a 4-FPz apresentou eficiência relativamente maior para a formação do $^1\text{O}_2$ quando comparado aos demais compostos estudados. No entanto, dados os altos desvios observados no gráfico, pode-se considerar essa diferença como estatisticamente não significativa. Além disso, observou-se que o padrão MB apresentou um valor para o seu coeficiente angular muito baixo ($-2,05 \times 10^{-4}$), o que resultou em valores de ϕ_Δ igual a 77% para a 3-CF₃Pz e 117% para a 4-FPz, que não são reais.

5.5 ENSAIOS DE EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO – MÉTODO DIRETO

Tendo em vista que através do método indireto não foi possível quantificar apropriadamente a produção de oxigênio singleto das Pzs, optou-se por realizar também estudos para a obtenção de dados que permitam uma quantificação direta da produção de oxigênio singleto. Dessa forma, com os resultados obtidos através do método direto para o sistema em THF, foi possível plotar os gráficos apresentados na Figura 15, para a irradiação por laser (650 nm) e por LED (633 nm).

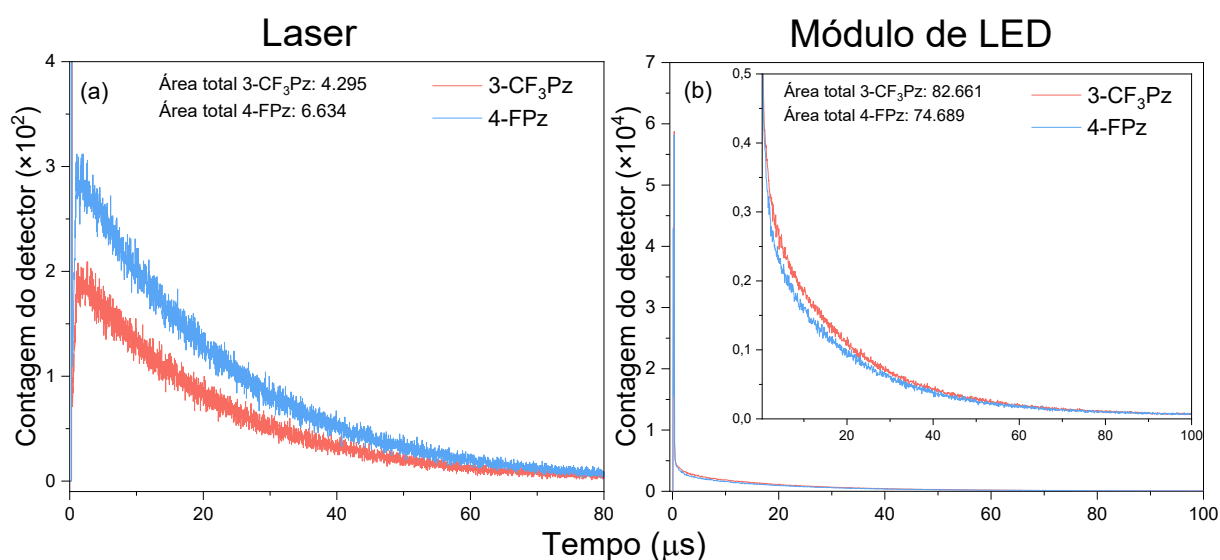


Figura 15 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singleto (1270 nm), comparando a 3-CF₃Pz e a 4-FPz em THF, com fotossensibilização realizada por laser (650 nm) e LED (633 nm).

A princípio, foi possível observar um comportamento distinto dos compostos a depender da fonte de irradiação. Ao irradiar os compostos com laser (Figura 15(a)), a

4-FPz demonstrou uma eficiência maior para a produção de $^1\text{O}_2$ do que a 3-CF₃Pz. Ao integrar a área sob os gráficos, obteve-se os valores de 6.634 e 4.295 para a 4-FPz e 3-CF₃Pz, respectivamente, indicando uma eficiência 35% menor para a 3-CF₃Pz. Porém, quando utilizou-se o módulo de LED do equipamento, o comportamento se inverteu, resultando em uma eficiência 10% menor para a 4-FPz. A inversão no comportamento dos FS pode estar correlacionada com uma maior absorção de luz pela 3-CF₃Pz na faixa de emissão do LED, porém, como este módulo não foi caracterizado, não foi possível normalizar os resultados corrigindo-os por suas respectivas absorvidades molares (Figura 15 (b)). Como forma de comparar os cálculos dos rendimentos quânticos de oxigênio singleto das Pzs, utilizou-se o padrão azul de metileno em etanol, pois não há valor do rendimento descrito na literatura para THF. Dessa forma, utilizou-se a amplitude do sinal do decaimento ao invés da integral para o cálculo, uma vez que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ varia com o solvente. Todavia, a intensidade de sinal obtida para o MB foi baixa, (Apêndice J, Figura 55), fazendo com que os valores de ϕ_Δ fossem muito altos, sendo igual a 59% para a 3-CF₃Pz e 100% para e para a 4-FPz (Figura 15(a)). Dessa forma, como os experimentos foram realizados sob as mesmas condições, uma comparação qualitativa entre as curvas de decaimento das Pzs ainda é válida para inferir a capacidade de produção de oxigênio singleto.

Levando em consideração a aplicação em meio biológico destes compostos, as medidas demonstradas na Figura 16 foram realizadas com os FS carregados e em uma dispersão lipossomal, tal qual feito para o método indireto.

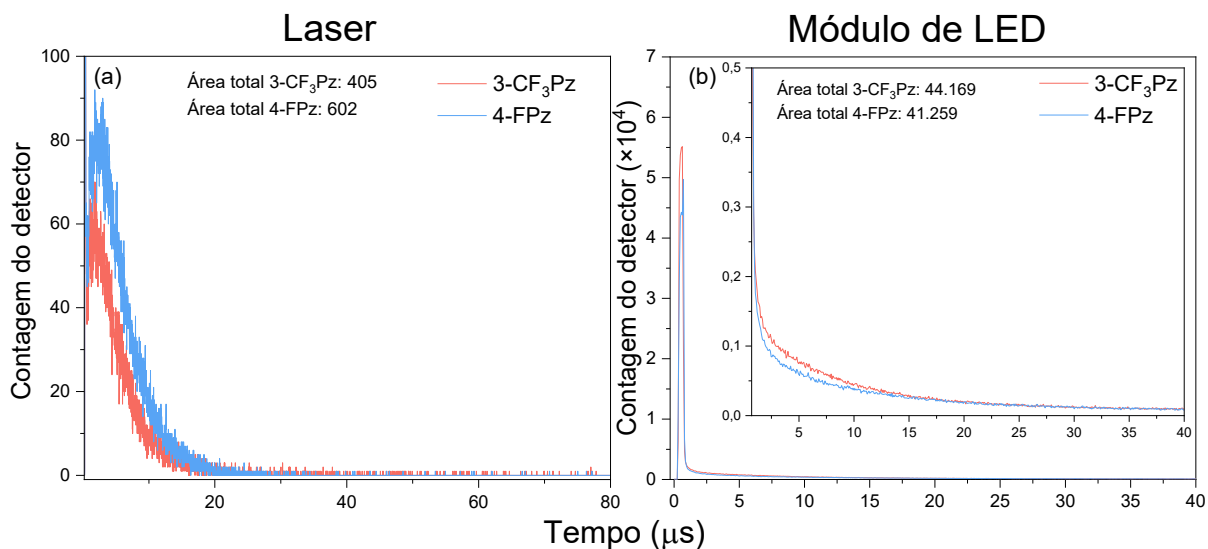


Figura 16 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete (1270 nm), comparando a 3-CF₃Pz e a 4-FPz, em DMPC com fotossensibilização realizada por (a) Laser (650 nm) e (b) LED (633 nm).

A tendência de formação de ¹O₂ em água, sob irradiação com laser e com LED, segue o mesmo padrão dos experimentos realizados em THF, entretanto, na Figura 16, tanto os dados apresentados em (a) quanto em (b), chamam atenção devido à redução significativa de intensidade dos sinais, indicando uma produção consideravelmente maior de produção de ¹O₂ em água. Isso se deve principalmente à menor quantidade de oxigênio molecular disponível em água, considerando sua menor solubilidade neste solvente comparado ao THF. Já a outra está correlacionada com o tempo de vida apresentada por essa espécie em diferentes solventes, sendo aproximadamente de 3 μs a 4 μs em água^{51,79–81} e 30 μs em THF⁸². Essa mudança se deve a compatibilidade entre os modos vibracionais do ¹O₂ em comparação com os do solvente, dado que, quanto mais próximo um do outro energeticamente falando, mais rápido ocorrerá a transição dessa espécie para o seu estado fundamental de forma não radiativa, modificando assim a escala de tempo do sinal.⁸³ Calculando o ϕ_{Δ} sob as mesmas condições realizadas para o anterior, chega-se ao resultado de 50% para a 3-CF₃Pz e 88% para a 4-FPz (Figura 16 (a)).

Como não foi possível observar nenhuma grande mudança na produção de oxigênio singleto ao fotossensibilizar as Pzs carregadas em lipossomas constituídos por lipídio saturado (Figura 16 (b)), buscou-se estudar o comportamento desses compostos quando carregados em um sistema lipídico insaturado (lecitina de soja), simulando um sistema mais representativo do utilizado no meio biológico.

A princípio, esse tipo de sistema não é utilizado para a obtenção de ϕ_{Δ} para FSs, tendo em vista que as insaturações lipídicas podem gerar uma supressão da formação do $^1\text{O}_2$ considerando a sua possível participação nos mecanismos de fotooxidação lipídica comentada anteriormente. Entretanto, ao se realizar uma análise qualitativa, é possível extrair algumas informações relevantes. Uma delas é a integração das curvas apresentadas pelo gráfico Figura 17. Nela a área da 4-FPz equivale a 41.334 enquanto o valor para a 3-CF₃Pz é de 40.974. Comparando com os dados obtidos com o experimento anterior, em que se utiliza de lipossomos com lipídeos saturados (Figura 16 (b)), a área correspondente a 3-CF₃Pz apresentou uma diminuição de 7,24% enquanto a 4-FPz não expressou mudanças significativas.

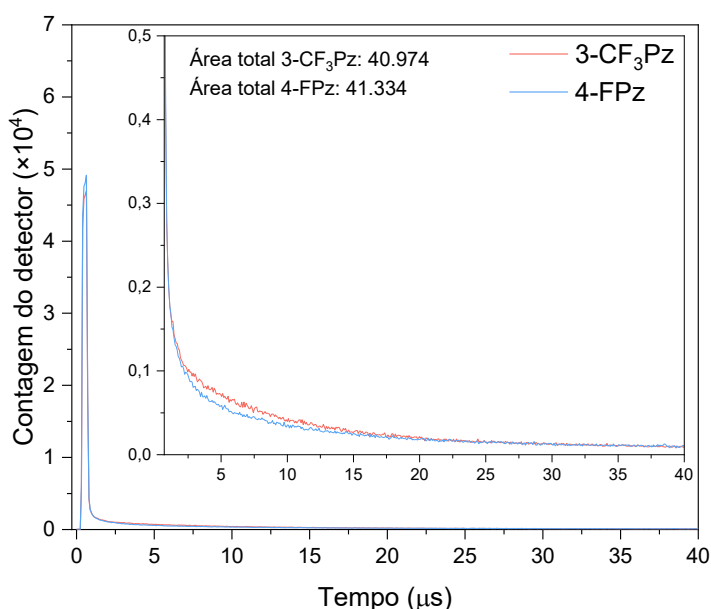


Figura 17 - Decaimento de fosforescência utilizado para determinar o rendimento quântico de oxigênio singleto (1270 nm), comparando a 3-CF₃Pz e a 4-FPz, em Lecitina de soja com fotossensibilização realizada por LED (633 nm).

Na escala de tempo entre 0 μs e 5 μs (Apêndice L, Figura 58), é possível observar a cinética de formação do $^1\text{O}_2$, que alcança um máximo de intensidade antes do seu decaimento. Ao comparar ambos os sistemas lipídicos, podemos observar uma diminuição mais significativa para a intensidade desse sinal para a 3-CF₃Pz, o que a princípio não seria esperado, visto que as mesmas condições experimentais foram aplicadas para ambos os sistemas. Como os mecanismos de formação do oxigênio singleto competem com outras formas de decaimento de energia, como reações de transferência de elétron ou transferência direta de energia para biomoléculas,⁸⁴ as variações mais nítidas observadas para a 3-CF₃Pz no experimento com lecitina de

soja podem indicar uma participação mais significativa desta Pz em mecanismos do tipo I, com formação, por exemplo, de outros radicais além do oxigênio singleto e/ou uma possível participação de transferência de elétrons destes FS com as insaturações lipídicas.

5.6 ENSAIOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA - EPR

Com a intenção de verificar a possível formação de radicais formados pelo mecanismo de tipo I durante a irradiação das Pzs, realizou-se uma série de ensaios de EPR utilizando três tipos de agentes capturadores de spin (do inglês: *spin trap*), sendo eles o TEMP, DMPO e o PBN. O TEMP é responsável por interagir com oxigênio singleto⁸⁵ e os demais com radicais superóxidos, hidroxila e hidroperoxila^{86,87}. As condições utilizadas para esses experimentos foram semelhantes às utilizadas nos experimentos de $^1\text{O}_2$, contudo, optou-se por utilizar DOPC para os experimentos que se utilizaram de uma suspensão lipídica insaturada. Todos os sistemas foram irradiados na faixa entre 560 nm a 750 nm.

Como todos os experimentos foram realizados em uma mesma concentração molar, foi necessário aplicar um fator de correção levando em consideração o coeficiente de absorvidade molar dos compostos, para normalizar a absorção de luz, dado que a 3-CF₃Pz possui uma absorção maior quando comparada à 4-FPz (Figura 18). Com isso, todos os resultados obtidos da 4-FPz por meio desse experimento foram normalizados multiplicando-se os valores obtidos por 1,282. Valor proveniente da razão entre a área de gráfico na faixa de emissão da fonte.

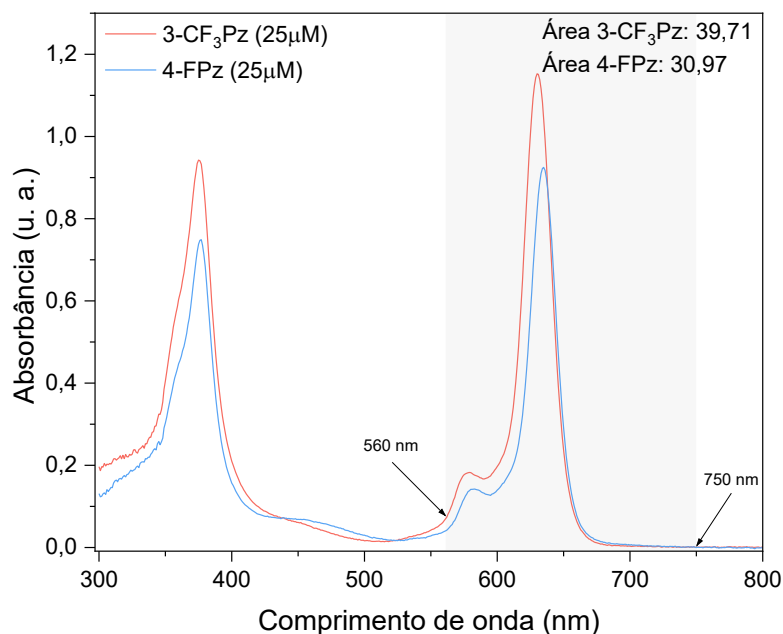


Figura 18 - Comparação da absorbância dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz em mesma concentração molar. A área sombreada indica a faixa espectral de emissão da lâmpada utilizada para excitação.

A princípio, as medidas de EPR foram realizadas em THF com a utilização da sonda TEMP, para validação do protocolo experimental e para obtenção de mais uma evidência da capacidade de produção de oxigênio singleto das Pzs.

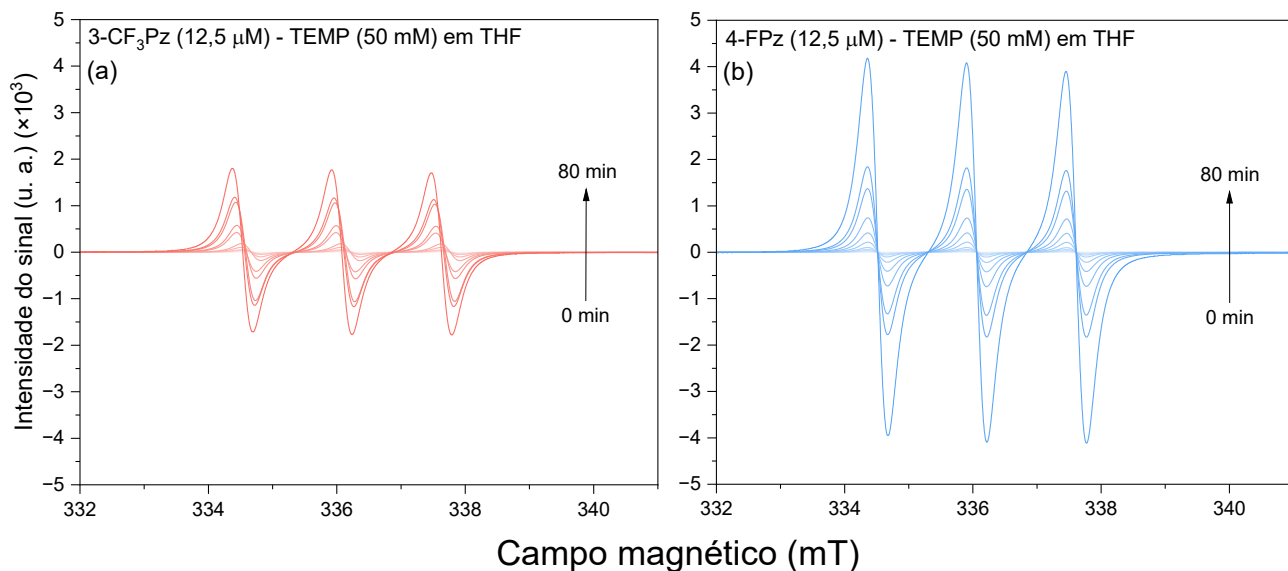


Figura 19 - Espectros de EPR obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em THF, evidenciando a geração de oxigênio singleto pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz, ambos a 12,5 μM fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).

A sonda TEMP reage especificamente com o ¹O₂ formando majoritariamente o radical TEMPOL, que apresenta os três sinais observados em cada espectro da Figura

19. De acordo com os resultados apresentados, com o aumento do tempo de irradiação das Pzs em THF, há um aumento dos sinais do TEMPOL, devido à formação de $^1\text{O}_2$ no meio. É possível notar que a 4-FPz se demonstrou superior à 3-CF₃Pz na eficiência de produção de $^1\text{O}_2$. Entretanto, os espectros demonstram algumas características incomuns, quando comparados com parâmetros presentes na literatura, tais como o alargamento das linhas e uma leve assimetria nos sinais que, normalmente, possuem uma proporção bem definida de 1:1:1.

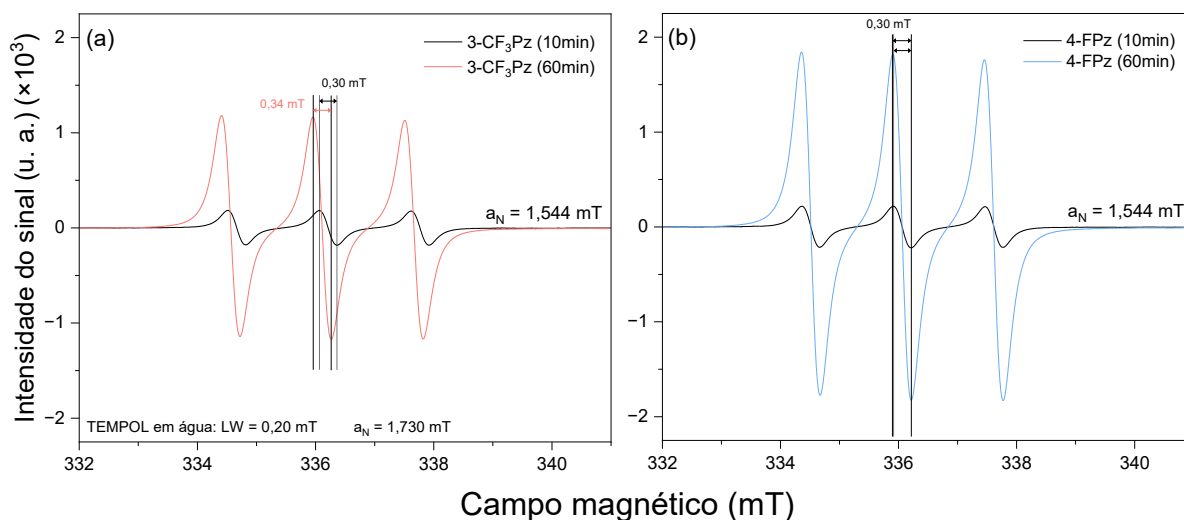


Figura 20 - Espectros de EPR em THF mostrando variação na largura de linha do aduto formados pela reação da sonda TEMPOL com oxigênio singleto gerado pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz.

Comparando os dados observados na Figura 20, é possível identificar uma largura de linha de 0,30 mT até 60 minutos de irradiação para 4-FPz, entretanto, é possível ver uma pequena diferença na largura de linha para 3-CF₃Pz, de 0,30 mT para 0,34 mT. Essa variação pode ser atribuída à alta solubilidade do oxigênio molecular no meio, que pode vir a favorecer interações magnéticas do tipo interações de troca. Isso ocorre pois o radical nitroxil do TEMPOL possui sensibilidade ao tempo de correlação, ou seja, sensibilidade ao movimento de rotação de espécies paramagnéticas presentes na solução. Assim, uma maior concentração de $^3\text{O}_2$ é capaz de tornar os movimentos mais lentos, conseqüentemente alargando o espectro.

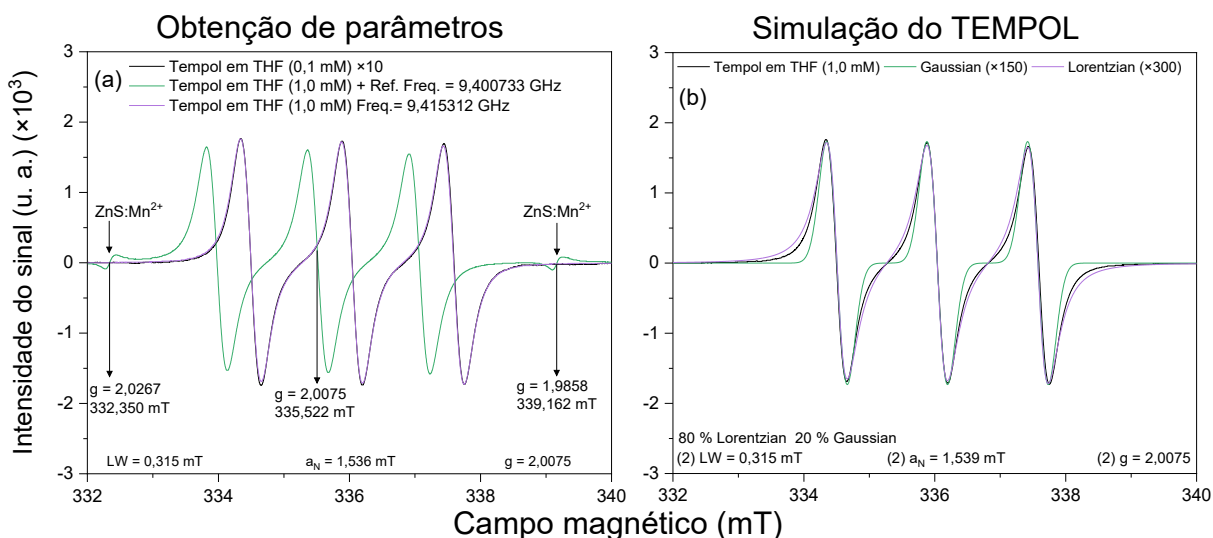


Figura 21 – Espectros de calibração da espécie TEMPOL onde (a) corresponde a caracterização do espectro de EPR do radical TEMPOL utilizando a sonda ZnS:Mn em THF e (b) ajuste do espectro experimental com simulação baseada em uma combinação de 80% de perfil lorentziano e 20% gaussiano.

Sendo assim, para que os sinais fossem devidamente caracterizados e os parâmetros, como o fator g e a constante de acoplamento hiperfino (a_N), fossem obtidos para posterior análise e simulação dos espectros, utilizou-se a sonda de sulfeto de zinco dopado com manganês ($ZnS:Mn^{+2}$)⁸⁸, como mostrado na Figura 20. Com isso, pôde-se afirmar que o aduto gerado pelo TEMP corresponde ao mesmo sinal do TEMPOL, cujos parâmetros são demonstrados na Figura 20 (a) e reproduzidos através de simulação na Figura 21 (b), com linhas formadas por mistura de um modelo equivalente a 80% Gaussiana e 20% Lorentziana capazes de reproduzir com confiabilidade os parâmetros experimentais.

Com esses dados, tornou-se possível realizar a quantificação das espécies geradas por cada um dos compostos, utilizando como parâmetro uma solução de concentração conhecida do TEMPOL, que é um aduto estável.

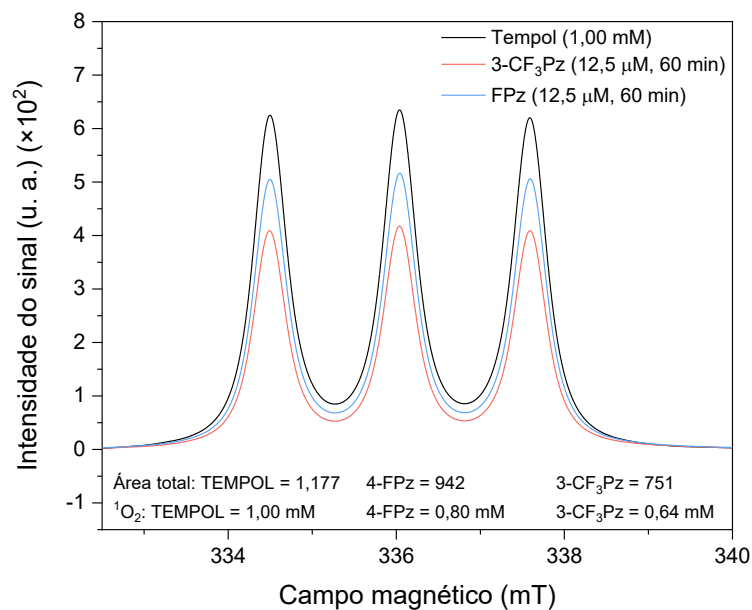


Figura 22 - Integração dos sinais de EPR do aduto TEMPOL formado na presença dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm), comparados com uma solução padrão de TEMPOL 1,00 mM .

Ao comparar a intensidade dos sinais obtidos para os dois compostos em 60 minutos de fotossensibilização sem a normalização dos dados (Figura 22), observa-se que, novamente, a 4-FPz apresenta uma tendência maior para a produção de ¹O₂, resultando em maior formação de TEMPOL. Ao normalizar os valores obtidos para a 4-FPz, a área total de integração passa de 942 para 1.208, o que equivale a 1,03 mM de TEMPOL produzido.

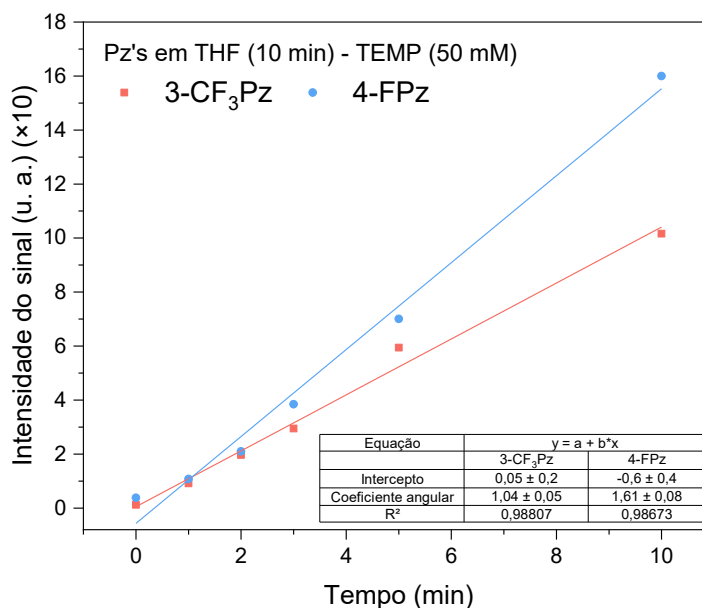


Figura 23 - Análise cinética nos tempos iniciais da formação do aduto TEMPOL formado na presença dos FS's 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).

Realizando uma análise cinética estritamente para os tempos iniciais dessas reações (Figura 23) é possível perceber que a constante de reação destes compostos é ligeiramente distinta, tendo em vista que o $k_{(3\text{-CF}_3\text{Pz})} = 10,4 \text{ min}^{-1}$ enquanto o $k_{(4\text{-FPz})} = 16,1 \text{ min}^{-1}$. Ao converter os valores representativamente em porcentagem, a 3-CF₃Pz só representa 64,6% da 4-FPz. Esse valor é equivalente ao mesmo dado obtido durante a quantificação de oxigênio singleto irradiada por laser em THF, validando o protocolo de EPR utilizado.

Após as análises feitas com relação a produção de oxigênio singleto, seguiu-se com a investigação sobre a possível formação de radicais hidroxila, hidroperóxilas e superóxidos no solvente orgânico, utilizando a sonda DMPO (Figura 24).

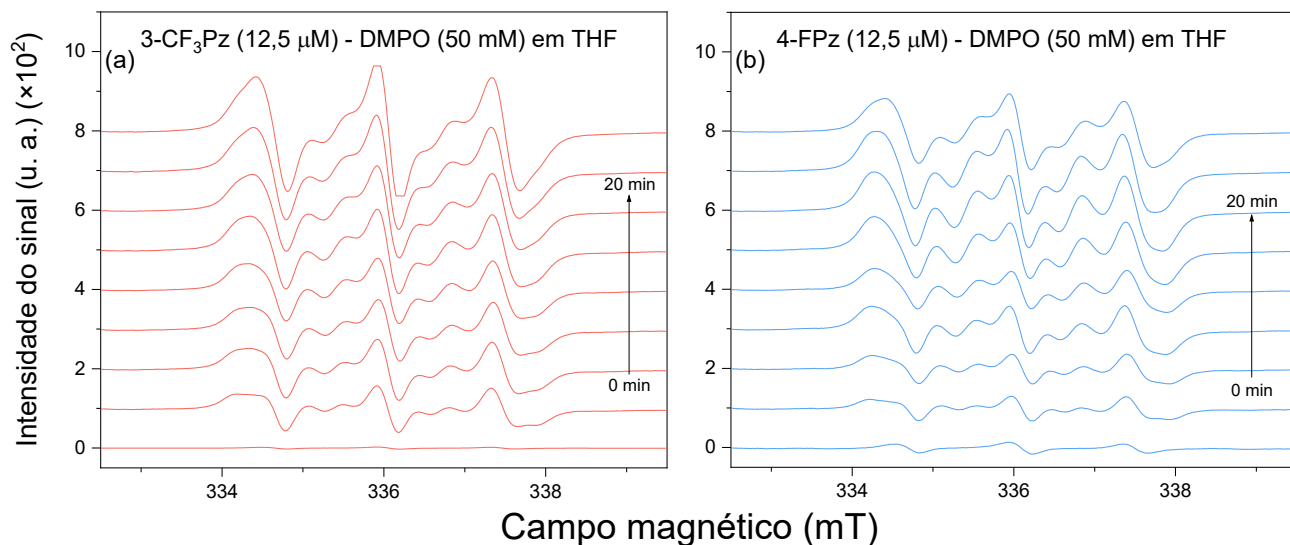


Figura 24 - Espectros de EPR obtidos com a sonda DMPO a 50 mM em THF, mostrando a formação de adutos induzida pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz fotossensibilizados por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).

A irradiação das Pzs em THF resultou na formação de sinais nos espectros do DMPO, que foram identificados como dois adutos da sonda, sendo um deles o DMPO-O₂^{•-} e o outro correspondente a um intermediário do DMPO-OH, visto como DMPO[•] na Figura 25.

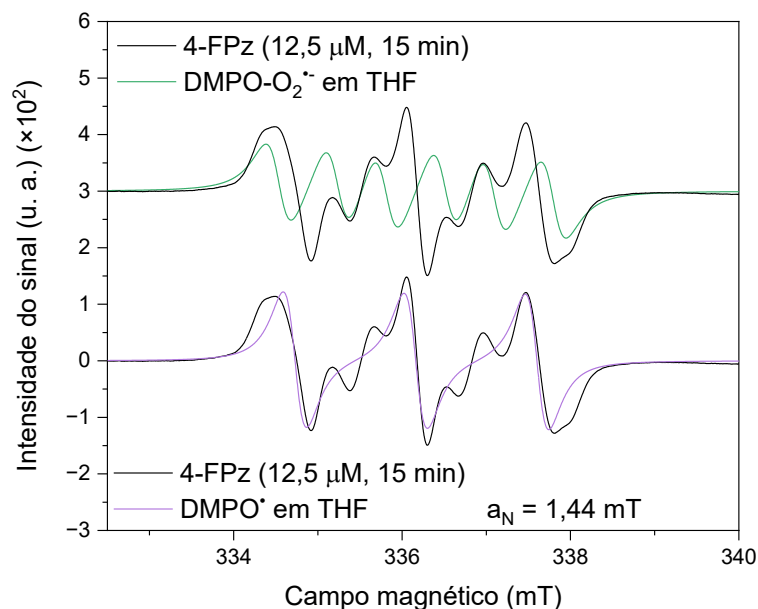


Figura 25 - Simulação espectral dos sinais obtidos para os adutos formados pela sonda DMPO após fotossensibilização.

Ambos os adutos foram produzidos em baixa concentração, visto que, ao analisar os espectros sobrepostos seguindo a evolução da reação não se observa diferença significativa de intensidade o sinal central das espécies geradas, sendo

atingido 164 de intensidade para a 3-CF₃Pz e 94 para a 4-FPz. A nítida diferença entre os compostos é demonstrada por meio dos sinais gerados entre as Pzs e demonstrados na Figura 25, resultante de uma proporção maior dos adutos DMPO-OH para a 3-CF₃Pz. Apesar deste resultado ser um indício de que pode haver a formação de outras espécies além do oxigênio singleto no meio estudado, sua produção em THF não implica em sua reprodutibilidade em dispersão lipossomal, tão pouco em meio biológico.

Após obter evidências de uma possível formação de radicais hidroxila ao se utilizar do DMPO, optou-se por confrontar estes resultados com um experimento utilizando a sonda PBN, com o intuito de caracterizar de forma clara a formação dos radicais derivados de hidroxilas, tendo em vista a estabilidade dos adutos gerados.

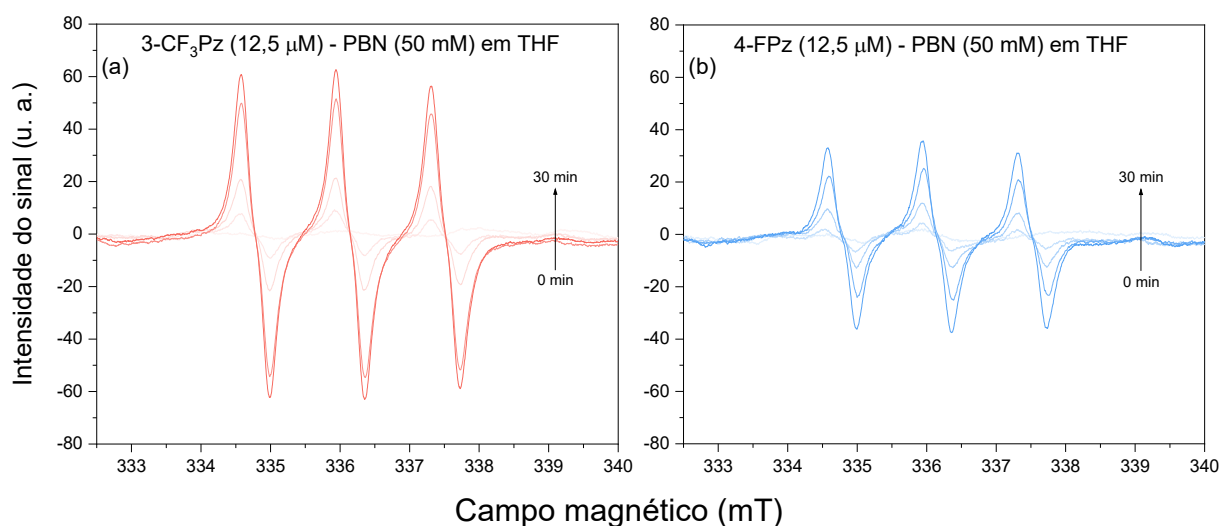


Figura 26 - Obtenção dos espectros de EPR utilizando a sonda PBN a 50 mM em THF, evidenciando a degradação da sonda pela geração de ¹O₂ ao longo do tempo para ambas as Pzs fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).

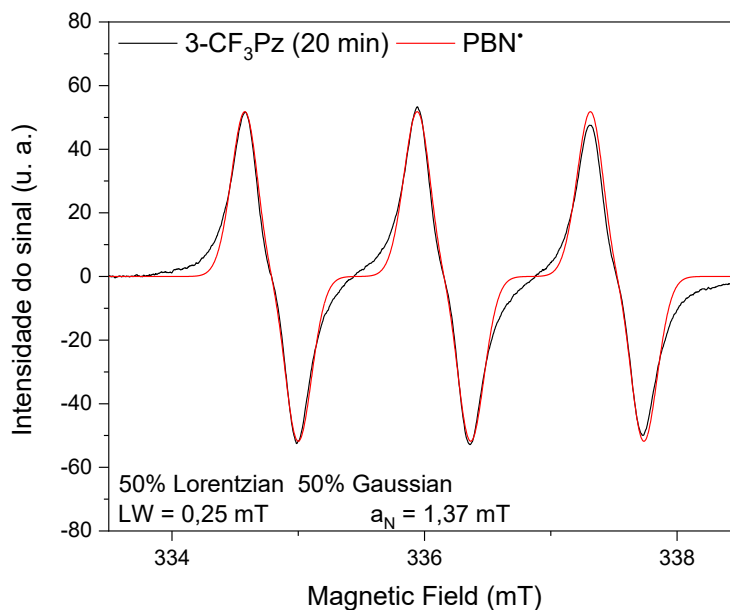


Figura 27 - Simulação espectral dos sinais obtidos para o aduto formado pela sonda PBN após fotossensibilização da 3-CF₃Pz.

Os espectros da Figura 26 mostram o aparecimento de sinais ao longo da irradiação, todavia, nenhuma espécie radicalar relevante foi caracterizada, ao final de 30 minutos, apenas os sinais correspondentes à degradação da sonda (Figura 27).

Seguindo a lógica dos ensaios anteriores, em que visa a realização de uma comparação mais próxima dos ensaios realizados em meio biológico, os experimentos de EPR também foram reproduzidos em água, carregando os fotossensibilizadores em lipossomas formados com lipídeos saturados.

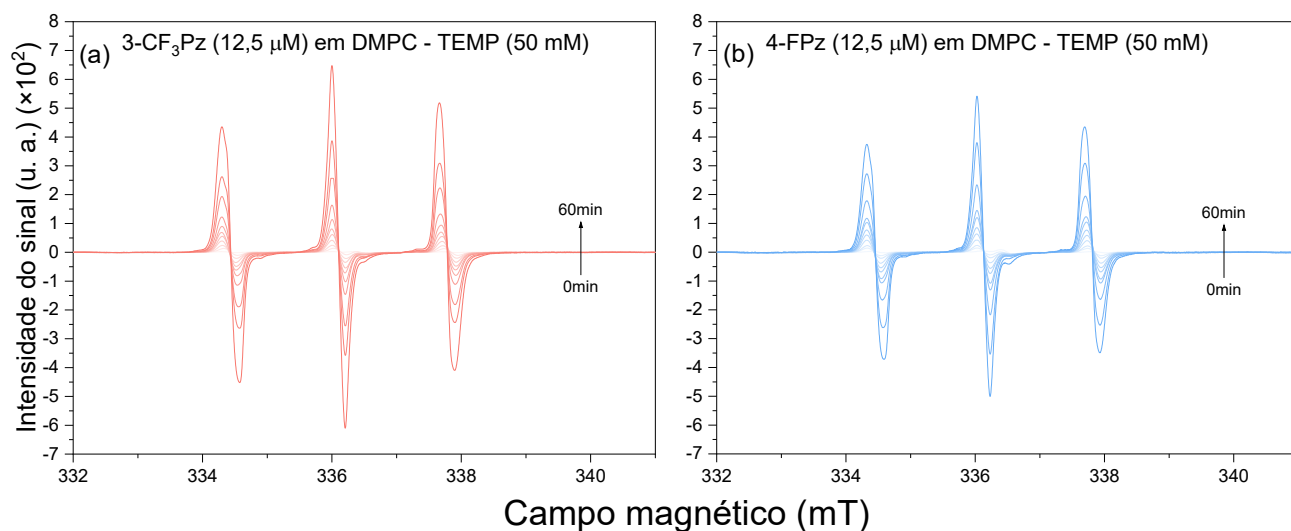


Figura 28 - Espectros de EPR a uma modulação de 1G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM, fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm).

A Figura 28 apresenta os gráficos obtidos com a sonda TEMP. É possível identificar uma diminuição na intensidade dos sinais em água quando comparado às medidas em THF. Essa diminuição pode estar correlacionada com a disponibilidade do oxigênio molecular em solução tal qual discutido anteriormente. Junto a isso, é importante ressaltar que os FS se encontram carregados em vesículas lipídicas e as sondas estão dispersas na solução, o que faz com que o $^1\text{O}_2$ tenha que se difundir para fora da membrana antes de interagir com a sonda, aumentando a probabilidade de decaimento do $^1\text{O}_2$ antes da reação.

Além da diminuição na intensidade do sinal, observa-se que para os espectros com tempos de fotossensibilização inferiores a 5 minutos, o produto formado corresponde apenas ao radical TEMPOL, entretanto, para tempos de irradiação maiores, os sinais passam a apresentar uma assimetria. Essa assimetria foi caracterizada e atribuída à formação de TEMPONE $a_N = 1.61$ mT, sendo perceptível com maior intensidade para a 3-CF₃Pz. Realizando o experimento com uma modulação de sinal menor, de 1 G para 0,5 G (Figura 29), resultou em uma maior resolução dos sinais, permitindo identificar e analisar os sinais referentes a cada espécie formada.

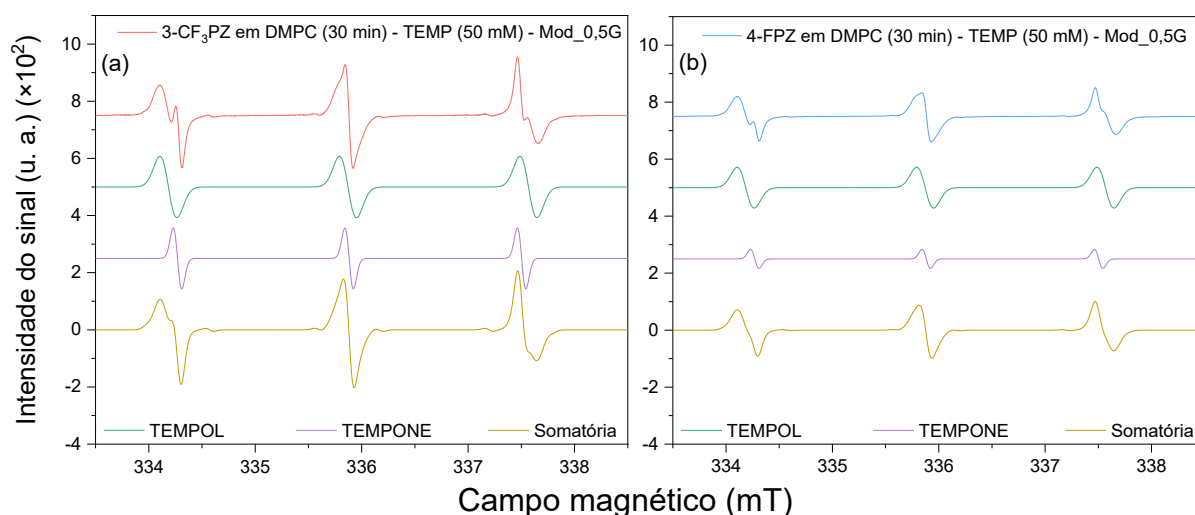


Figura 29 - Espectros de EPR a uma modulação de 0,5 G obtidos com a sonda TEMP a 50mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM , fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm). Sendo o primeiro sinal o resultado obtido experimentalmente e os demais correspondentes a simulações.

Analisando os máximos de intensidade para cada uma das espécies durante a fotossensibilização, é possível identificar que, enquanto a formação de TEMPOL

ocorre de forma linear, o TEMPONE apresenta uma cinética exponencial, após os primeiros minutos de iluminação (Figura 30). É possível perceber também que a 3-CF₃Pz apresenta um maior grau de formação para ambas as espécies, entretanto, como os mecanismos de formação do TEMPONE não são bem estabelecidos pela literatura, não é possível fazer uma correlação entre o resultado obtido e uma possível rota mecanística deste fotossensibilizador.

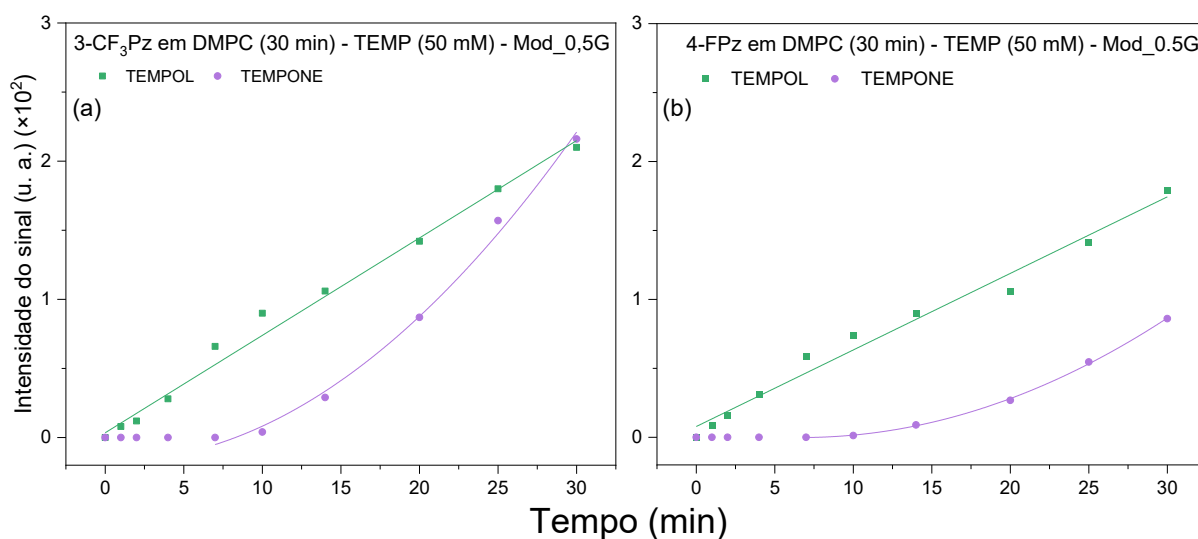


Figura 30 - Cinética da formação dos adutos TEMPOL e TEMPONE em sistema aquoso gerados pela fotossensibilização da suspensão lipídica de DMPC contendo a 3-CF₃Pz (a) e a 4-FPz (b). As linhas sólidas representam os ajustes dos dados experimentais.

Quando os mesmos parâmetros foram analisados em um sistema cujo encapsulamento lipídico foi realizado com DOPC (Figura 31), nota-se um comportamento distinto do anterior. Os espectros obtidos com TEMP em lipídio insaturado se demonstraram mais simétricos, quando comparados aos obtidos em DMPC. Essa evidência se torna um indício de que a rota de formação do TEMPONE está competindo com possíveis reações paralelas, como consumo do oxigênio singlete para a peroxidação lipídica, ou com reações de transferências de elétrons. É notório também a inversão na eficiência dos compostos, dando a entender que nesse sistema, a 4-FPz se demonstra mais eficiente na produção de oxigênio singlete. Acompanhando a reação com uma modulação mais baixa, torna-se evidente as baixas concentrações de TEMPONE (Figura 32).

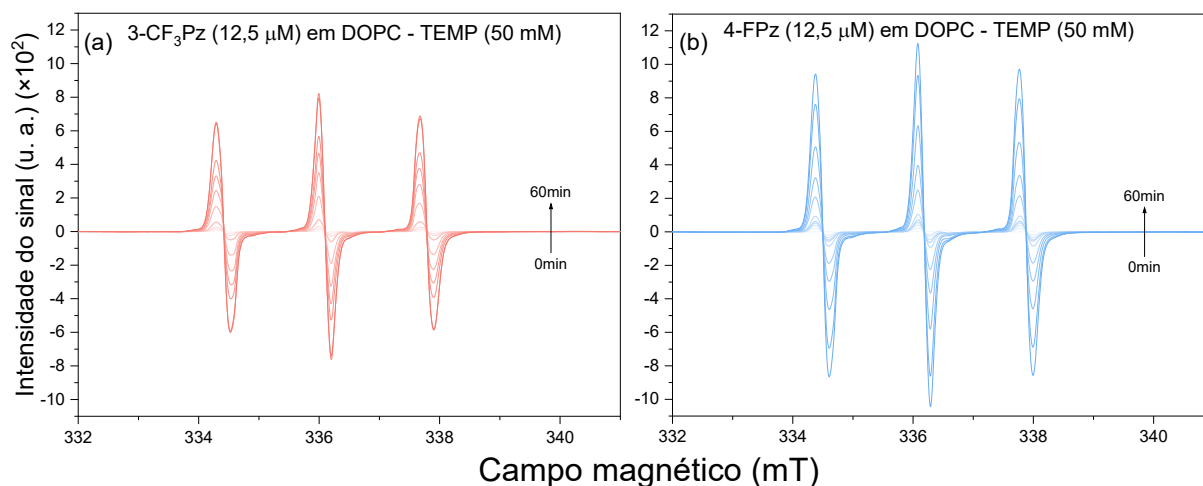


Figura 31 - Espectros de EPR a uma modulação de 1G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm)..

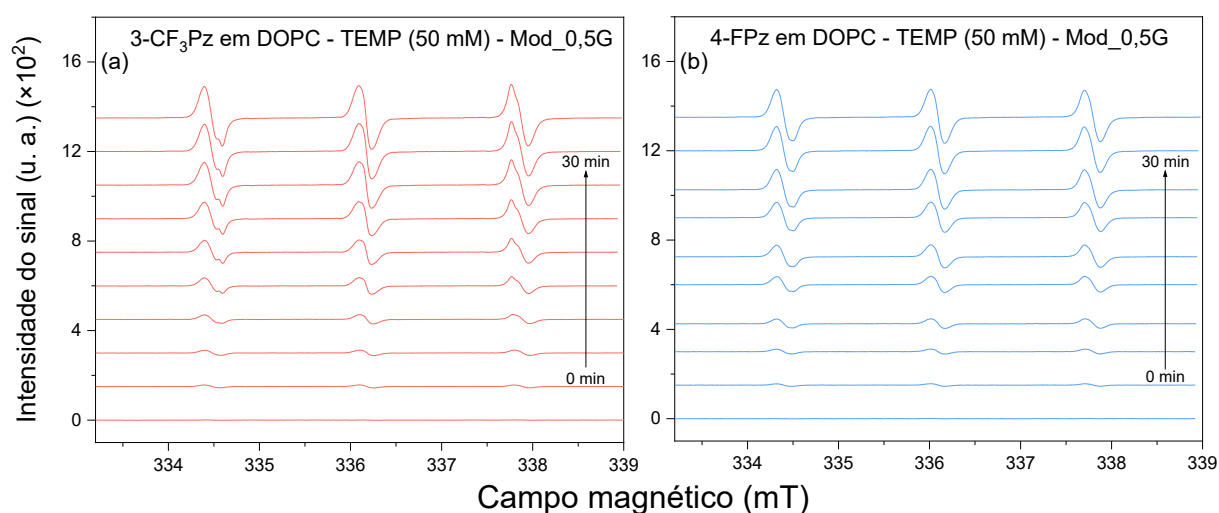


Figura 32 - Espectros de EPR a uma modulação de 0,5G obtidos com a sonda TEMP a 50 mM em sistema aquoso, evidenciando a geração de espécies reativas de oxigênio pelos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz carregados em vesículas de DMPC, ambas a 12,5 μM fotossensibilizadas por uma lâmpada LED com filtro vermelho (560 nm a 750 nm)..

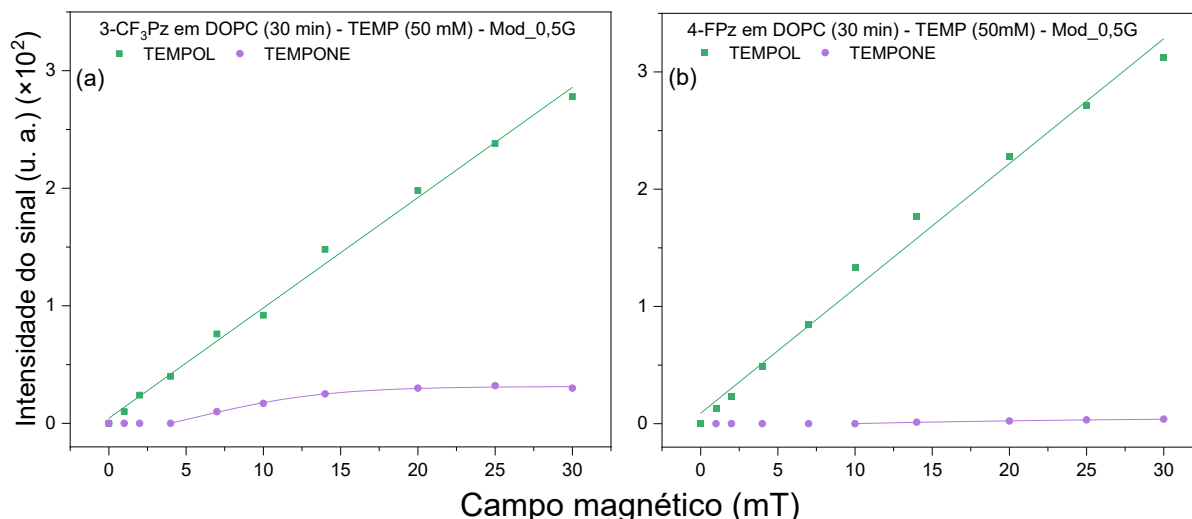


Figura 33 - Cinética da formação dos adutos TEMPOL e TEMPONE em sistema aquoso gerados pela fotossensibilização da suspensão lipídica de DOPC contendo a 3-CF₃Pz (a) e a 4-FPz (b). As linhas sólidas representam os ajustes dos dados experimentais.

Ao expressar os dados em termos cinéticos (Figura 33), nota-se novamente que a produção do TEMPOL segue uma tendência linear, enquanto o TEMPONE para a 3-CF₃Pz apresenta uma produção exponencial até que se torne quase contínuo entre os 20 a 30 minutos de fotossensibilização. Para a 4-FPz, a produção de TEMPONE é quase nula.

Por fim, os dados aqui apresentados, corroboram com a ideia de que, apesar da 4-FPz possuir uma tendência maior para a produção de ¹O₂ quando comparado a 3-CF₃Pz, essa diferença não aparenta ser o fator determinante para uma eficiência fotodinâmica elevada, como também não é a responsável pela diferença na eficiência destas Pzs. O mesmo comportamento foi observado para as demais espécies radicalares identificadas e caracterizadas em baixas concentrações em THF e nas suspensões lipossomais (dados não apresentados). Dessa forma, fica evidente que a produção direta de outras espécies reativas de oxigênio não é determinante para a ação destes fotossensibilizadores.

5.7 ENSAIOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS – ESI-MS

Tendo em vista a similaridade na capacidade de produção de EROs dos compostos, o estudo prosseguiu com a investigação voltada para a caracterização dos produtos de oxidação gerados após a fotossensibilização das Pzs carregadas em membrana. Sabendo que os lipídeos insaturados são passíveis de sofrer oxidação por reações do tipo I e tipo II com um FS, formando uma variedade de lipídeos oxidados,

realizou-se inicialmente um estudo prévio dos FS carregados em vesículas de lecitina de soja irradiadas por laser (648 nm). Alíquotas da suspensão lipossomal irradiada foram diluídas em metanol e injetadas diretamente no espectrômetro de massas. A Figura 34 mostra os espectros de massas registrados antes e após 30 minutos de irradiação de lipossomos contendo a 3-CF₃Pz como representativos.

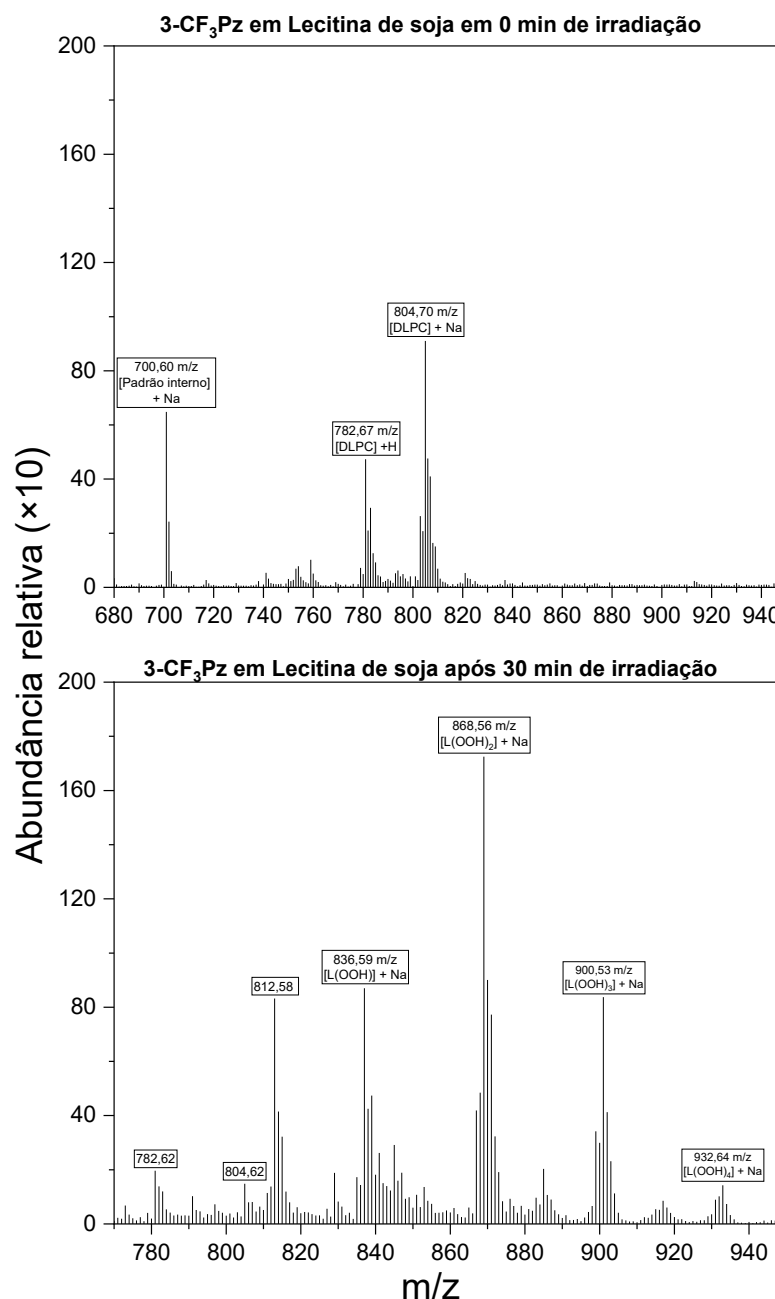


Figura 34 - Espectros de massas obtidos antes e após 30 minutos de fotossensibilização com laser (648 nm) do fotossensibilizador 3-CF₃Pz carregado em lecitina de soja. A análise evidencia a oxidação lipídica ao longo do tempo. O sinal de m/z 700,60 refere-se ao padrão interno utilizado para normalização.

Por se tratar de uma mistura lipídica, a lecitina de soja apresenta diversos sinais no espectro, entretanto, devido a presença do lipídeo 1,2-di-(9Z,12Z-octadecadienoil)-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC) na mistura, foi possível observar um sinal com valor de m/z igual a 782,67, referente à espécie $[M+H]^+$, e outro sinal referente ao aduto com íon sódio, representado pelo valor de m/z igual a 804,70, tendo em vista que a contaminação por sódio se torna bem comum para esse tipo de análise.⁸⁹

Contudo, após 30 minutos de irradiação, foi possível identificar um padrão de oxidação pouco discutido na literatura, onde o sinal lipídico do aduto de sódio (804,70 m/z) é acrescido de +32 Da de massa sucessivas vezes, resultando nos sinais de 836,59, 868,56, 900,53 e 932,57 m/z , sendo essa última produzida em baixas concentrações. Diante disso, todos os sinais apresentados foram correlacionados com o grau de hidroxidação lipídica, dado que, a massa do hidróperóxido gerado após a fotossensibilização dos compostos corresponde a +32 Da.

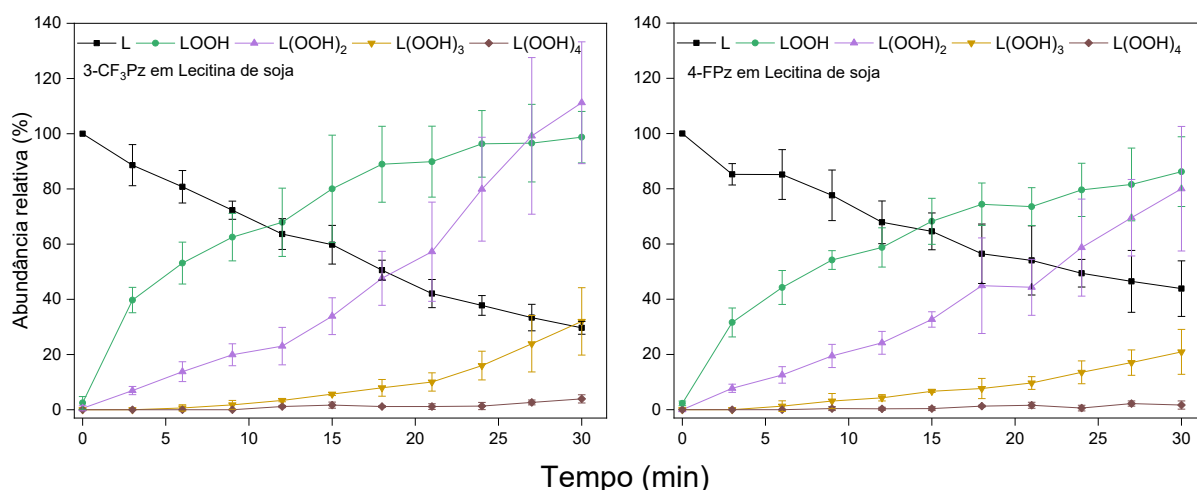


Figura 35 - Cinética da oxidação lipídica induzida por fotossensibilização da 3-CF₃Pz e 4-FPz carregada em lecitina de soja, obtida a partir da análise dos espectros de massas em diferentes tempos de irradiação. As barras de erro representam o desvio padrão entre o resultado obtidos entre as triplicatas do experimento.

Como ambas as Pzs apresentaram o mesmo padrão de hidroxidação, foi feito um estudo cinético semi-quantitativo por meio da determinação da abundância relativa das espécies formadas com uso de um lipídeo saturado (DMPC) como padrão interno. A Figura 35 mostra as cinéticas obtidas para ambas as Pzs. Observa-se que com o progresso da irradiação, o DLPC (L) é consumido para formar inicialmente a espécie LOOH e posteriormente as demais espécies com mais grupos hidróperóxido. Nota-se que a produção de LOOH é bastante rápida nos minutos iniciais, mas diminui

com o passar do tempo, indicando que essa espécie pode estar sendo consumida para a formação das demais. Não foi possível identificar, porém, uma diferença estatisticamente significativa na produção das 4 espécies oxidadas para ambas as Pzs. Além disso, não foi possível identificar outros sinais correspondentes aos demais produtos de oxidação esperados e discutidos na literatura, como lipídeos contendo grupos epóxido, cetona, aldeído e alcóxidos que pudessem justificar uma diferença de eficiência na permeabilização de membranas para ambas Pzs.

5.8 ENSAIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN

Recorreu-se à realização de ensaios utilizando-se a técnica de ^1H RMN a fim de identificar algum produto de fotooxidação não observado nos ensaios de massas discutidos anteriormente. Na imagem abaixo, Figura 36, é demonstrado o espectro de RMN obtido pela fotossensibilização da 3-CF₃Pz carregada em filme lipídico de lecitina de soja, utilizando-se o laser (648 nm) durante 5 e 10 minutos.

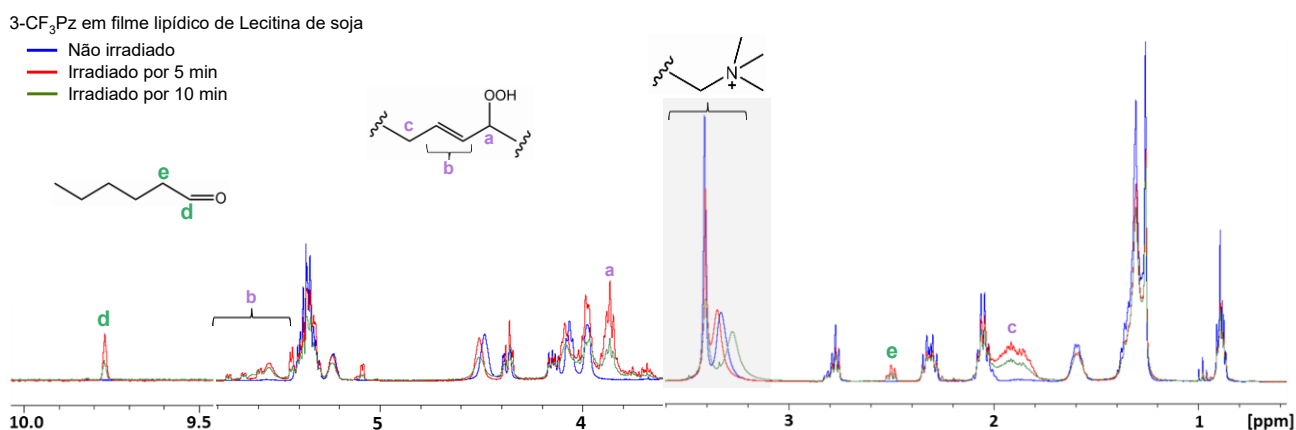


Figura 36 - Espectros de ^1H RMN, obtidos em campo de 400 MHz utilizando clorofórmio deuterado como solvente, demonstram a fotooxidação lipídica induzida por 3-CF₃Pz em filme lipídico após fotossensibilização por laser (648 nm). As regiões destacadas com as letras a–e correspondem a sinais característicos dos produtos de oxidação, como hidroperóxidos (a - c) e possível formação de aldeído (c–e).

Neste ensaio, foi possível observar novamente indícios de hidroxidação lipídica, levando em consideração o surgimento dos sinais entre 1,8 e 2,0; 3,6 e 4,0 e 5,5 e 5,8 ppm, caracterizados como sinais de hidrogênios ligados a carbonos próximos ao grupo hidroperóxido. Além disso, houve também o surgimento de dois sinais de baixa intensidade, o primeiro em 9,7 ppm e o outro em 2,3 ppm, podendo ser uma evidência acerca da formação de aldeídos lipídicos.

O mesmo experimento foi reproduzido para ambas as Pzs utilizando suspensões lipídicas, conforme demonstrado no (Apêndices N e O, Figuras Figura 60 e Figura 61), todavia, não foi possível identificar a presença dos sinais referentes a formação de aldeídos, assim como não foi possível observar nenhum sinal novo. Acredita-se que a ausência do sinal do aldeído lipídico pode estar correlacionada com a perda do produto devido ao método de extração e secagem utilizado após a fotossensibilização.

5.9 ENSAIOS DE DERIVATIZAÇÃO ANALISADOS NO CG-MS

Com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, não foi possível identificar outros produtos de oxidação lipídica, além de hidroperóxidos, devido provavelmente à baixa quantidade destes produtos de oxidação gerados após a fotossensibilização e a sua estabilidade nas condições de análise. Diante disso, decidiu-se realizar uma nova série de experimentos utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, em virtude de sua alta sensibilidade e capacidade de separação, o que viabiliza a obtenção de informações complementares às demais técnicas. A fotossensibilização foi realizada com laser em uma suspensão lipossomal de lecitina de soja, e os produtos foram posteriormente extraídos com uma mistura 50:50 de clorofórmio e metanol. Em seguida, esses produtos foram submetidos a um processo de derivatização com o objetivo de torná-los mais termicamente estáveis e voláteis.

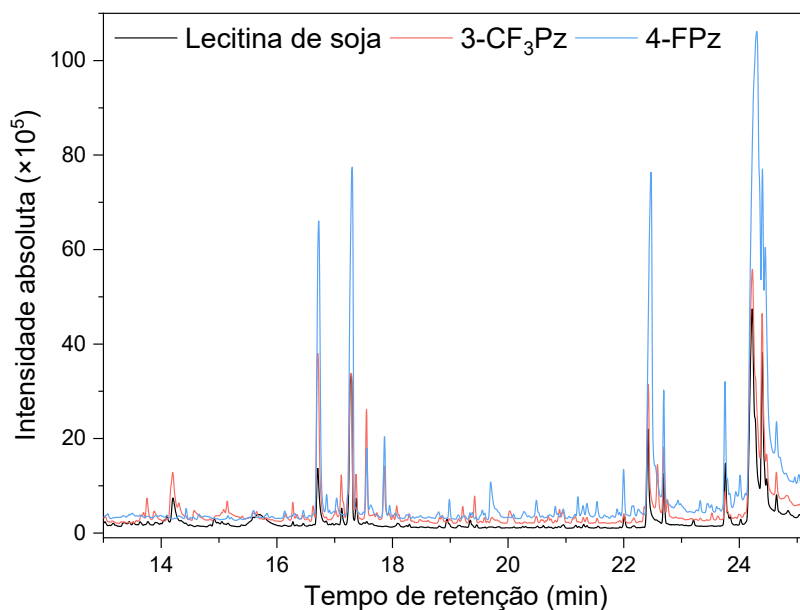


Figura 37 - Cromatograma comparativo entre o lipídio puro e os produtos formados após fotossensibilização da 3-CF₃Pz e 4-FPz, seguido de derivatização.

Conforme esperado, devido à baixa concentração dos produtos de oxidação gerados, o cromatograma obtido apresentou de forma majoritária um perfil equivalente para ambas as Pzs quando comparadas com o controle (vesículas lipídicas derivatizadas) (Figura 37). Contudo, ao observar alguns tempos de retenção específicos, torna-se evidente o surgimento de alguns sinais cujo perfil de fragmentação apresentado possui um alto grau de similaridade (>80%) com substâncias catalogadas na biblioteca do NIST. Restringindo o tempo de retenção entre 14 e 15 minutos, por exemplo, observa-se dois sinais de maior intensidade apresentados majoritariamente no sistema contendo a 3-CF₃Pz, sendo ambos os sinais referentes a aldeídos de cadeia curta (1 e 2 da Figura 38). Apesar da 4-FPz apresentar alguns pequenos sinais neste intervalo de tempo de retenção, o perfil de fragmentação gerado para eles não foi reconhecido pela biblioteca utilizada. Dessa maneira, é evidente a propensão da 3-CF₃Pz para a formação de aldeídos, característica que não é observada na 4-FPz.

correspondem a derivados de ácidos graxos e apesar destas espécies serem expressas nos demais sistemas, nota-se um aumento significativo de sua concentração no sistema contendo a 4-FPz. Sabe-se que em altas concentrações, ácidos graxos podem ser responsáveis pela permeabilização de membranas e induzir citotoxicidade,⁹⁰ contudo, até o presente momento, tal espécie ainda não foi relatada na literatura como um possível produto de fotooxidação lipídica por meio da ação de fotossensibilizadores.

Com base nos resultados obtidos, cria-se a hipótese de que a diferença na eficiência fotodinâmica desses compostos pode estar relacionada ao posicionamento dos fotossensibilizadores nas membranas, visto que, os produtos que distinguem ambas as Pzs são a formação de aldeídos lipídicos para a 3-CF₃Pz e a possível formação de ácidos graxos pela 4-FPz. Como a formação de aldeídos lipídicos são gerados a partir de reações do tipo I, conhecidos como contato-dependentes, supõe-se que a 3-CF₃Pz esteja de alguma forma mais próxima das insaturações lipídicas. Em contrapartida, para que haja a formação dos ácidos graxos, supõe-se algum tipo de interação da 4-FPz com a parte polar do lipídio.

Como forma de investigar se a localização desses compostos na bicamada lipídica influencia a produção de determinados produtos de oxidação observados nos experimentos anteriores, optou-se por realizar cálculos de dinâmica molecular em membranas contendo esses FS.

É válido ressaltar também que as propriedades redox destas duas Pzs são diferentes, devido ao efeito eletrônico induzido pelos seus substituintes, como já reportado em estudo prévio³⁹. O efeito mais retirador de elétrons do grupo CF₃ torna a 3-CF₃Pz mais propensa a se envolver em reações de abstração de elétrons de duplas ligações, justificando, em parte, sua maior eficiência na formação de lipídeos de cadeia curta, que são responsáveis pela permeabilização de membranas¹².

5.10 DINÂMICA MOLECULAR

Os processos de obtenção de dados por meio de cálculos teóricos iniciaram-se com a criação e minimização de energia do sistema, contendo o objeto de estudo. Estes objetos foram inseridos dentro de uma caixa, capaz de delimitar a posição nas quais as moléculas são inseridas. De forma geral, os artigos presentes na literatura costumam utilizar os algoritmos de membranas prontas, geradas e distribuídas pelo

programa CHARMM-GUI⁹¹⁻⁹⁵, desenvolvido e mantido por um grupo de pesquisadores da Universidade de Lehigh, em Bethlehem, Pennsylvania. Todavia, grande parte dessa literatura estuda e observa o comportamento de fármacos e fotossensibilizadores de acordo com sua capacidade de interagir e de se inserir nestas membranas lipídicas, o que acaba fugindo do escopo deste estudo. Como o intuito das simulações seria observar o comportamento dos FS carregados em membranas lipídicas, ou seja, que já se encontram inseridos na bicamada, viu-se um grau de complexidade maior ao tentar iniciar o estudo com a utilização destas bicamadas prontas acrescidas das Pzs. Dessa forma, optou-se por criar e adaptar a construção do objeto de estudo partindo do zero, obtendo as estruturas e parâmetros individuais para cada constituinte e, em seguida, juntando-os de acordo com a motivação do estudo.

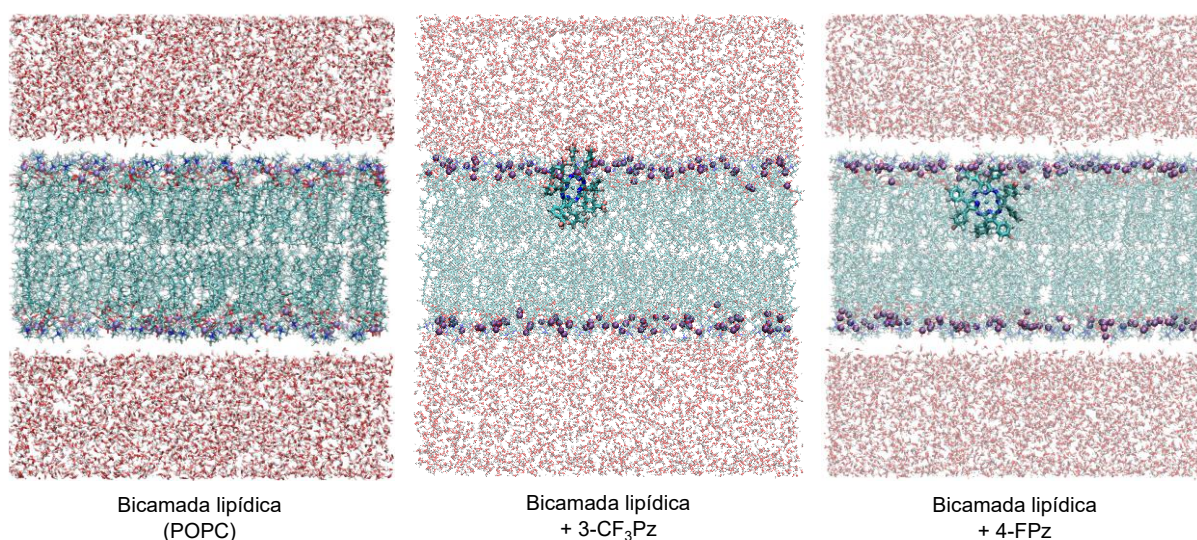


Figura 40 - Visualização inicial das membranas lipídicas construídas com o software Packmol, antes das suas respectivas equilibrações. (I) Bicamada lipídica pura (POPC), (II) bicamada contendo a 3-CF₃Pz, e (III) bicamada contendo a 4-FPz.

Optou-se inicialmente por trabalhar com três sistemas distintos: (i) constituído apenas pelas moléculas de lipídio e água, utilizado como referência; (ii) contendo as mesmas quantidades de lipídio e água, porém, acrescida de uma molécula da 3-CF₃Pz; e (iii) tal qual o anterior, variando apenas a molécula de FS para a 4-FPz, conforme demonstrado na Figura 40. A criação destas caixas foi realizada tal qual descrito no (Apêndice R). Após esse processo, verificou-se a estabilidade e comportamento do sistema ao longo do processo de otimização das estruturas e da minimização de energia livre, que seguiu os parâmetros demonstrados no Apêndice

S. Como forma de validação do método utilizado, os resultados de energia potencial, densidade e pressão do sistema foram comparados com o script gerado por o CHARMM-GUI para um sistema equivalente a bicamada lipídica pura. A energia potencial apresentada pelo sistema utilizado foi de $-3,64 \times 10^5$ kJ mol⁻¹ enquanto para a membrana gerada pelo CHARMM foi de $-3,50 \times 10^5$ kJ mol⁻¹. Dada a proximidade das energias e os demais parâmetros, pôde-se seguir com as simulações conforme os parâmetros descritos nos Apêndices T-X.

Com as simulações devidamente prontas, o sistema teve suas posições corrigidas de acordo com o centro de massa da bicamada lipídica, e a trajetória alinhada por todo o eixo z, utilizando-se de um parâmetro progressivo disposto pelo GROMACS que corrige a trajetória, frame a frame, considerando sempre o centro de massa da bicamada do frame anterior, diminuindo de forma geral a possibilidade de se gerar um artefato nas análises que se seguirem. Uma vez corrigido, o arquivo de saída torna-se um arcabouço para a extração de dados e a realização de inúmeras análises, dentre elas, a análise de densidade eletrônica. Esse ensaio traz consigo informações relevantes a respeito dos posicionamentos dos grupos constituintes da bicamada lipídica uma vez que, ao realizar o experimento, o algoritmo irá percorrer o eixo selecionado, dividindo-o em “fatias” e calculando a razão do número de elétrons do alvo analisado pela área. O resultado desse experimento é um gráfico tal qual o demonstrado na Figura 41.

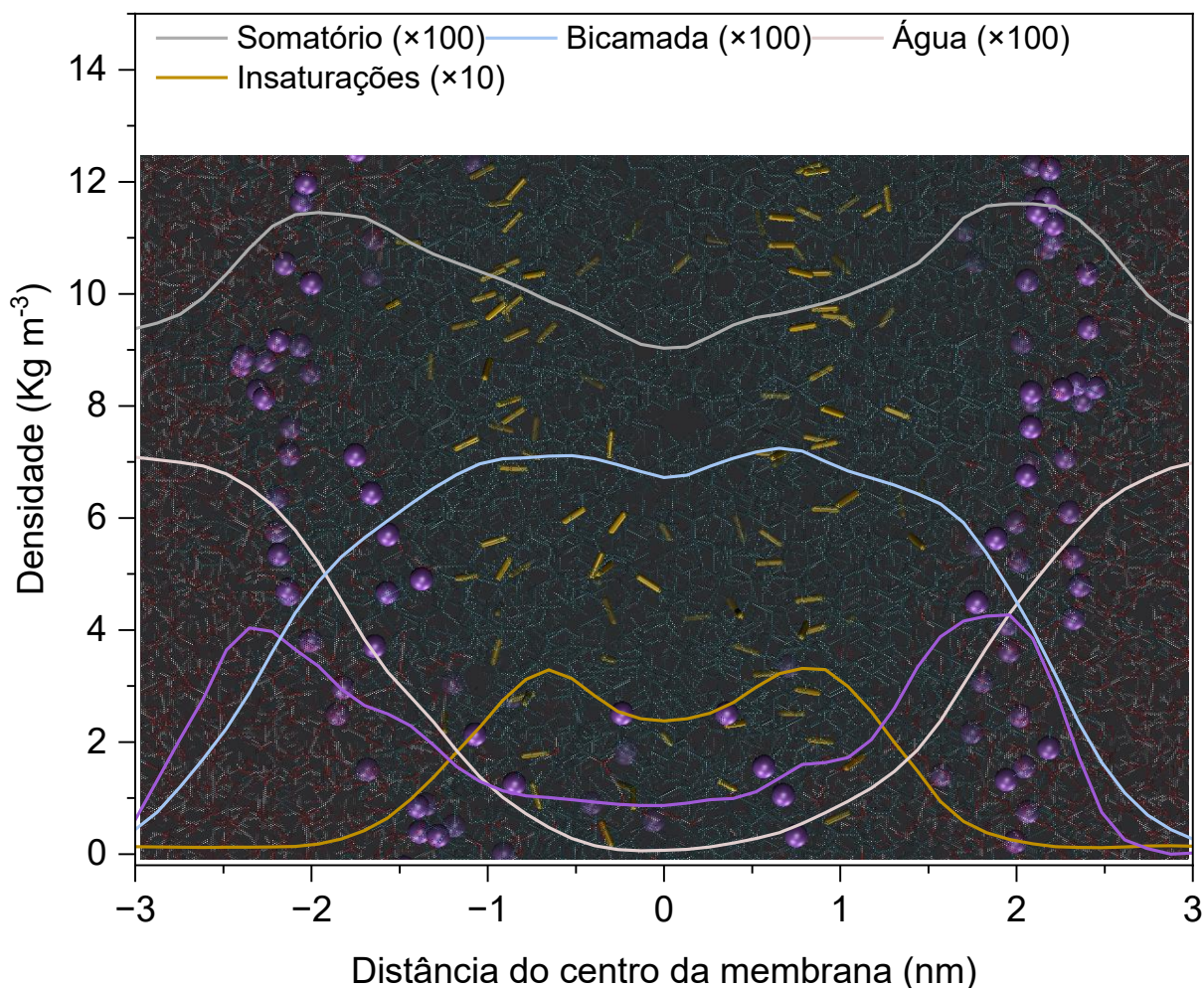


Figura 41 - Perfil de densidade eletrônica da bicamada lipídica pura ao longo do eixo normal à membrana (z). As curvas representam a densidade relativa a cada grupo específico da bicamada sendo as esferas de cor roxa, os grupos fosfato e as ligações destacadas em amarelo as insaturações lipídicas.

De acordo com os dados obtidos, o comportamento médio do sistema lipídico corresponde ao gráfico apresentado. Ao sobrepor um dos frames extraído da simulação com o gráfico, torna-se possível observar o posicionamento de algumas regiões de grupos específicos que constituem a membrana. Partindo do centro de massa dessa bicamada, representado por 0 nm, é possível delimitar algumas regiões de interesse, como por exemplo as insaturações lipídicas, entre 0,5 nm a 1 nm, a região hidrofílica dos lipídeos, representada pelo grupo fosfato aproximadamente entre 1,75 nm e 2,0 nm, e a região do solvente, com distância maior ou igual a 2,0 nm. Com isso, mudanças no perfil de densidade para os sistemas contendo FS ou outros fármacos dão informações sobre o posicionamento dessas moléculas na membrana.⁹⁶⁻⁹⁸

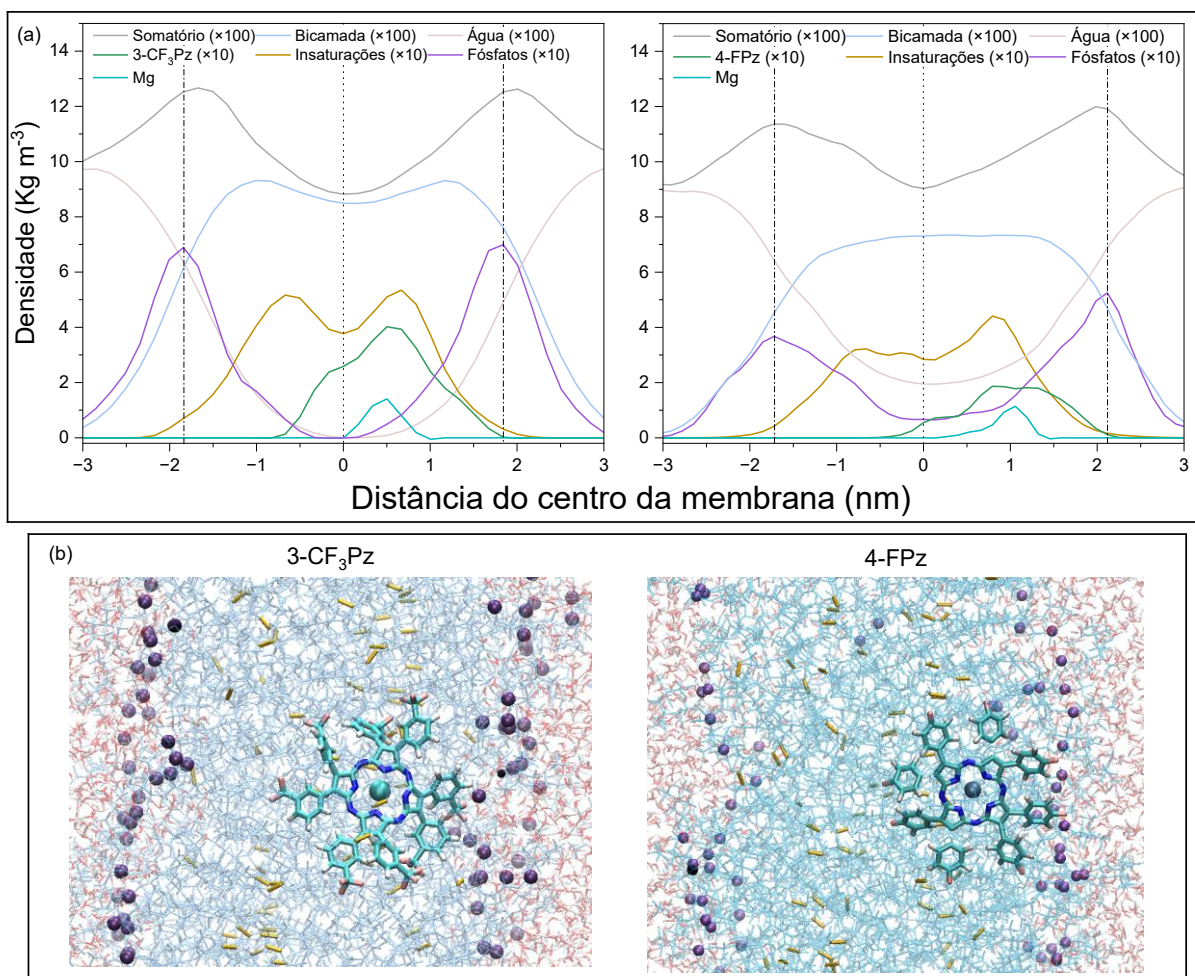


Figura 42 - (a) Perfis de densidade eletrônica ao longo do eixo normal à membrana (z) para sistemas com bicamadas constituídas apenas por POPC contendo 3-CF₃Pz e 4-FPz. (b) São mostradas representações estruturais de frames representativos extraídos da simulação, evidenciando a inserção e localização dos fotossensibilizadores nas bicamadas.

De acordo com as simulações realizadas para a bicamada lipídica contendo os FS, as insaturações se mantiveram com seu máximo de intensidade distribuídos na mesma região que a bicamada lipídica pura, contudo, os grupos fosforos apresentaram um leve deslocamento, juntamente com um estreitamento das bandas. Essas mudanças podem estar correlacionadas com o enrijecimento e organização dos lipídios na presença dos FS, onde a 3-CF₃Pz apresenta uma organização sistêmica maior demonstrando influência em ambos os lados do empacotamento lipídico, enquanto a 4-FPz induz uma mudança mais intensa apenas na camada em que está posicionada, gerando assim uma assimetria nos sinais. Ao introduzir a molécula de FS no sistema, torna-se possível inferir o quão distante ela encontra-se do centro de massa da bicamada. Pode-se observar na Figura 42 (a), portanto, que tanto a 3-CF₃Pz quanto a 4-FPz apresentam o seu máximo de densidade na região de 0,5 nm a 1,0 nm

aproximadamente, mesmo local em que se encontra a densidade eletrônica das insaturações lipídicas.

Uma vez feita essa análise inicial, observou-se que não havia grandes distinções no posicionamento entre as Pzs, com isso, seguiu-se o estudo buscando estimar se ao longo das simulações, algumas das Pzs possuíam uma propensão maior a se difundirem para o interior da membrana ou se aproximar mais da interface polar da bicamada. Para esse estudo, tomou-se como referencial para as Pzs o íon magnésio, presente no centro do macrociclo de cada um dos compostos, e dois grupos distintos da bicamada, sendo eles o grupo fosfato e o outro as insaturações lipídicas, todos eles selecionados de forma estratégica levando em consideração os resultados dos experimentos anteriores.

Os resultados obtidos originaram os gráficos apresentados pela Figura 43, onde é possível analisar a distância do Mg presente em cada uma das Pzs para cada um dos grupos comentados anteriormente, comparando a distância de ambos.

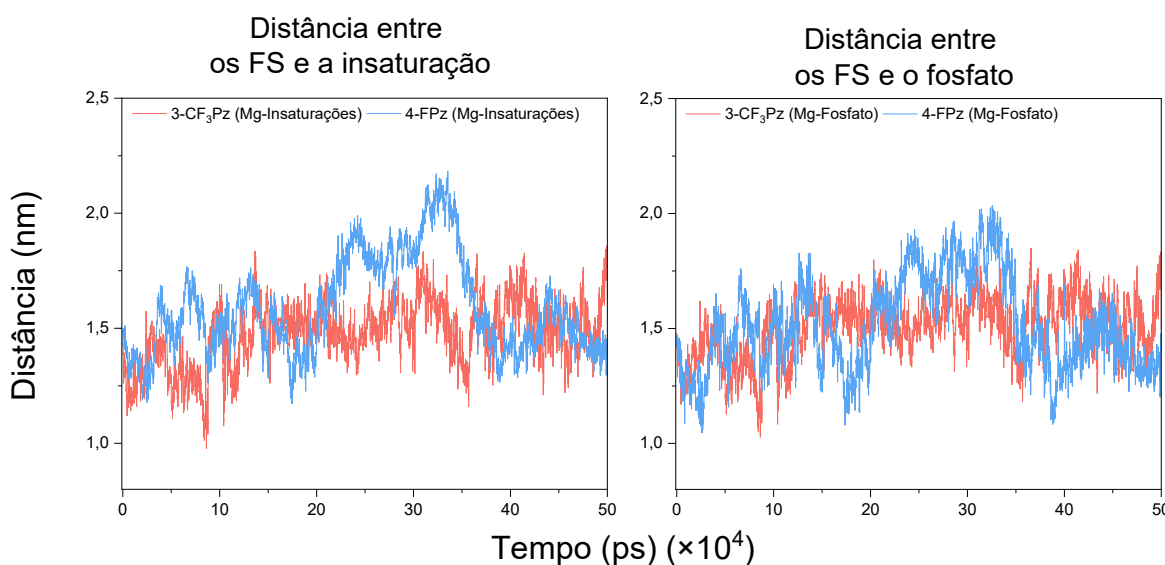


Figura 43 - Gráficos em que demonstram a média da distância entre o átomo de magnésio dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz e dois grupos distintos da bicamada lipídica na triplicada das simulações, constituídos apenas por POPC.

Com isso, observa-se que ao longo de 0,5 μ s de simulação, os valores comparativos de distância entre o Mg e os dois grupos viriam entre 1,0 nm até aproximadamente 2,2 nm. Desse modo, tendo em vista o grau de dispersão dos dados, é possível inferir que ambos os sistemas apresentam um comportamento bem

semelhante durante maior parte do tempo de simulação, indo de encontro ao que foi observado pelos gráficos de densidade eletrônica apresentados anteriormente.

Os dados obtidos não foram capazes de fornecer evidências suficientes para explicar as diferenças observadas nos experimentos de viabilidade celular e permeabilização de membrana para ambas as Pzs, tão pouco reforçaram a presença das espécies observadas no CG-MS. Nesse sentido, percebeu-se que, os aspectos analisados nesta dinâmica se detinham apenas a uma fração do processo de ação dos FS, mais especificamente o seu início. Decidiu-se então analisar novamente o sistema, considerando que a oxidação de alguns dos lipídios próximos aos fotossensibilizadores já tenham ocorrido, resultando na formação de lipídeos hidroperóxidos (LOOH).

Dessa forma, ao todo foram adicionadas 18 moléculas de lipídios hidroperoxidados na camada contendo o FS, valor que corresponde a 12,5% da quantidade total de lipídios, característico de uma oxidação avançada, porém, sem o risco de permear a membrana lipídica^{99,100}. Os resultados obtidos podem ser analisados por meio da Figura 44.

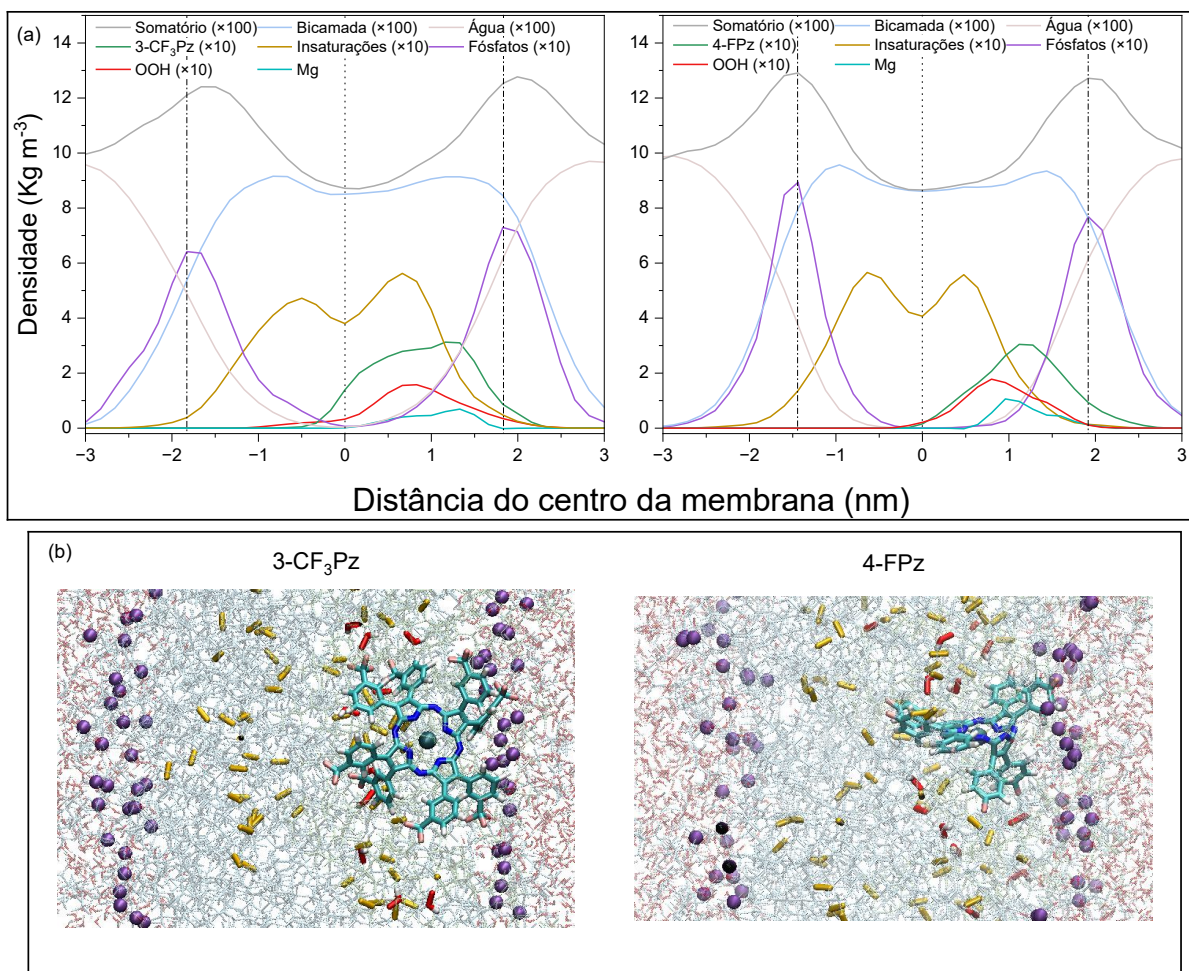


Figura 44 - (a) Perfis de densidade eletrônica ao longo do eixo normal à membrana (z) para sistemas com bicamadas de POPC mescladas a 18 moléculas de POPC hidroperoxidado contendo 3-CF₃Pz e 4-FPz. (b) São mostradas representações estruturais de frames representativos extraídos da simulação, evidenciando a inserção e localização dos fotossensibilizadores nas bicamadas.

Diferentemente do sistema anterior, ao olharmos para o gráfico de densidade da 3-CF₃Pz presente em (a), é possível identificar uma leve assimetria para as insaturações e para o grupo fosfato presente no lado em que o FS se encontra. Da mesma forma ao visualizar os dados apresentados para a 4-FPz, é possível perceber uma simetria maior para as insaturações quando comparado ao sistema 4-FPz não oxidado. Junto a isso observa-se um estreitamento na banda referente aos grupos fosfato, além de uma inversão em sua assimetria. Estas deformações originadas após a adição dos lipídios hidroperoxidados se traduzem em uma concentração maior da densidade das insaturações lipídicas para o sistema contendo a 3-CF₃Pz, enquanto o sistema contendo a 4-FPz demonstra um empacotamento lipídico mais compacto para a camada oposta ao FS, aumentando o grau de simetria entre as camadas. Além disso, é possível identificar que, o máximo de densidade eletrônica da 4-FPz encontra-

se mais distante do máximo de densidade correspondente as insaturações, o que não ocorreu para a 3-CF₃Pz.

Comparando as respectivas representações das Figura 43 e Figura 45, nota-se que após a hidroxidação lipídica, a 4-FPz demonstra uma conformação atípica apresentando um grau de torção visivelmente maior quando comparado a sua conformação em um sistema não oxidado. Junto a isso, observa-se também um deslocamento claro deste FS com relação à região na qual encontra-se as insaturações lipídicas e, conseqüentemente, a sua maior aproximação aos grupos fosfatos.

Diante disso, tal qual discutido anteriormente, realizou-se um ensaio de proximidade do íon magnésio aos grupos fosfato e insaturações ao longo do tempo, representado na Figura 45.

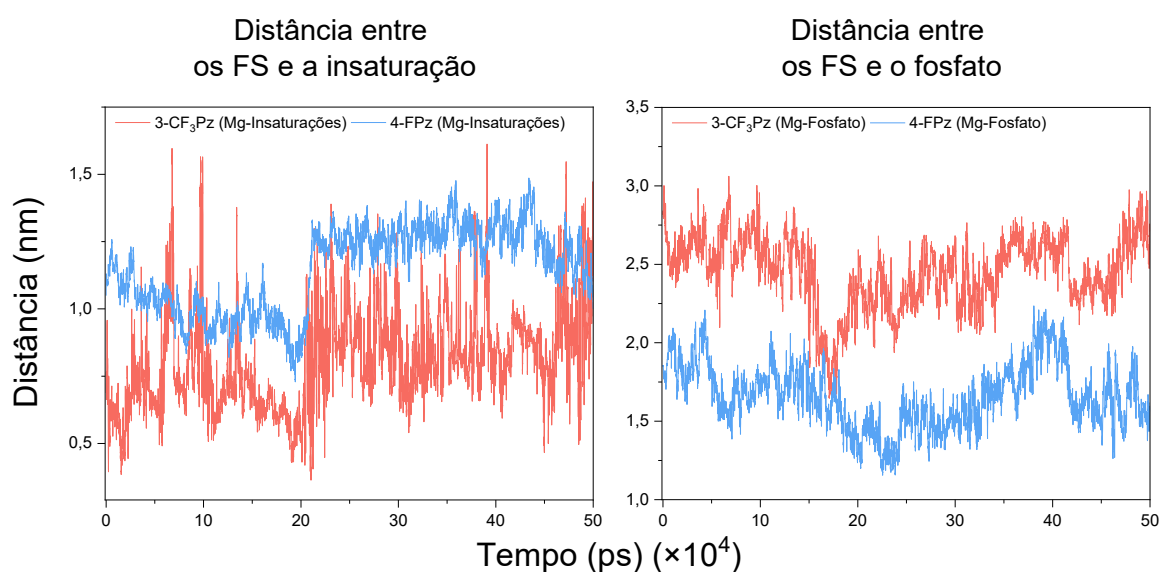


Figura 45 - Gráficos que demonstram a média de distância entre o átomo de magnésio dos fotossensibilizadores 3-CF₃Pz e 4-FPz e dois grupos distintos da bicamada lipídica na triplicada das simulações, constituídas por POPC junto a 18 moléculas de POPC hidroxidado.

Referente a 3-CF₃Pz, esta demonstra uma escala de variação distinta entre os compostos, sendo o par Mg-Insaturação variando entre distâncias inferiores a 0,5 nm até aproximadamente 1,5 nm. Por outro lado, as variações apresentadas para as distâncias observadas entre Mg-Fosfato variam em uma escala de 1,75 nm até valores aproximados de 3,0 nm. Em contrapartida, o sistema contendo a 4-FPz adota uma variação de 0,75 a 1,8 nm e 1,8 a 2,25 nm para os respectivos grupos. Comparando os dados ao contrapor as evidências obtidas para as Pzs em (b), torna-se evidente, o

comportamento adotado pelos fotossensibilizadores após a fotossensibilização lipídica. De acordo com o que foi observado, em um estado inicial, os comportamentos das Pzs se demonstram equivalentes, distinguindo-se entre si apenas pelo perfil de empacotamento gerado, o que poderia explicar uma distinção no nível de encapsulamento dos compostos, mas não estaria correlacionado com sua eficiência fotodinâmica.

No entanto, analisando os dados obtidos para ambos os FS, observa-se que a 3-CF₃Pz teria uma tendência maior a se difundir através da membrana lipídica de tal forma a se localizar mais próxima das insaturações (Apêndice P, Figura 62). Conseqüentemente, estaria em posição mais propícia para a realização de reações do tipo I, que são responsáveis pela geração de lipídios truncados, como aldeídos, que resultam na permeabilização de membranas. Já a 4-FPz, apresenta uma tendência maior ao se posicionar próximo dos grupos fosfatos da cabeça lipídica, o que poderia ser mais um indício da geração de ácidos graxos por intermédio da ação desse fotossensibilizador. Além disso, esses resultados podem explicar a maior intensidade dos adutos de algumas sondas utilizadas nas análises de EPR para a 4-FPz, dado a proximidade desse FS com a interface lipídio-água (Apêndice Q, Figura 63).

6. CONCLUSÕES

Duas porfirazinas, 3-CF₃Pz e 4-FPz, foram comparadas com relação à eficiência fotodinâmica em células tumorais e normais de pele *in vitro* e na capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e formação de determinados produtos de oxidação lipídica. Os experimentos fotoquímicos e fotofísicos realizados demonstraram não haver formação significativa de outras espécies de ERO's além do oxigênio singlete para ambas as Pzs. Já os ensaios de caracterização dos produtos de oxidação acompanhados por RMN e Espectrometria de massas mostraram majoritariamente a formação de lipídios hidroperoxidados para estes FS.

Contudo, apesar da 4-FPz demonstrar uma capacidade equivalente ou ainda maior em alguns sistemas para a produção de oxigênio singlete, reconhecida como espécie citotóxica chave na TFD, a eficiência fotodinâmica da 3-CF₃Pz foi bastante superior nas células tumorais. A provável causa desta diferença está na maior capacidade de vazamento de membrana pela 3-CF₃Pz, resultante da formação de lipídeos truncados, detectados nas medidas de CG-MS. Os resultados da dinâmica molecular fornecem indícios de que a formação destes lipídeos de cadeia curta pode ser favorecida pela difusão da 3-CF₃Pz para o interior da membrana após uma oxidação parcial dos lipídios presentes na bicamada pelo ¹O₂, ficando mais próximo das insaturações das cadeias lipídicas. Conforme reportado na literatura, reações de tipo I entre o FS e lipídeos insaturados produzem uma série de lipídeos oxidados, entre eles aldeídos lipídicos, que resultam na permeabilização de membranas. Nesse sentido, este estudo revela que, apesar da produção de ¹O₂ e outras EROs terem um papel importante no mecanismo de ação de FSs, o posicionamento destes compostos em membranas e o envolvimento em reações de transferência de elétrons com lipídeos insaturados são chave para o processo de vazamento destas membranas, que apresenta forte correlação com fototoxicidade celular. Dessa forma, os resultados deste trabalho permitirão desenhar fotossensibilizadores mais eficientes no âmbito da TFD.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A realização de um estudo teórico mais completo envolvendo cálculos DFT e variação dos grupos funcionais trariam uma elucidação maior para o trabalho e literatura, tendo em vista, a descoberta de um novo fator possivelmente eletrônico, que pode vir a contribuir com o desenvolvimento de futuros fotossensibilizadores. Além disto, ensaios de derivatização dos produtos de oxidação lipídica analisadas por cromatografia líquida e uma matriz lipídica mais pura poderiam elucidar melhor os produtos de fotooxidação gerados. Por fim, a realização de ensaios de espectroscopia de infravermelho pode servir como fonte de dados que corroborariam com os resultados obtidos via LC-MS, para determinação de certos produtos de oxidação lipídica.

REFERÊNCIAS

1. ROSENBERG, Barnett; VAN CAMP, Loretta; KRIGAS, Thomas. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.
2. DOUGHERTY, Thomas J. Activated dyes as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 52, n. 4, p. 1333-1336, 1974.
3. HAKLI, Özgül *et al.* Photodynamic anti-inflammatory activity of meso-aryl substituted porphyrin derivative on mammalian macrophages. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 45, p. 103922, 2024.
4. WANG, Peiru *et al.* Clinical practice Guidelines for 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy for acne vulgaris in China. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 41, p. 103261, 2023.
5. CHEN, Dapeng *et al.* Type I photosensitizers revitalizing photodynamic oncotherapy. *Small*, v. 17, n. 31, p. 2006742, 2021.
6. LI, Xinying *et al.* Efficacy and safety of ALA-PDT in treatment of diabetic foot ulcer with infection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 38, p. 102822, 2022.
7. VAN DIJK, Elon HC *et al.* Photodynamic therapy for chorioretinal diseases: a practical approach. *Ophthalmology and therapy*, v. 9, n. 2, p. 329-342, 2020.
8. KHAN, Shakir *et al.* Inhibition of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*: Nanoparticles induced photoinactivation in presence of efflux pump inhibitor. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 157, p. 165-174, 2020.
9. LIU, Jian *et al.* Near-infrared light-mediated CuS@Rutin nanocomposites for the PTT/PDT synergistic treatment in bacterial infections. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 133, p. 345-354, 2024.
10. WANG, Jun *et al.* Europium-and black phosphorus-functionalized porphyrin as an L-arginine sensor and L-arginine-activated PDT/PTT agent for bacterial treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 15, n. 35, p. 41861-41869, 2023.

11. XU, Tao *et al.* Quaternary ammonium cations conjugated 5,15-diaryltetranaphtho[2, 3] porphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 267, p. 116228, 2024.
12. REZENDE, Laura G. *et al.* Assessing photosensitized membrane damage: available tools and comprehensive mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, v. 98, n. 3, p. 572-590, 2022.
13. BARTUSIK-AEBISHER, Dorota *et al.* Photosensitizers for photodynamic therapy of brain cancers—a review. *Brain Sciences*, v. 13, n. 9, p. 1299, 2023.
14. TERRA-GARCIA, Maíra *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy with Fotoenticine on *Streptococcus mutans* isolated from dental caries. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 34, p. 102303, 2021.
15. HOLZER, Mike P. *et al.* Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of corneal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 44, n. 7, p. 2954-2958, 2003.
16. YANG, Yuanyuan *et al.* Light-activatable liposomes for repetitive on-demand drug release and immunopotential in hypoxic tumor therapy. *Biomaterials*, v. 265, p. 120456, 2021.
17. MIZUNO, Mika *et al.* Efficacy of 5-aminolevulinic acid and LED photodynamic therapy in cervical intraepithelial neoplasia: A clinical trial. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 32, p. 102004, 2020.
18. TAKEUCHI, Yasuo *et al.* Application of different wavelengths of LED lights in antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontal disease. *Antibiotics*, v. 12, n. 12, p. 1676, 2023.
19. ZHAROVA, T. A. *et al.* Correlation of synovial caspase-3 concentration and the photodynamic effectiveness in osteoarthritis treatment. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 30, p. 101669, 2020.
20. ALLISON, Ron R.; SIBATA, Claudio H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 7, n. 2, p. 61-75, 2010.
21. PARKER, Joseph. Organ evolution: emergence of multicellular function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 40, 2024.

22. SKLAR, Lindsay R. *et al.* Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 12, n. 1, p. 54-64, 2013.
23. VAN STRATEN, Demian *et al.* Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.
24. ALLISON, Ron R.; SIBATA, Claudio H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 7, n. 2, p. 61-75, 2010.
25. AGOSTINIS, Patrizia *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
26. MEREDITH, Paul; SARNA, Tadeusz. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment cell research*, v. 19, n. 6, p. 572-594, 2006.
27. LOMBARD, Jonathan. Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology direct*, v. 9, n. 1, p. 32, 2014.
28. MORITA, Shin-ya; IKEDA, Yoshito. Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemical pharmacology*, v. 206, p. 115296, 2022.
29. DE VISSER, Sam P. *et al.* What factors affect the regioselectivity of oxidation by cytochrome P450? A DFT study of allylic hydroxylation and double bond epoxidation in a model reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 39, p. 11809-11826, 2002.
30. BACELLAR, Isabel OL *et al.* Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 30, p. 9606-9615, 2018.
31. LARGE, Danielle E *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced drug delivery reviews*, v. 176, p. 113851, 2021.
32. SHAH, Nimit *et al.* A Physiochemical, In Vitro, and In Vivo Comparative Analysis of Verteporfin–Lipid Conjugate Formulations: Solid Lipid Nanoparticles and Liposomes. *ACS Applied Bio Materials*, v. 7, n. 7, p. 4427-4441, 2024.

33. FAHMY, Sherif Ashraf; AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said; SCHAEFER, Jens. Liposome photosensitizer formulations for effective cancer photodynamic therapy. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 9, p. 1345, 2021.
34. FUCHTER, Matthew J *et al.* Porphyrazines: Designer macrocycles by peripheral substituent change. *Australian Journal of Chemistry*, v. 61, n. 4, p. 235-255, 2008.
35. CORREIA, José H *et al.* Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 9, p. 1332, 2021.
36. QUAYE, Maxwell B.; OBAID, Girgis. Recent strides in macromolecular targeted photodynamic therapy for cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 81, p. 102497, 2024.
37. KOPRANENKOV, V N.; LUK'YANETS, E. A. Porphyrazines: synthesis, properties, application. *Russian chemical bulletin*, v. 44, n. 12, p. 2216-2232, 1995.
38. THAKUR, Maheshwar S. *et al.* Metal coordinated macrocyclic complexes in different chemical transformations. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 471, p. 214739, 2022.
39. TASSO, Thiago T. *et al.* Photobleaching efficiency parallels the enhancement of membrane damage for porphyrazine photosensitizers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, n. 39, p. 15547-15556, 2019.
40. GASSMAN, P. G. Substituents effects in porphyrazines and phthalocyanines. *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, p. 1932-1940, 1994.
41. PISKORZ, Jaroslaw *et al.* Diazepinoporphyrazines containing peripheral styryl substituents and their promising nanomolar photodynamic activity against oral cancer cells in liposomal formulations. *ChemMedChem*, v. 9, n. 8, p. 1775- 1782, 2014.
42. BALALAEVA, Irina V. *et al.* Cyanoarylporphyrazines with high viscosity sensitivity: a step towards dosimetry-assisted photodynamic cancer treatment. *Molecules*, v. 26, n. 19, p. 5816, 2021.
43. SKUPIN-MRUGALSKA, Paulina *et al.* Cationic porphyrazines with morpholinoethyl substituents—Syntheses, optical properties, and photocytotoxicities. *Dyes and Pigments*, v. 197, p. 109937, 2022.

44. MLYNARCZYK, Dariusz T. *et al.* S-seco-porphyrzine as a new member of the seco-porphyrzine family—Synthesis, characterization and photocytotoxicity against cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, v. 96, p. 103634, 2020.
45. PISKORZ, Jaroslaw *et al.* Liposomal formulations of magnesium sulfanyl tribenzoporphyrzines for the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 184, p. 34-41, 2018.
46. BANGHAM, Alec D.; STANDISH, Malcolm M.; WATKINS, Jeff C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, v. 13, n. 1, p. 238-IN27, 1965.
47. PINHEIRO, Pedro A. *et al.* Modulating the phototoxicity and selectivity of a porphyrzine towards epidermal tumor cells by coordination with metal ions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 23, n. 9, p. 1757-1769, 2024.
48. TASSO, Thiago T. *et al.* Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Transactions*, v. 46, n. 33, p. 11037-11045, 2017.
49. WANG, Yue *et al.* Singlet oxygen: Properties, generation, detection, and environmental applications. *Journal of hazardous materials*, v. 461, p. 132538, 2024.
50. YOUNIS, Muhammad R *et al.* Inorganic nanomaterials with intrinsic singlet oxygen generation for photodynamic therapy. *Advanced Science*, v. 8, n. 21, p. 2102587, 2021.
51. NONELL, Santi; FLORS, Cristina (Ed.). Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. *Royal Society of Chemistry*, v.1, 2016.
52. STREIT, Gustavo Wander *et al.* Enhanced fluorescence emission or singlet oxygen production of cationic porphyrzines and porphyrins through combination with carbon dots. *Photochemistry and Photobiology*, 2025.
53. STREIT, Gustavo Wander *et al.* Structurally similar porphyrins and porphyrzines perform differently under green or red light irradiation against non-melanoma skin tumor cells. *Dyes and Pigments*, v. 233, p. 112527, 2025.
54. BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

55. MARTÍNEZ, Leandro et al. PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of computational chemistry*, v. 30, n. 13, p. 2157-2164, 2009.
56. MARRINK, Siewert-Jan et al. Adhesion forces of lipids in a phospholipid membrane studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, v. 74, n. 2, p. 931-943, 1998.
57. HARDER, Edward et al. OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. *Journal of chemical theory and computation*, v. 12, n. 1, p. 281-296, 2016.
58. Abraham M, et al. GROMACS 2024.3 Manual (2024.3). Published online 2024.
59. PARRINELLO, Michele; RAHMAN, Aneesur. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*, v. 52, n. 12, p. 7182-7190, 1981.
60. DARDEN, Tom et al. Particle mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems. *Journal of chemical physics*, v. 98, p. 10089-10089, 1993.
61. VERLET, Loup. Computer" experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physical review*, v. 159, n. 1, p. 98, 1967.
62. POSTE, George; PAPAHAADJOPOULOS, Demetrios. Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: influence of vesicle lipid composition on mechanism (s) of vesicle incorporation into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 73, n. 5, p. 1603-1607, 1976.
63. ZENG, Jialiu et al. Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. *Journal of life sciences*, v. 2, n. 4, p. 25, 2020.
64. NIELSEN, Josefine Eilsø; LUND, Reidar. Molecular transport and growth of lipid vesicles exposed to antimicrobial peptides. *Langmuir*, v. 38, n. 1, p. 374- 384, 2021.
65. CASTANO, Ana P et al. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.
66. LI, Chun Hong et al. Precise delivery of ricin A-chain and photosensitizer by aptamer-functionalized liposome for targeted chemo-photodynamic synergistic therapy. *ACS Materials Letters*, v. 6, n. 5, p. 2050-2058, 2024.

67. TSUBONE, Tayana Mazin *et al.* Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 6734, 2017.
68. BACELLAR, Isabel OL *et al.* Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, 2015.
69. JIANG, Wenqi *et al.* The current status of photodynamic therapy in cancer treatment. *Cancers*, v. 15, n. 3, p. 585, 2023.
70. MARTINS, Waleska K *et al.* Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. *Autophagy*, v. 15, n. 2, p. 259-279, 2019.
71. NEIKIRK, Kit *et al.* MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. *European journal of cell biology*, v. 102, n. 4, p. 151371, 2023.
72. CHAZOTTE, Brad. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2011, n. 8, p. pdb. prot5648, 2011.
73. XIAO, Bin *et al.* Flow cytometry-based assessment of mitophagy using MitoTracker. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 10, p. 76, 2016.
74. BERTMAN, Ketii Assor *et al.* A fluorescent flavonoid for lysosome detection in live cells under “wash free” conditions. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 6, n. 31, p. 5050-5058, 2018.
75. ZHITOMIRSKY, Benny; FARBER, Hodaya; ASSARAF, Yehuda G. LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 22, n. 4, p. 2131-2141, 2018.
76. LESIAK, Lauren *et al.* A bright, photostable, and far-red dye that enables multicolor, time-lapse, and super-resolution imaging of acidic organelles. *ACS Central Science*, v. 10, n. 1, p. 19-27, 2023.
77. TOMAS, Alejandra; MOSS, Stephen E. Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 22, p. 20210-20216, 2003.
78. CHAMPA, Devora *et al.* Obatoclax kills anaplastic thyroid cancer cells by inducing lysosome neutralization and necrosis. *Oncotarget*, v. 7, n. 23, p. 34453, 2016.

79. CAZIN, Bernadette; AUBRY, Jean-Marie; RIGAUDY, Jean. Is water the best or the worst solvent for [2+ 4] cycloadditions of singlet oxygen to aromatic compounds?. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 12, p. 952-953, 1986.
80. DAVIS, Caroline A.; MCNEILL, Kristopher; JANSSEN, Elisabeth M.-L. Non-singlet oxygen kinetic solvent isotope effects in aquatic photochemistry. *Environmental science & technology*, v. 52, n. 17, p. 9908- 9916, 2018.
81. WANG, Yue *et al.* Singlet oxygen: Properties, generation, detection, and environmental applications. *Journal of hazardous materials*, v. 461, p. 132538, 2024.
82. SALOKHIDDINOV, K. I.; BYTEVA, I. M.; GURINOVICH, G. P. Lifetime of singlet oxygen in various solvents. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 34, n. 5, p. 561-564, 1981.
83. AL-NU'AIRAT, Jomana *et al.* Review of chemical reactivity of singlet oxygen with organic fuels and contaminants. *The Chemical Record*, v. 21, n. 2, p. 315- 342, 2021.
84. LEE, Plato CC; RODGERS, Michael AJ. Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochemistry and photobiology*, v. 45, n. 1, p. 79-86, 1987.
85. DZWIGAJ, Stanislaw; PEZERAT, Henri. Singlet oxygen-trapping reaction as a method of 1O_2 detection: role of some reducing agents. *Free radical research*, v. 23, n. 2, p. 103-115, 1995.
86. MAKINO, Keisuke; HAGIWARA, Takuya; MURAKAMI, Akira. A mini review: Fundamental aspects of spin trapping with DMPO. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, v. 37, n. 5-6, p. 657-665, 1991.
87. BILSKI, P. *et al.* Oxidation of the spin trap 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide by singlet oxygen in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, v. 118, n. 6, p. 1330-1338, 1996.
88. CAMMACK, Richard. EPR Spectroscopy: General Principles. In: *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 695-706.

89. COSTALUNGA, Riccardo *et al.* Sodium adduct formation with graph-based machine learning can aid structural elucidation in non-targeted LC/ESI/HRMS. *Analytica Chimica Acta*, v. 1204, p. 339402, 2022.
90. AROURI, Ahmad; MOURITSEN, Ole G. Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. *Progress in lipid research*, v. 52, n. 1, p. 130-140, 2013.
91. GEE, Stephen *et al.* CHARMM-GUI membrane builder for lipid droplet modeling and simulation. *ChemPlusChem*, v. 89, n. 8, p. e202400013, 2024.
92. LARSEN, Andreas Haahr. Molecular dynamics simulations of curved lipid membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 15, p. 8098, 2022.
93. MARTENS, Chloe *et al.* Integrating hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry with molecular dynamics simulations to probe lipid-modulated conformational changes in membrane proteins. *Nature protocols*, v. 14, n. 11, p. 3183-3204, 2019.
94. IBRAHIM, Mahmoud AA *et al.* In-Silico mining of the toxins database (T3DB) towards hunting prospective candidates as ABCB1 inhibitors: Integrated molecular docking and lipid bilayer-enhanced molecular dynamics study. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 7, p. 1019, 2023.
95. SMITH, David J., *et al.* Simulation best practices for lipid membranes. *Living journal of computational molecular science*, v. 1, n. 1, p. 5966, 2019.
96. PODLOUCKÁ, Pavlína *et al.* Lipid bilayer membrane affinity rationalizes inhibition of lipid peroxidation by a natural lignan antioxidant. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 117, n. 17, p. 5043-5049, 2013.
97. FABRE, Gabin *et al.* Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*, v. 51, n. 36, p. 7713-7716, 2015.
98. FABRE, Gabin *et al.* Lipocarbazole, an efficient lipid peroxidation inhibitor anchored in the membrane. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 15, p. 4866-4870, 2015.
99. YANG, Hong *et al.* Effects of low-level lipid peroxidation on the permeability of nitroaromatic molecules across a membrane: a computational study. *ACS omega*, v. 5, n. 10, p. 4798-4806, 2020.

100. DE ROSA, Raffaella; SPINOZZI, Francesco; ITRI, Rosangela. Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1860, n. 11, p. 2299-2307, 2018.

APÊNDICE

Apêndice A - Estrutura dos marcadores utilizados no experimento de dano subcelular.

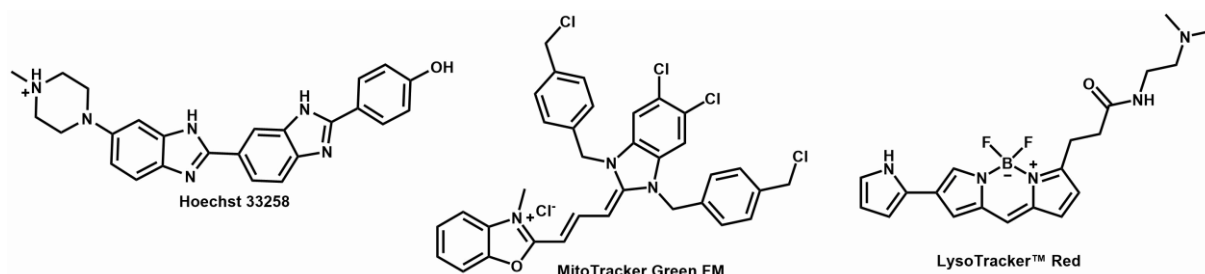


Figura 46 - Estrutura dos marcadores utilizados no experimento de dano subcelular.

Apêndice B - Visão ampla das marcações para o grupo controle da linhagem celular HaCaT.

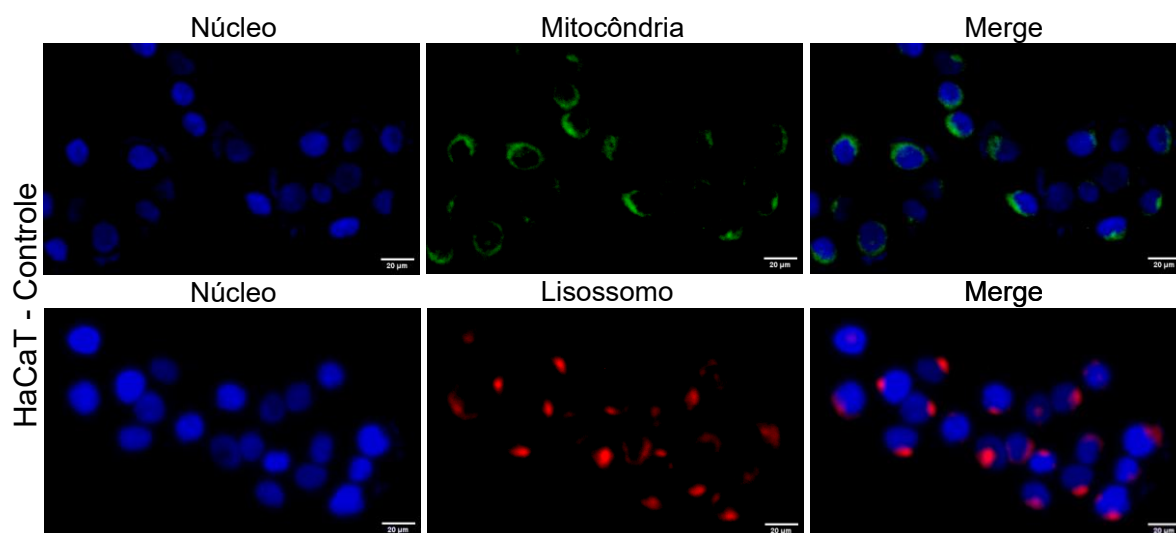


Figura 47 - Microscopia de fluorescência demonstrando uma visão expandida das marcações no grupo controle da linhagem de células normais HaCaT.

Apêndice C - Visão ampla das marcações para o grupo não irradiado contendo a 3-CF₃Pz e a 4-FPz junto a linhagem celular HaCaT.

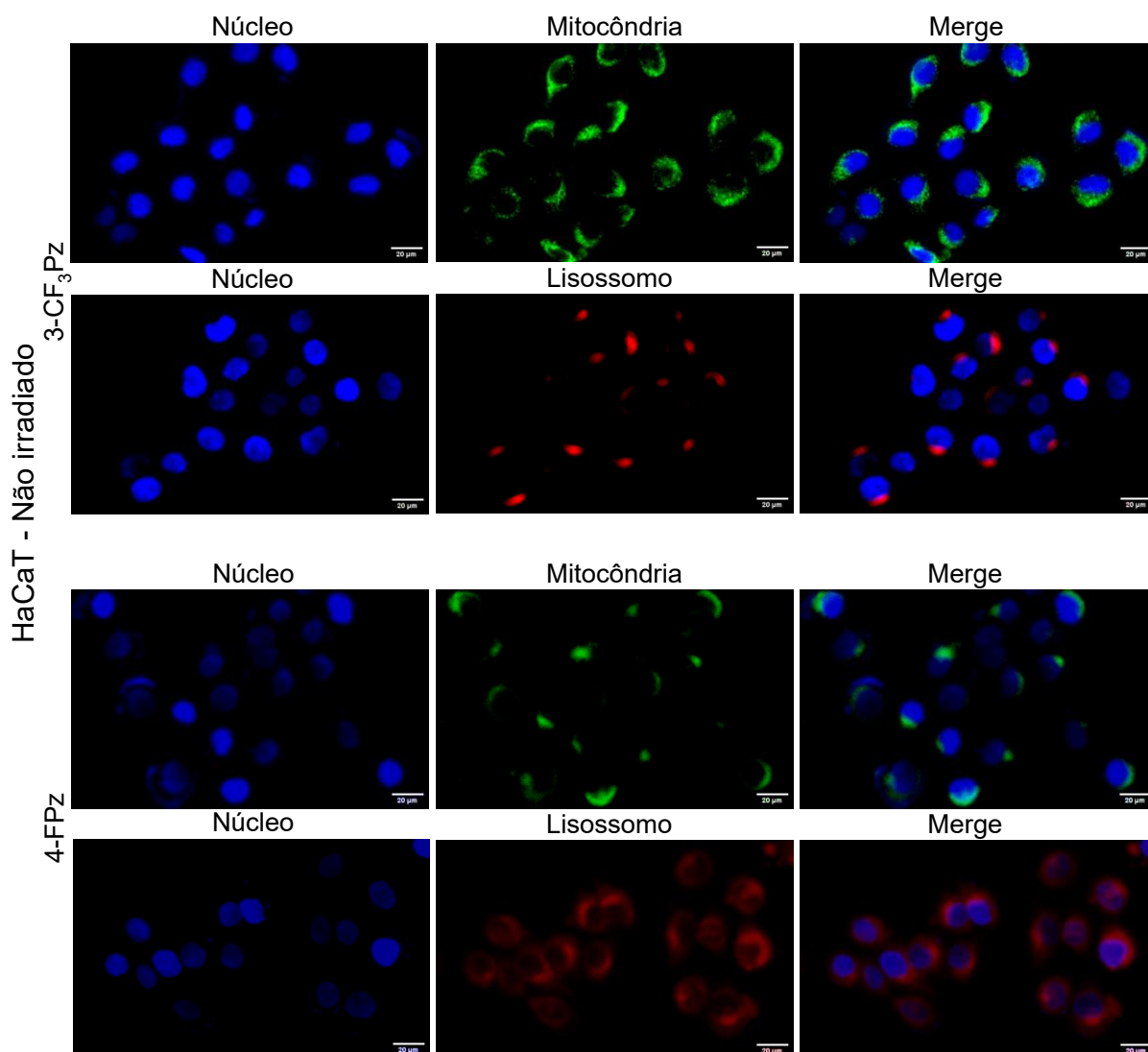


Figura 48 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células normais HaCaT tratados a 1 μM.

Apêndice D - Visão ampla das marcações para o grupo irradiado contendo a 3-CF₃Pz e a 4-FPz junto a linhagem celular HaCaT.

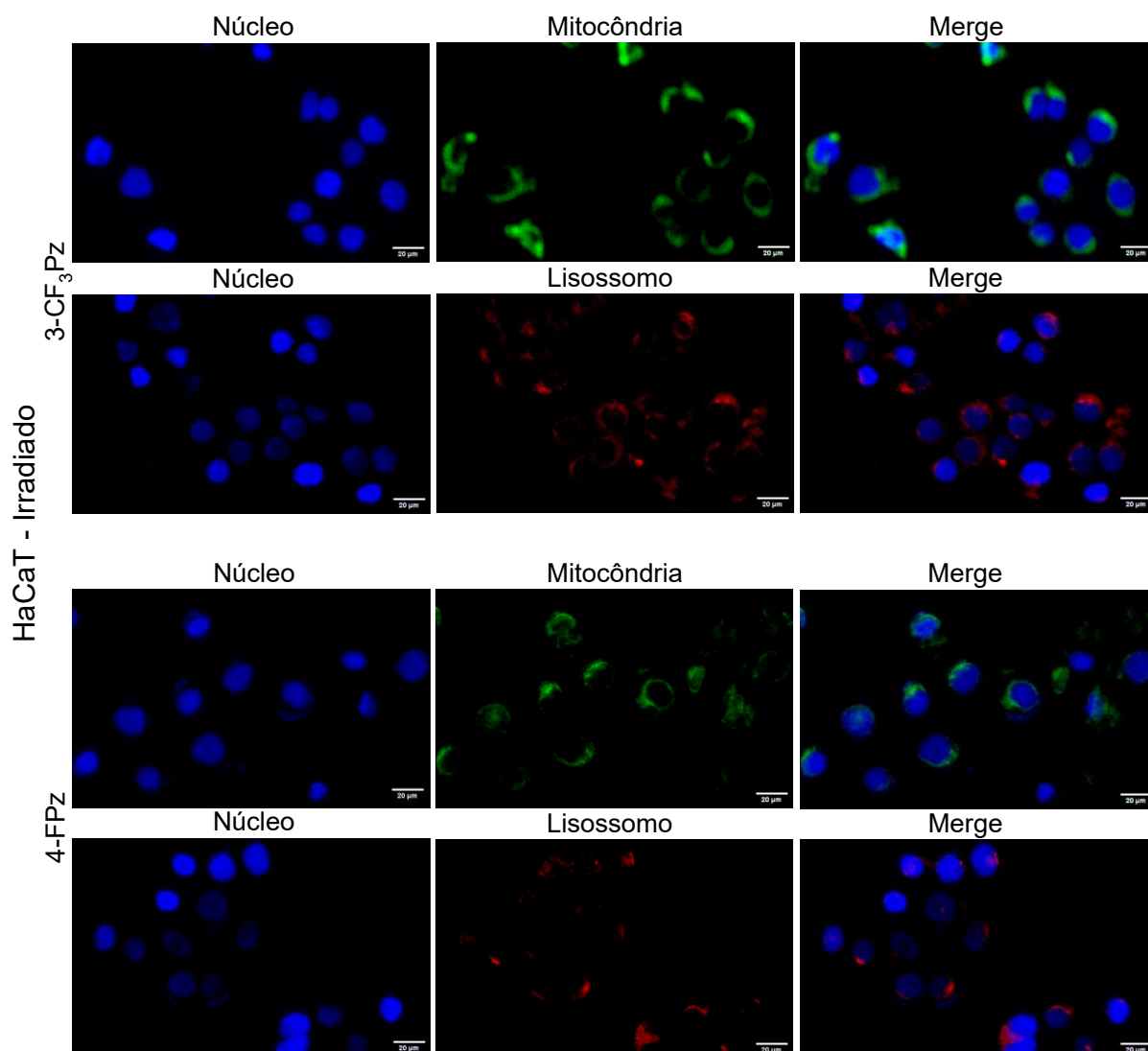


Figura 49 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, irradiados, na linhagem de células normais HaCaT tratados a 1 µM.

Apêndice E - Visão ampla das marcações para o grupo controle da linhagem celular A431.

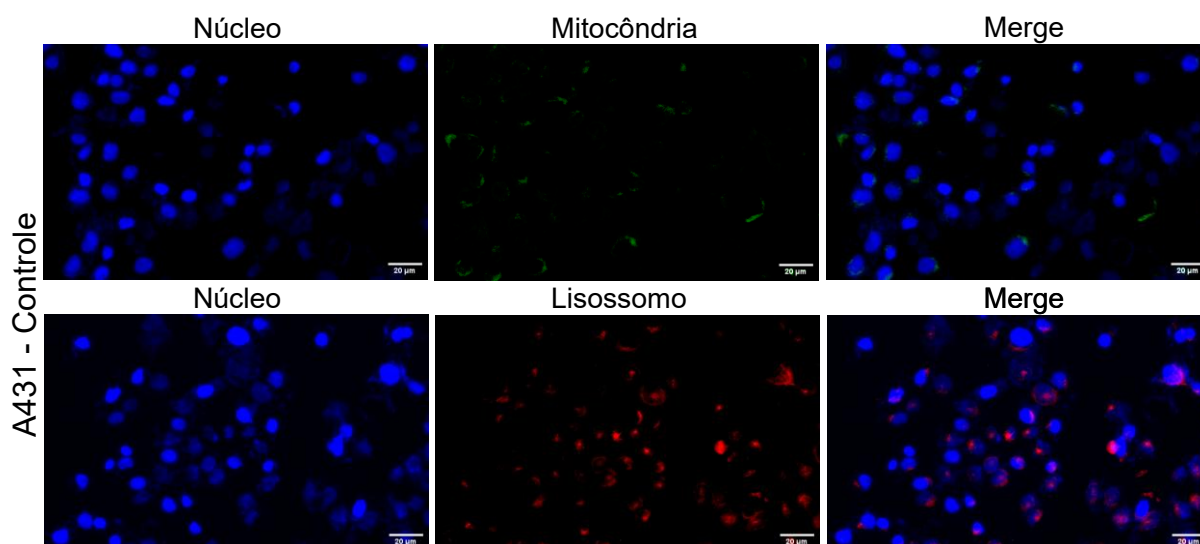


Figura 50 - Microscopia de fluorescência demonstrando uma visão expandida das marcações no grupo controle da linhagem de células cancerosas A431.

Apêndice F - Visão ampla das marcações para o grupo não irradiado contendo a 3-CF₃Pz e a 4-FPz junto a linhagem celular A431.

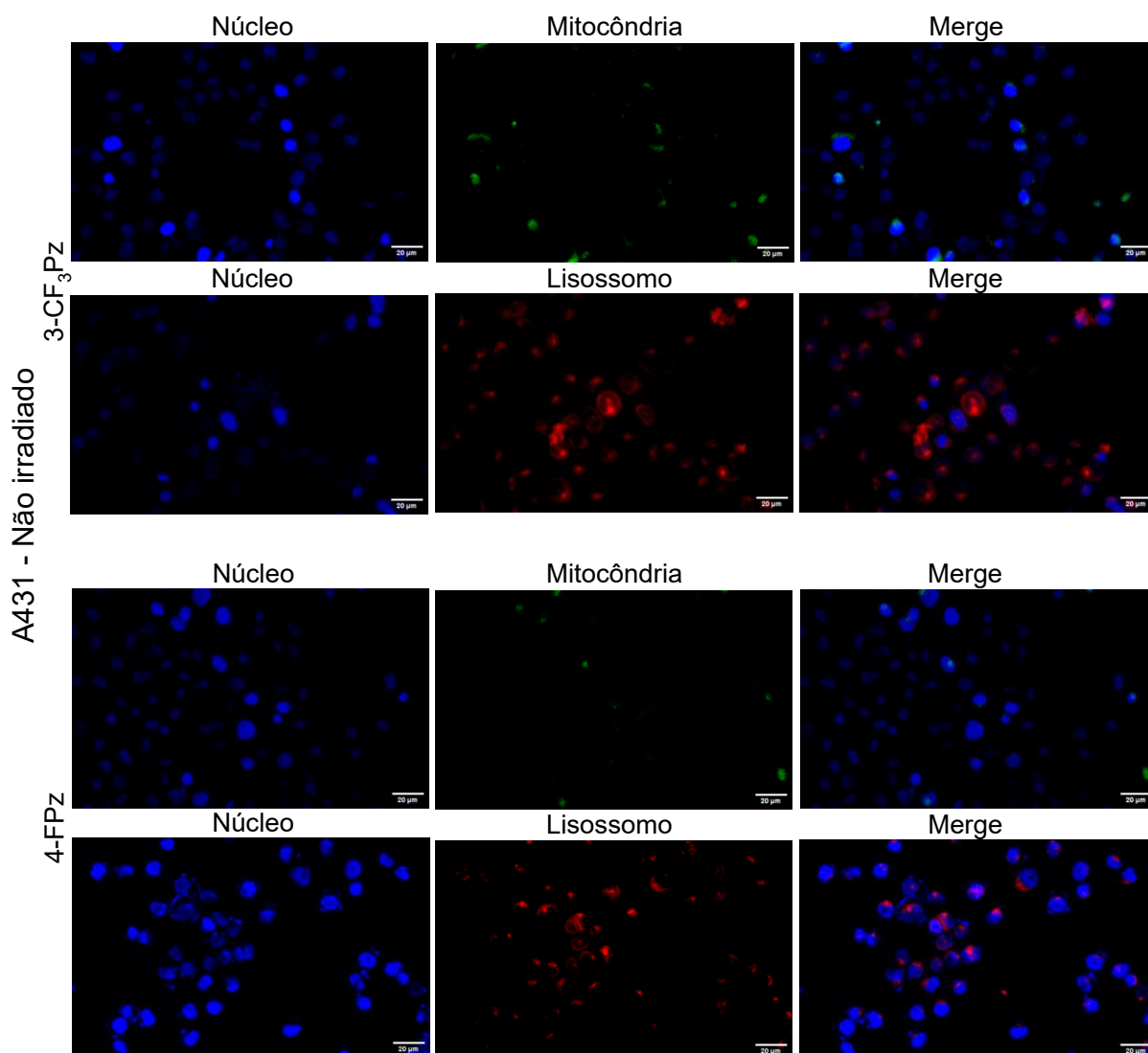


Figura 51 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células cancerosas A431 tratados a 1 µM.

Apêndice G - Visão ampla das marcações para o grupo irradiado contendo a 3-CF₃Pz e a 4-FPz junto a linhagem celular A431.

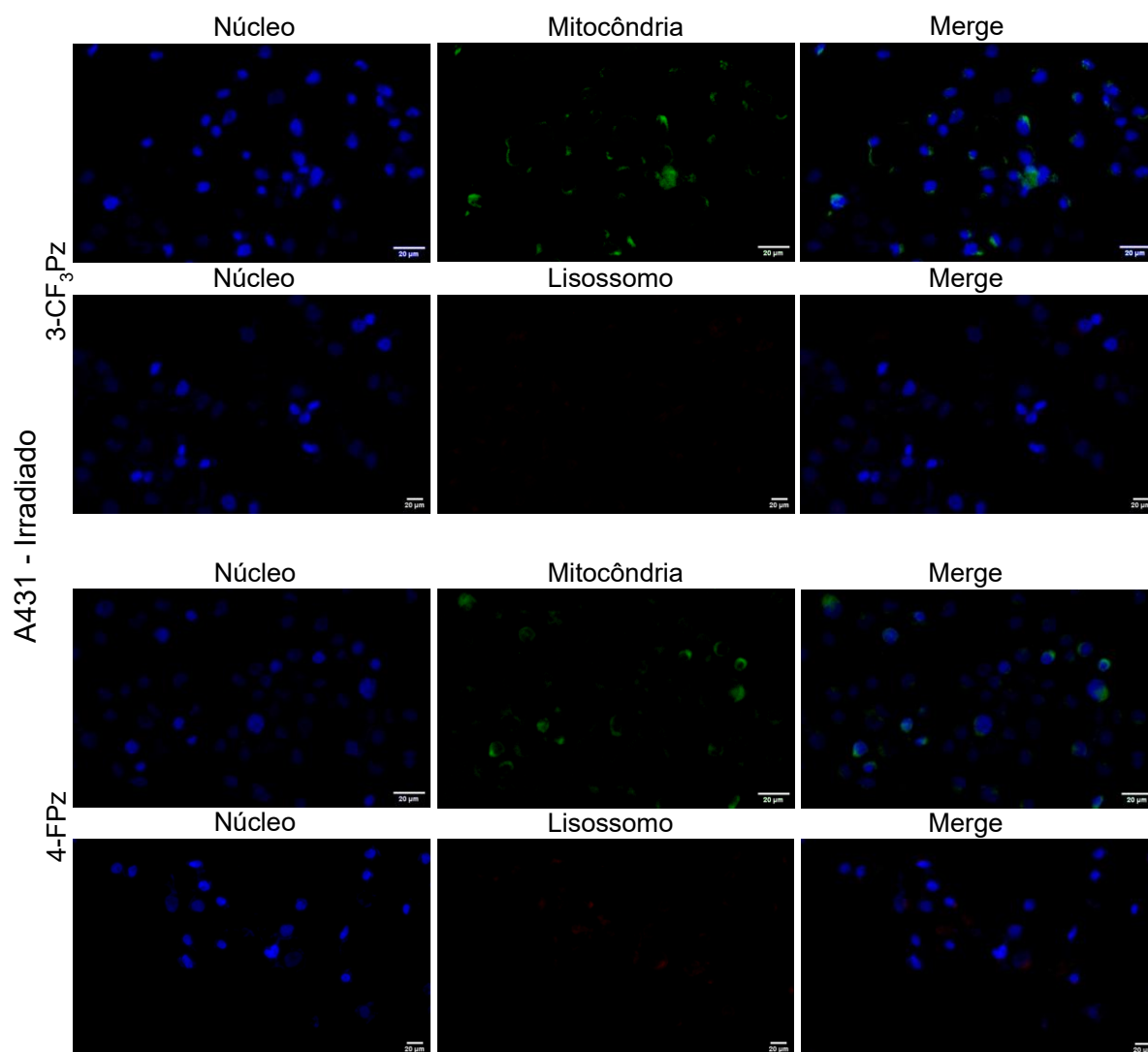


Figura 52 - Microscopia de fluorescência demonstrando danos subcelulares induzidos pelos compostos 3-CF₃Pz e 4-FPz, não irradiados, na linhagem de células cancerosas A431 tratados a 1 μ M.

Apêndice H - Estrutura da sonda utilizada nos experimentos de detecção de oxigênio singleto indireto.

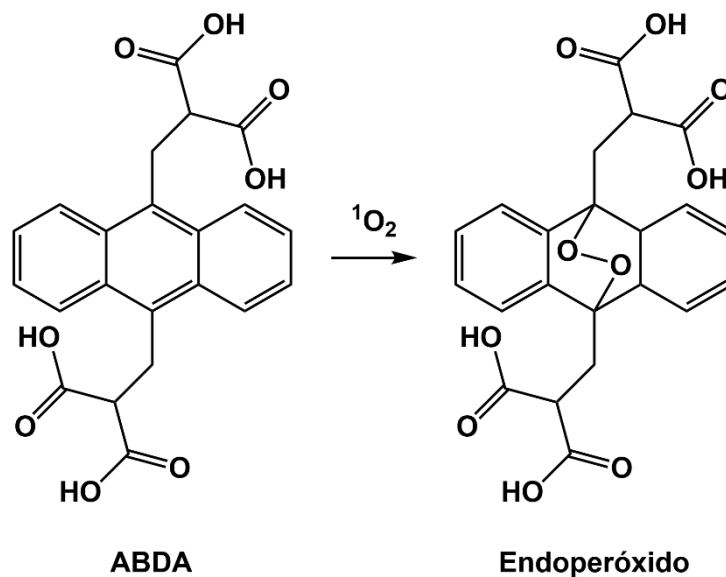


Figura 53 - Representação esquemática da reação do composto ABDA (ácido 9,10-antracenediacarboxílico) com oxigênio singleto (1O_2). À esquerda, a estrutura do ABDA em seu estado inicial; à direita, o produto de oxidação resultante da adição de oxigênio singleto formando um endoperóxido.

Apêndice I - Espectro de UV-VIS demonstrando o decaimento da absorção da sonda ABDA em 400 nm com a fotossensibilização dos compostos ao longo do tempo.

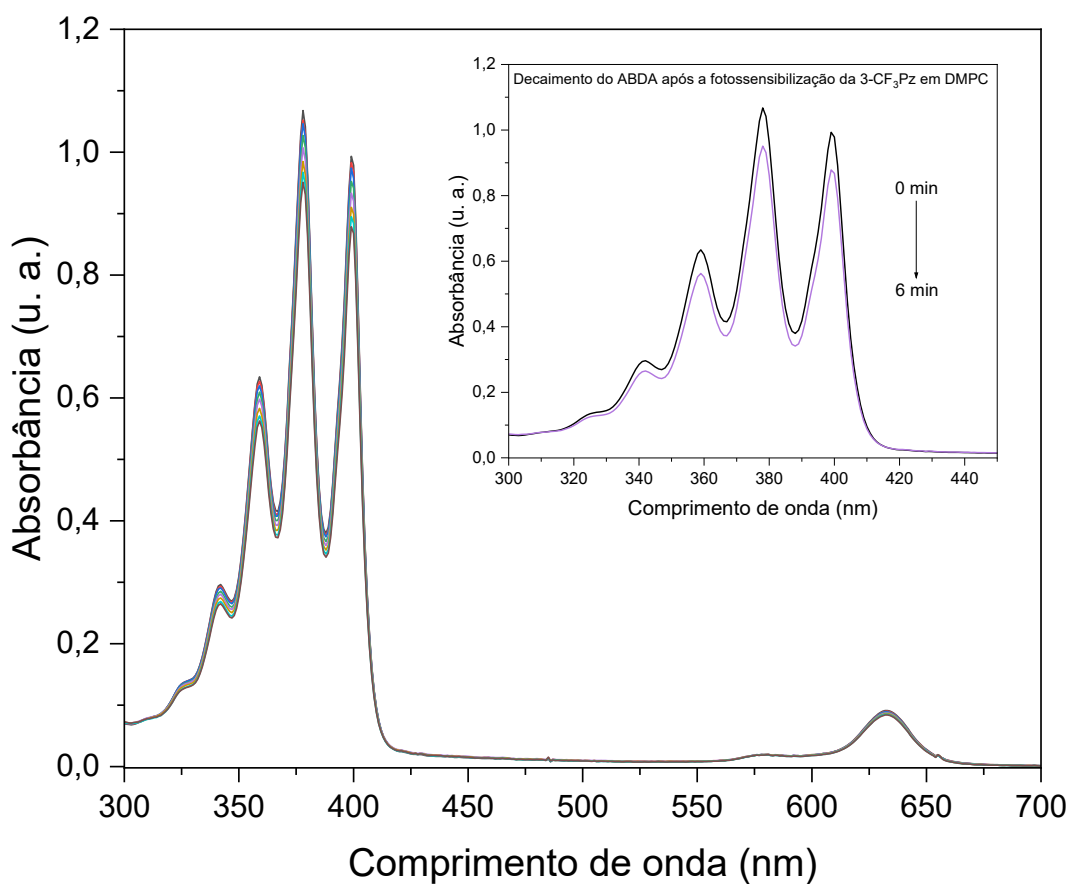


Figura 54 - Espectros de emissão de fluorescência evidenciando o decaimento do sinal do composto ABDA após a fotossensibilização com 3-CF₃Pz (648 nm), carregada em DMPC, indicativo da geração de oxigênio singlete (¹O₂).

Apêndice J - Decaimento temporal da fosforescência emitida pelo oxigênio singleto em 1270 nm, após fotossensibilização por laser e o módulo de LED, 650 nm e 633 nm respectivamente, dos FS's carregados em lipossoma de DMPC, junto ao MB.

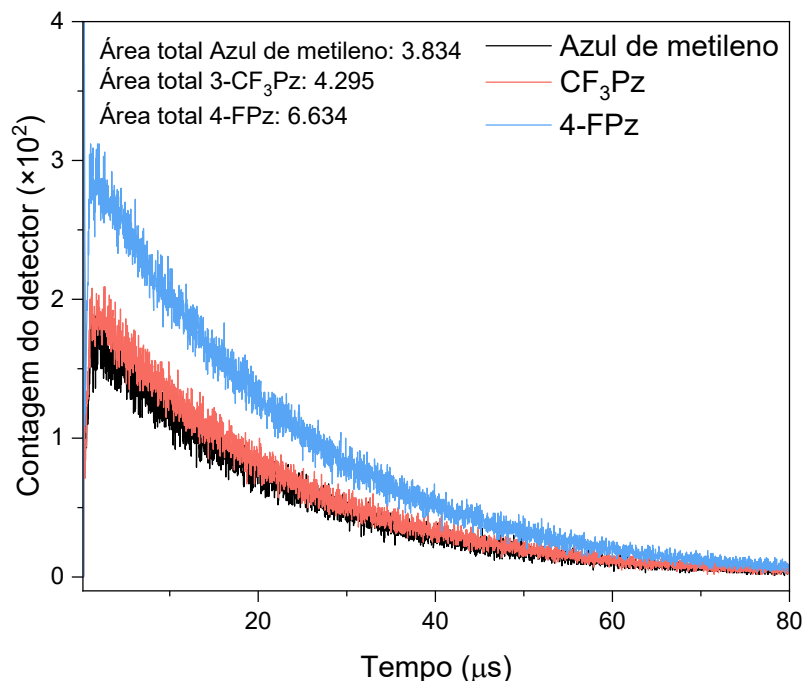


Figura 55 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) monitorados em 1270 nm, após excitação por pulso de laser (650 nm) em presença dos compostos Mb, 3-CF₃Pz e 4-FPz, sendo as Pz's carregadas em lipossoma de DMPC.

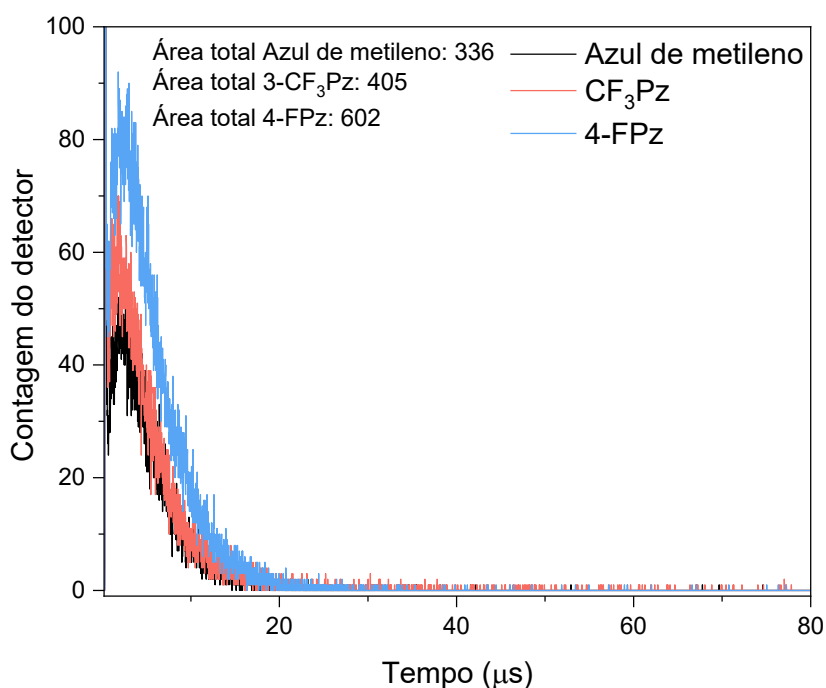


Figura 56 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) monitorados em 1270 nm, após excitação pelo módulo de LED (633 nm) em presença dos compostos Mb, 3-CF₃Pz e 4-FPz, sendo as Pz's carregadas em lipossoma de DMPC.

Apêndice K - Decaimento temporal da fosforescência emitida pelo oxigênio singleto em 1270 nm, após fotossensibilização por LED dos DMMB junto ao MB.

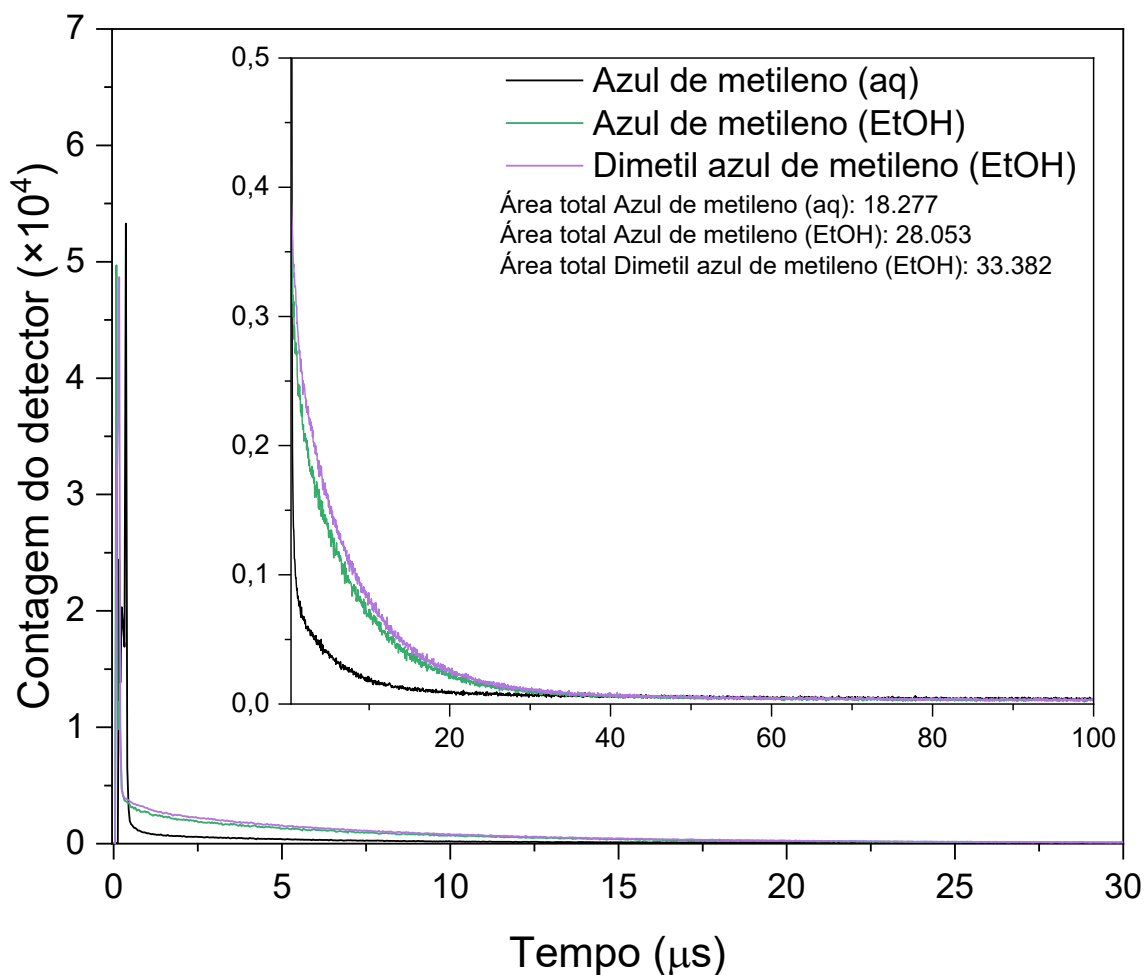


Figura 57 - Espectros de decaimento de fosforescência do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) monitorados em 1270 nm, após excitação pelo módulo de LED (633 nm) em presença dos compostos MB e DMMB realizado em água somente para o MB e etanol para ambos.

Apêndice L - Espectros ampliados do decaimento temporal da fosforescência emitida pelo oxigênio singleto em 1270 nm, após fotossensibilização por LED dos FS.

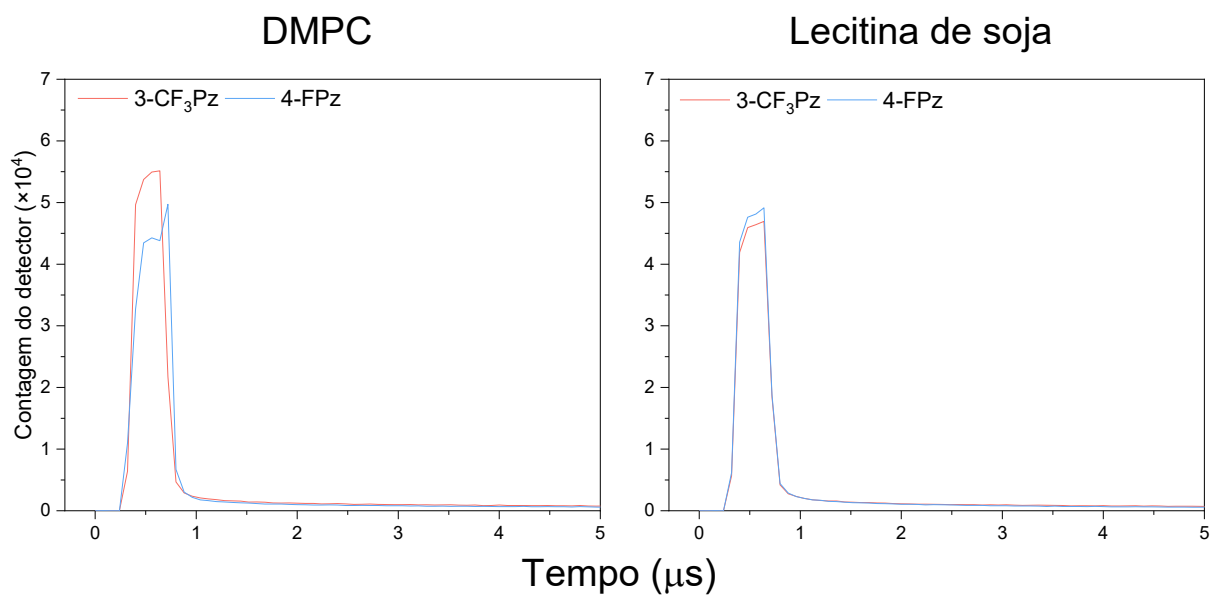


Figura 58 - Espectros ampliados do decaimento temporal da fosforescência emitida pelo oxigênio singleto em 1270 nm, após fotossensibilização por LED dos FS.

Apêndice M - Reações da sonda Hidroxi-TEMP, PBN e DMPO reagindo com um EROs produzido pela fotossensibilização dos FS.

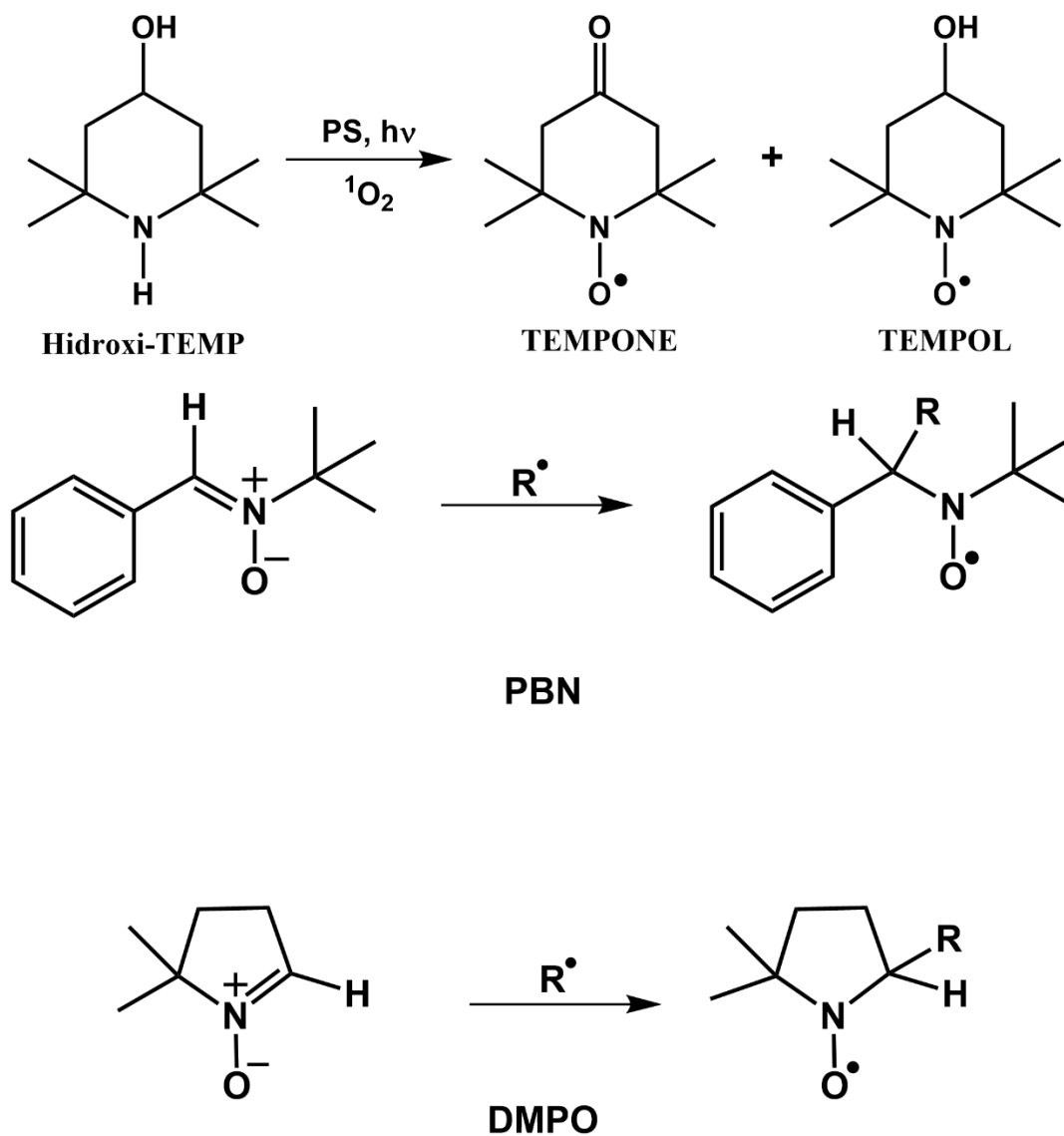


Figura 59 - Reações da sonda Hidroxi-TEMP, PBN e DMPO reagindo com um EROs produzido pela fotossensibilização dos FS.

Apêndice N - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula de lecitina de soja com a fotossensibilização da 3-CF₃Pz.

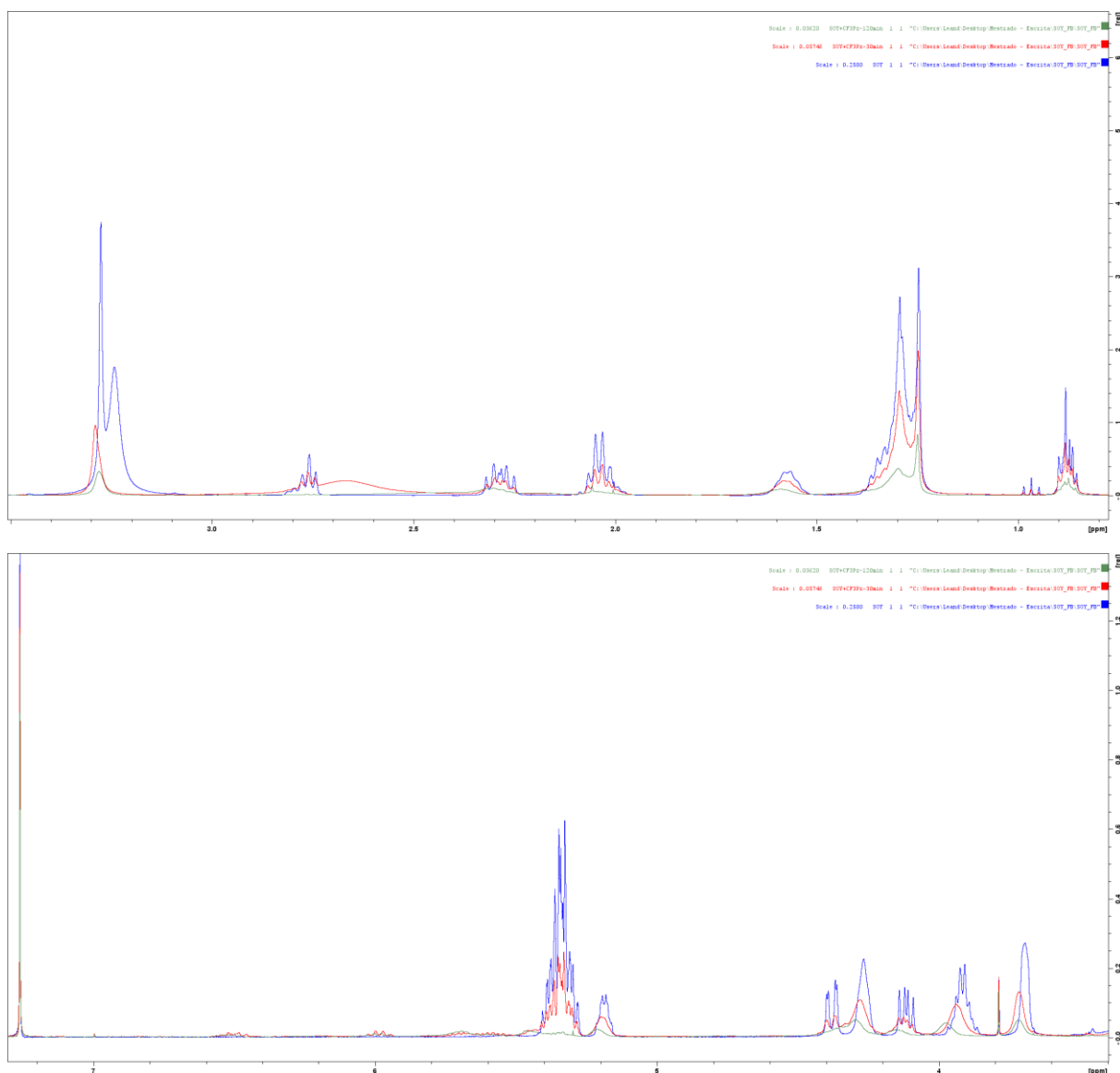


Figura 60 - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula de lecitina de soja com a fotossensibilização da 3-CF₃Pz.

Apêndice O - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula com a fotossensibilização da 4-FPz.

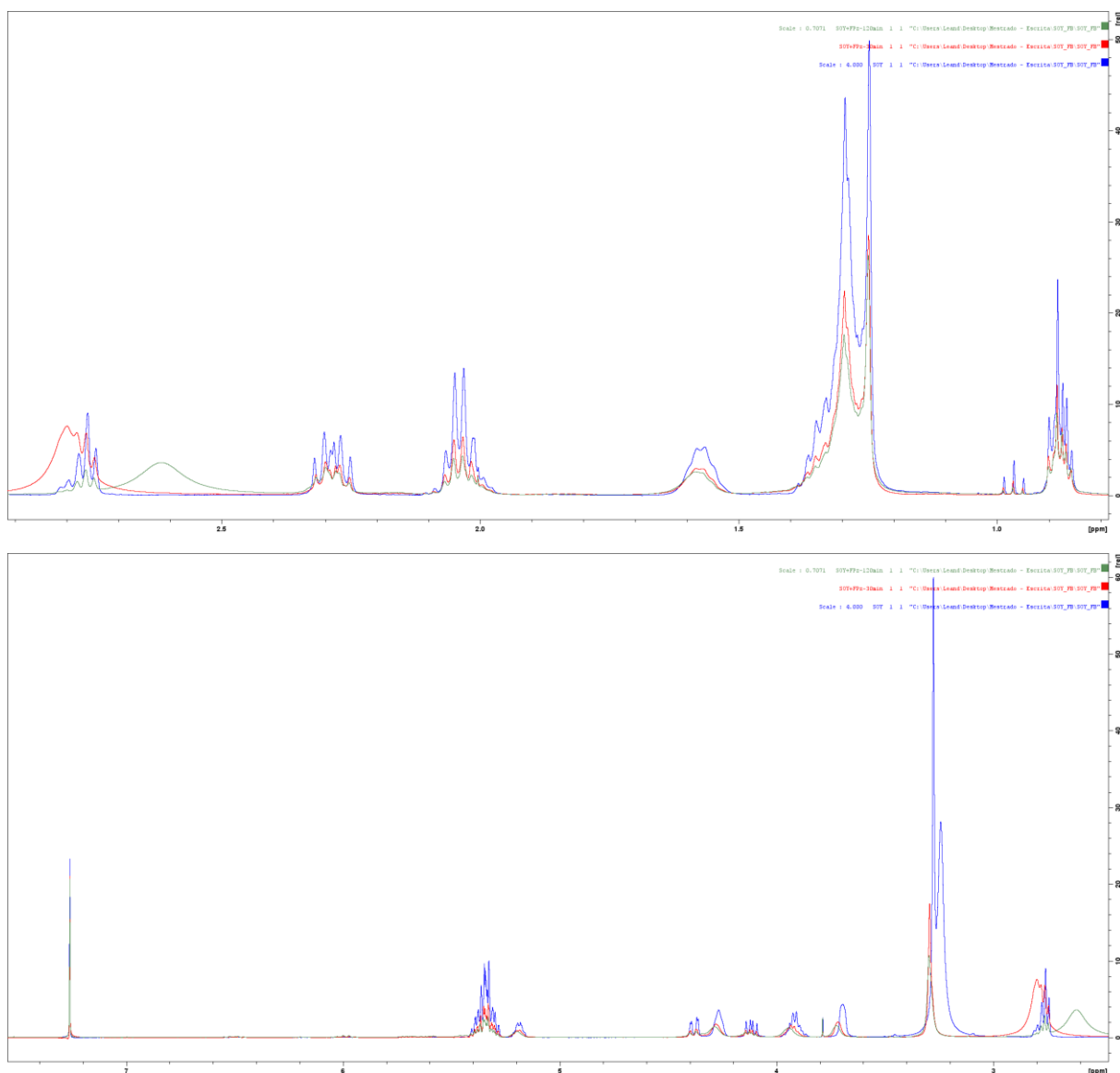


Figura 61 - Espectro de RMN dos produtos extraídos após a fotooxidação lipídica feita em vesícula de lecitina de soja com a fotossensibilização da 4-FPz.

Apêndice P - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 3-CF₃Pz. Evidenciando sua proximidade com as duplas

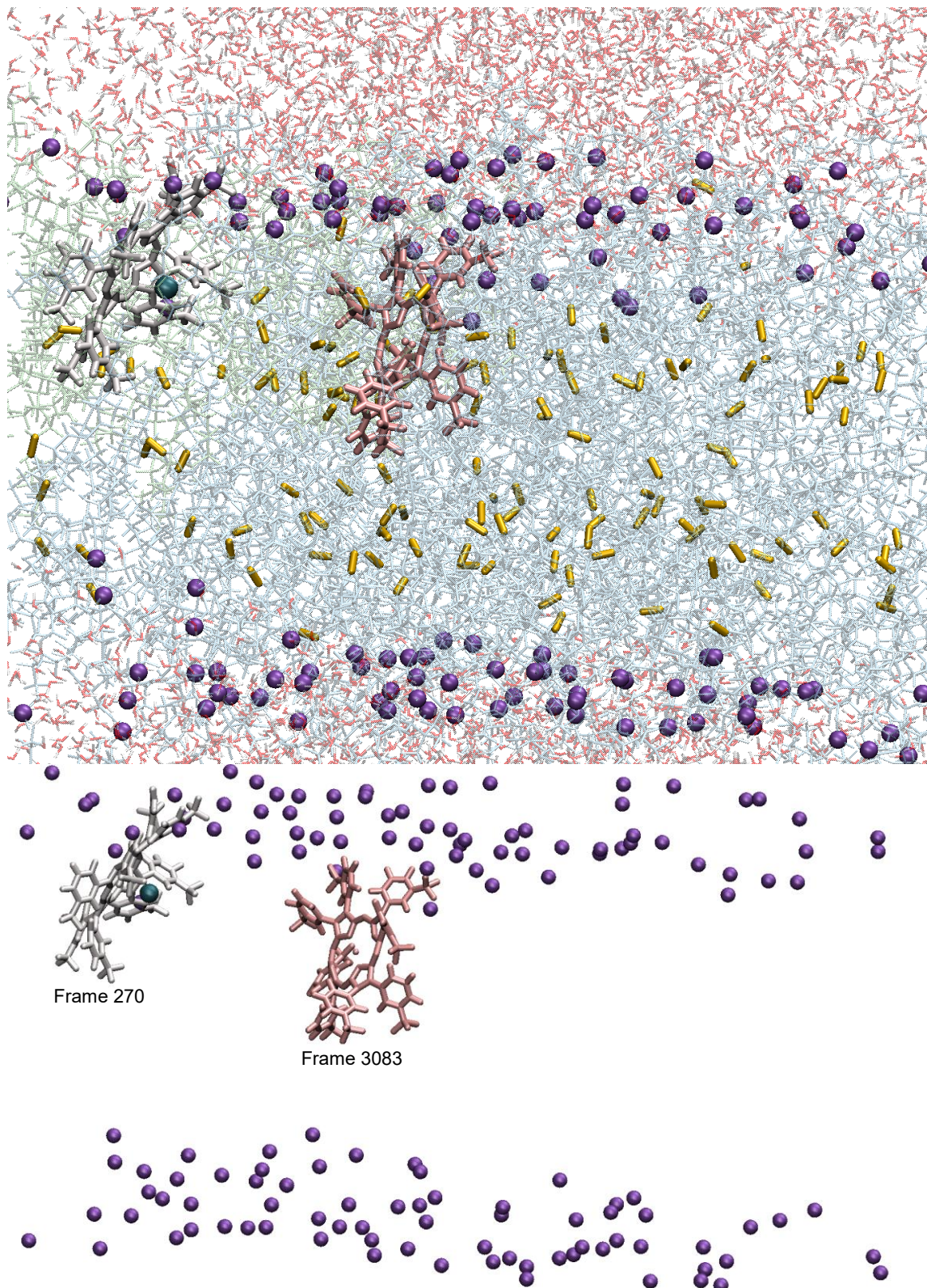


Figura 62 - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 3-CF₃Pz. Evidenciando sua proximidade com as duplas.

Apêndice Q - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 4-FPz. Evidenciando sua proximidade com os grupos fosfatos.

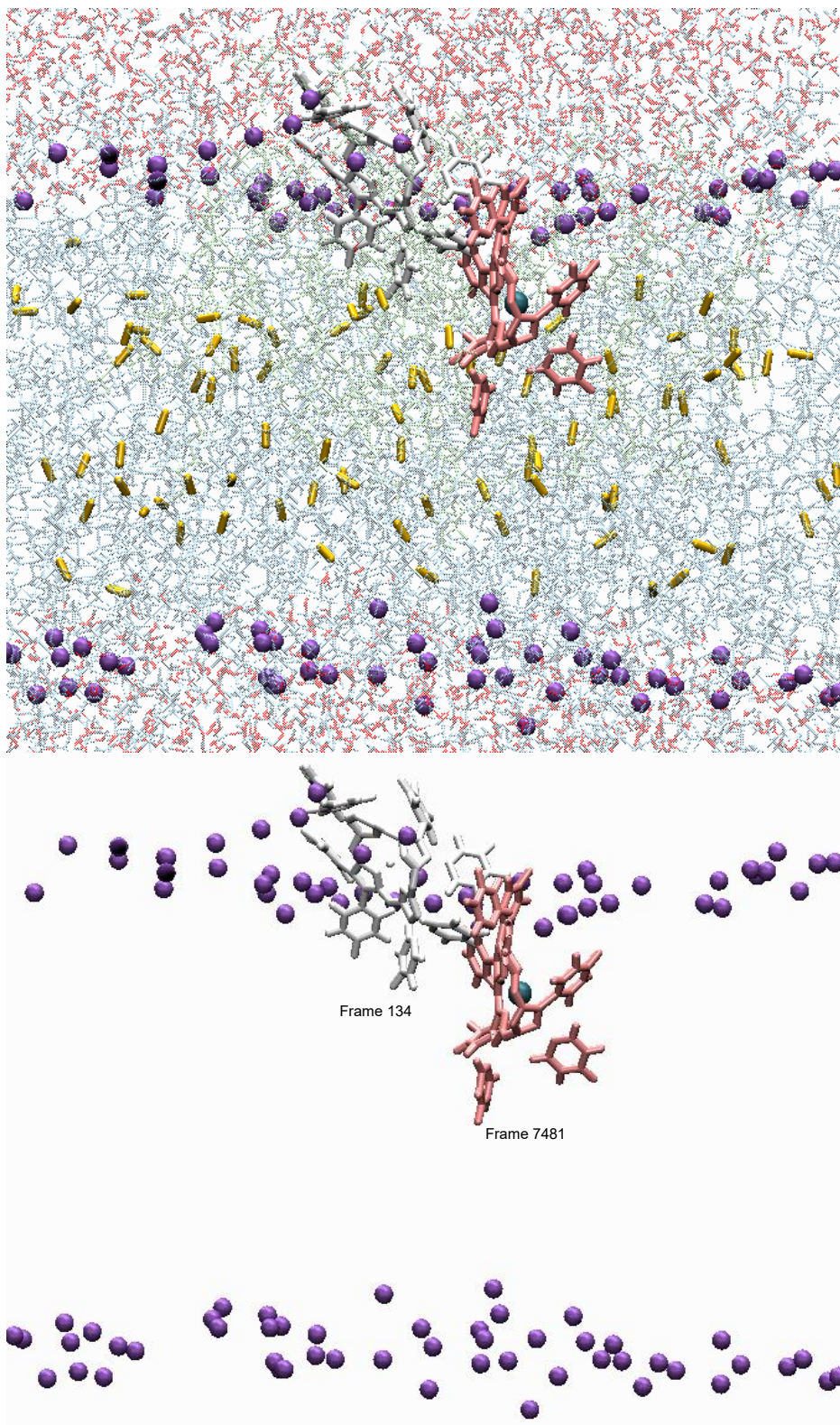


Figura 63 - Representação da evolução apresentada pela simulação da dinâmica molecular para a 4-FPz. Evidenciando sua proximidade com os grupos fosfatos.

Apêndice R - Algoritmo utilizado para a construção da caixa lipídica utilizado na dinâmica molecular.

```

# =====
# INPUT PACKMOL PARA BICAMADA POPC
# =====

# PARÂMETROS GLOBAIS
tolerance 2.5 # Distância entre átomos de moléculas diferentes
discale 2.0 #Fator multiplicador (distância entre moléculas = tolerance × discale = 5.0 Å)
add_box_sides 2.0 # Adiciona 2.0 Å ao tamanho utilizado pela caixa.
filetype pdb #Formato de arquivo de entrada
seed -1 #Gerador de aleatoriedade
output bilayer.pdb # Formato e nome do arquivo de saída

# =====
# 1. BICAMADA POPC
# =====

# CAMADA LIPÍDICA INFERIOR
structure POPC.pdb #Arquivo de entrada
number 72 # Número de moléculas de lipídios
inside box -12. -12. 20. 72. 72. 43. # Coordenadas limites para distribuição dos átomos
(x,y,z)inicial (x,y,z)final

#Restrições dos átomos
atoms 2 131 # Átomos de referência para orientação
over plane 0. 0. 1. 40. # Restrição para manter as moléculas paralelas (x,y,z,d)
end atoms
atoms 69 # Átomos de referência para orientação
below plane 0. 0. 1. 23. # Restrição para manter as moléculas paralelas (x,y,z,d)
end atoms
resnumbers 2 # Mantém a numeração original dos resíduos
end structure

# CAMADA LIPÍDICA SUPERIOR
structure POPC.pdb #Arquivo de entrada
number 72 # Número de moléculas de lipídios
inside box -12. -12. 40. 72. 72. 63. # Coordenadas limites para distribuição dos átomos

```

#Restrições dos átomos

```
atoms 2 131      # Átomos de referência para orientação
  below plane 0. 0. 1. 43. # Restrição para manter as moléculas paralelas (x,y,z,d)
```

```
end atoms
```

```
atoms 69      # Átomos de referência para orientação
```

```
  over plane 0. 0. 1. 60. # Restrição para manter as moléculas paralelas (x,y,z,d)
```

```
end atoms
```

```
resnumbers 2    # Mantém a numeração original dos resíduos
```

```
end structure
```

```
# =====
```

```
      # 2. MOLÉCULAS DE ÁGUA (MODELO SPC)
```

```
# =====
```

CAMADA DE ÁGUA INFERIOR

```
structure water.pdb #Arquivo de entrada
```

```
  number 3600      # moléculas de água
```

```
  inside box -12. -12. -10. 72. 72. 21. # Coordenadas limites para distribuição dos átomos
```

```
  resnumbers 2    # Mantém a numeração original dos resíduos
```

```
end structure
```

CAMADA DE ÁGUA SUPERIOR

```
structure water.pdb #Arquivo de entrada
```

```
  number 3600      # moléculas de água
```

```
  inside box -12. -12. 62. 72. 72. 93. # Coordenadas limites para distribuição dos átomos
```

```
  resnumbers 2    # Mantém a numeração original dos resíduos
```

```
end structure
```

Apêndice S - Algoritmo utilizado para a minimização de energia da bicamada.

```

; =====
; MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA PARA BICAMADA LIPÍDICA
; Arquivo de parâmetros para minimização do sistema
; =====
; ----- CONTROLE DE EXECUÇÃO -----
integrator    = steep    ; Algoritmo steepest descent (ideal para minimização inicial)
nsteps       = 100000   ; Número máximo de passos (geralmente suficiente)
emtol        = 500.0    ; Tolerância de energia (kJ/mol/nm) - valor moderado
emstep       = 0.01     ; Tamanho do passo (nm) - valor conservador

; ----- INTERAÇÕES NÃO-LIGADAS -----
cutoff-scheme = Verlet   ; Esquema de corte para GPUs (obrigatório para GPU)
vdwtype       = Cut-off  ; Tipo de potencial para Van der Waals
vdw-modifier  = Force-switch ; Suaviza transição no raio de corte
rvdw          = 1.4      ; Raio de corte para Van der Waals (nm)
rvdw-switch   = 1.2      ; Ponto inicial para switching function (nm)
coulombtype   = PME      ; Método PME para eletrostática
rcoulomb      = 1.4      ; Raio de corte para interações eletrostáticas (nm)
pbc           = xyz      ; Condições periódicas em 3D (essencial para membranas)
periodic-molecules = no

; ----- RESTRIÇÕES -----
constraints   = none     ; Restringe apenas ligações com hidrogênio

; ----- SAÍDA -----
nstenergy    = 10       ; Salva energia a cada 100 passos (para monitoramento)
nstlog       = 10       ; Atualiza arquivo de log a cada 100 passos

; ----- PARÂMETROS ESPECÍFICOS PARA BICAMADAS -----
DispCorr     = EnerPres ; Correção de energia/pressão para Van der Waals
comm-mode    = Linear   ; Remove movimento do centro de massa
comm-grps    = non-Water Water ; Aplica a todo o sistema (melhor para
minimização)

```

Apêndice T - Algoritmo utilizado para a equilibração do primeiro ciclo de NPT.

```

; =====
; EQUILÍBRIO NPT_01 PARA BICAMADA LIPÍDICA - EXEMPLO
; Arquivo de parâmetros para equilíbrio com pressão constante
; =====

title    = Equilibrio_NPT_bicamada_exemplo ; Nome da simulação
define   = -DPOSRES ; Restrição de posição para a proteína

; ===== CONTROLE DE EXECUÇÃO =====
integrator = md ; Algoritmo de integração (leap-frog)
nsteps    = 500000 ; 1 ns de simulação (500 mil passos)
dt        = 0.002 ; Tamanho do passo de tempo (2 femtosegundos)

; ===== CONTROLE DE SAÍDA DE DADOS =====
nstxout   = 5000 ; Salva coordenadas a cada 10 ps
nstvout   = 5000 ; Salva velocidades a cada 10 ps
nstenergy = 500 ; Salva energias a cada 1 ps
nstlog    = 1000 ; Atualiza arquivo de log a cada 2 ps
nstxout-compressed = 5000 ; Salva trajetória compactada (.xtc) a cada 10 ps

; ===== RESTRIÇÕES DE LIGAÇÕES =====
constraint_algorithm = lincs ; Algoritmo LINCS para restrições
constraints          = h-bonds ; Restringe apenas ligações com hidrogênio
lincs_iter           = 1 ; Número de iterações do LINCS
lincs_order          = 4 ; Ordem de interpolação do LINCS
lincs-warnangle      = 30 ; Emite aviso se ângulo exceder 30 graus

; ===== INTERAÇÕES NÃO-LIGADAS =====
cutoff-scheme = Verlet ; Esquema de corte para GPUs
ns_type       = grid ; Usa grid para busca de vizinhos
nstlist       = 20 ; Atualiza lista de vizinhos a cada 40 fs
rlist         = 1.2 ; Raio de corte para lista de vizinhos (nm)

```

```

rcoulomb    = 1.2    ; Raio de corte para interações eletrostáticas (nm)
rvdw        = 1.2    ; Raio de corte para Van der Waals (nm)

; ===== ELETROSTÁTICA =====
coulombtype = PME    ; Método PME para eletrostática de longo alcance
pme_order   = 4      ; Ordem da interpolação PME
fourierspacing = 0.12 ; Espaçamento da grade FFT (otimizado para GPU)

; ===== ACOPLAMENTO DE TEMPERATURA =====
tcoupl      = Nose-Hoover ; Termostato Nose-Hoover (precisão melhorada)
tc-grps     = Water non-Water ; Grupos para termostato
tau_t       = 1.0 1.0    ; Tempo de relaxação (ps) - mais estável para membranas
ref_t       = 300 300    ; Temperatura de referência (K)

; ===== ACOPLAMENTO DE PRESSÃO ===== (CRÍTICO PARA MEMBRANAS)
pcoupl      = Berendsen ; Barostato para sistemas anisotrópicos
pcoupltype  = semiisotropic ; Controle separado para XY e Z
tau_p       = 2.0        ; Tempo de relaxação da pressão (ps)
ref_p       = 1.0 1.0    ; Pressão de referência XY e Z (bar)
compressibility = 4.5e-5 4.5e-5 ; Compressibilidade da água (bar-1)

; ===== CONTROLE DO SISTEMA =====
pbc         = xyz      ; Condições periódicas de contorno em 3D
DispCorr    = EnerPres ; Correção de energia/pressão para Van der Waals
gen_vel     = no       ; Não gera novas velocidades (continuação do NVT)

; ===== REMOÇÃO DE MOVIMENTO DO CENTRO DE MASSA =====
comm-mode   = Linear    ; Remove movimento linear do COM
comm-grps   = Water non-Water ; Grupos para remoção de COM
nstcomm     = 100       ; Remove movimento do COM a cada 100 passos
refcoord-scaling = com   ; Mantém dimensões da caixa relativas ao COM inicial

```

Apêndice U - Algoritmo utilizado para a equilibração do ciclo de NVT.

```

; =====
; EQUILÍBRIO NVT PARA BICAMADA LIPÍDICA - EXEMPLO
; Arquivo de parâmetros para equilíbrio com temperatura constante
; =====

title    = Equilibrio_NVT_bicamada_exemplo ; Nome da simulação
define   = -DPOSRES ; Restrição de posição para a proteína

; ===== CONTROLE DE EXECUÇÃO =====
integrator = md ; Algoritmo de integração (leap-frog)
nsteps    = 500000 ; 200 ps de simulação (100 mil passos)
dt        = 0.002 ; Tamanho do passo de tempo (2 femtosegundos)

; ===== CONTROLE DE SAÍDA DE DADOS =====
nstxout   = 5000 ; Salva coordenadas a cada 10 ps
nstvout   = 5000 ; Salva velocidades a cada 10 ps
nstenergy = 100 ; Salva energias a cada 0.2 ps (monitoramento)
nstlog    = 1000 ; Atualiza arquivo de log a cada 2 ps

; ===== RESTRIÇÕES DE LIGAÇÕES =====
constraint_algorithm = lincs ; Algoritmo LINCS para restrições
constraints          = h-bonds ; Restringe apenas ligações com hidrogênio
lincs_iter           = 1 ; Número de iterações do LINCS
lincs_order          = 4 ; Ordem de interpolação do LINCS
lincs-warnangle      = 30 ; Emite aviso se ângulo exceder 30 graus

; ===== INTERAÇÕES NÃO-LIGADAS =====
cutoff-scheme = Verlet ; Esquema de corte para GPUs
ns_type       = grid ; Usa grid para busca de vizinhos
nstlist       = 20 ; Atualiza lista de vizinhos a cada 40 fs
rlist         = 1.2 ; Raio de corte para lista de vizinhos (nm)
rcoulomb      = 1.2 ; Raio de corte para interações eletrostáticas (nm)

```

```

rvdw      = 1.2      ; Raio de corte para Van der Waals (nm)

; ===== ELETROSTÁTICA =====
coulombtype = PME      ; Método PME para eletrostática de longo alcance
pme_order   = 4        ; Ordem da interpolação PME
fourierspacing = 0.12  ; Espaçamento da grade FFT (otimizado para GPU)

; ===== ACOPLAMENTO DE TEMPERATURA =====
tcoupl      = V-rescale ; Termostato V-rescale (estabilidade para equilíbrio)
tc-grps     = non-Water Water ; Grupos para termostato
tau_t       = 0.1 0.1  ; Tempo de relaxação rápido (0.1 ps)
ref_t       = 300 300  ; Temperatura de referência (K)

; ===== CONTROLE DO SISTEMA =====
pbc         = xyz      ; Condições periódicas de contorno em 3D
DispCorr    = EnerPres ; Correção de energia/pressão para Van der Waals

; ===== INICIALIZAÇÃO DE VELOCIDADES =====
gen_vel     = yes      ; Gera velocidades iniciais
gen_temp    = 300      ; Temperatura para distribuição de Maxwell (K)
gen_seed    = -1       ; Semente aleatória (baseada no relógio do sistema)

; ===== REMOÇÃO DE MOVIMENTO DO CENTRO DE MASSA =====
comm-mode   = Linear    ; Remove movimento linear do COM
comm-grps   = non-Water Water ; Grupos para remoção de COM
nstcomm     = 100       ; Remove movimento do COM a cada 100 passos

```

Apêndice V - Algoritmo utilizado para a equilibração do segundo ciclo de NPT.

```

; =====
; EQUILÍBRIO NPT_02 PARA BICAMADA LIPÍDICA - EXEMPLO
; Arquivo de parâmetros para equilíbrio com pressão constante
; =====

title    = Equilibrio_NPT_bicamada_exemplo ; Nome da simulação
define   = -DPOSRES ; Restrição de posição para a proteína

; ===== CONTROLE DE EXECUÇÃO =====
integrator = md ; Algoritmo de integração (leap-frog)
nsteps    = 1000000 ; 1 ns de simulação (500 mil passos)
dt        = 0.001 ; Tamanho do passo de tempo (2 femtosegundos)

; ===== CONTROLE DE SAÍDA DE DADOS =====
nstxout   = 5000 ; Salva coordenadas a cada 10 ps
nstvout   = 5000 ; Salva velocidades a cada 10 ps
nstenergy = 500 ; Salva energias a cada 1 ps
nstlog    = 1000 ; Atualiza arquivo de log a cada 2 ps
nstxout-compressed = 5000 ; Salva trajetória compactada (.xtc) a cada 10 ps

; ===== RESTRIÇÕES DE LIGAÇÕES =====
constraint_algorithm = lincs ; Algoritmo LINCS para restrições
constraints          = h-bonds ; Restringe apenas ligações com hidrogênio
lincs_iter           = 2 ; Número de iterações do LINCS
lincs_order          = 6 ; Ordem de interpolação do LINCS
lincs-warnangle      = 30 ; Emite aviso se ângulo exceder 30 graus

; ===== INTERAÇÕES NÃO-LIGADAS =====
cutoff-scheme = Verlet
rlist         = 1.4
rcoulomb      = 1.4
rvdw          = 1.4

```

Apêndice X - Algoritmo utilizado para a simulação de produção da bicamada lipídica.

```

; =====
; SIMULAÇÃO DE PRODUÇÃO PARA BICAMADA LIPÍDICA
; Arquivo de parâmetros para dinâmica molecular de produção
; =====

title    = Simulacao_bicamada_producao ; Nome da simulação

; ===== PARÂMETROS DE EXECUÇÃO =====
integrator = md-vv          ; Algoritmo leap-frog para integração
nsteps    = 250000000      ; 500 ns de simulação (250M passos)
dt        = 0.002          ; Passo de 2 fs (0.002 ps)

; ===== CONTROLE DE SAÍDA =====
nstxout   = 0              ; Desativa .trr (economia de espaço)
nstvout   = 0              ; Desativa saída de velocidades
nstxtcout = 25000          ; Salva trajetória .xtc a cada 50 ps
nstenergy = 5000           ; Salva energias a cada 10 ps
nstlog    = 10000          ; Log a cada 100 ps (5000 linhas)
nstcalcenergy = 100        ; Calcula energias a cada 0.2 ps

; ===== RESTRIÇÕES =====
constraint_algorithm = lincs ; LINCS para restrições
constraints          = h-bonds ; Apenas ligações H-H
lincs_iter           = 2      ; 1 iteração LINCS
lincs_order          = 6      ; Ordem 4 para precisão
lincs-warnangle      = 30     ; Aviso para ângulos >30°

; ===== INTERAÇÕES =====
cutoff-scheme = Verlet      ; Otimizado para GPU
ns_type       = grid        ; Busca por grid
nstlist       = 100         ; Atualiza vizinhos a cada 200 fs
rlist         = 1.4         ; Raio de corte (nm)

```

```

rcoulomb    = 1.4          ; Corte eletrostático (nm)
rvdw        = 1.4          ; Corte Van der Waals (nm)

; ===== ELETROSTÁTICA =====
coulombtype = PME          ; PME para longo alcance
pme_order   = 4            ; Interpolação cúbica
fourierspacing = 0.12      ; Grade FFT fina (GPU)

; ===== TERMOSTATO =====
tcoupl      = Nose-Hoover   ; Termostato preciso
tc-grps     = Water non-Water ; 2 grupos de acoplamento
tau_t       = 0.5  0.5      ; Relaxação 0.5 ps
ref_t       = 300  300      ; Temperatura 300 K

; ===== BAROSTATO =====
pcoupl      = Parrinello-Rahman ; Ideal para membranas
pcoupltype  = semiisotropic    ; Controle XY/Z separado
tau_p       = 10            ; Relaxação 2 ps
ref_p       = 1.0  1.0      ; Pressão 1 bar (XY e Z)
compressibility = 4.5e-5  4.5e-5 ; Compressibilidade água

; ===== SISTEMA =====
pbc         = xyz          ; PBC 3D completo
DispCorr    = EnerPres     ; Correção energia/pressão
gen_vel     = no           ; Continuação da simulação

; ===== CENTRO DE MASSA =====
comm-mode   = Linear        ; Remove movimento COM
comm-grps   = Water non-Water ; Grupos para correção
nstcomm     = 100          ; Correção a cada 100 passos

```