



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE FOTOSSENSIBILIZADOR METALOPORFIRÍNICO
PARA POTENCIAL TERAPIA FOTODINÂMICA**

LUIZ PAULO DE AZEVEDO BELLI

Florianópolis
NOVEMBRO/2020

Luiz Paulo de Azevedo Belli

**DESENVOLVIMENTO DE FOTOSSENSIBILIZADOR METALOPORFIRÍNICO
PARA POTENCIAL TERAPIA FOTODINÂMICA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Adriana Passarella Gerola

Yasmin Serpa Gomes

Florianópolis
NOVEMBRO/2020

Dedico este trabalho aos meus pais: minha mãe, Adriana de Azevedo Belli e
meu pai, Sávio Belli, e ao meu Kitty

Agradecimentos

Aos meus pais e amigos por estarem comigo e suas curiosidades pelo meu trabalho. Suas dúvidas me inspiraram a buscar tópicos e ir além do assunto.

À Yasmin pelos ensinamentos, incrível paciência e calma ao acompanhar o meu trabalho e sanar minhas dúvidas de forma atenciosa, carinhosa e com puxões de orelha quando necessário.

À Adriana pela grande oportunidade de trabalhar com o assunto, me guiar e por abrir as portas do mundo da fotoquímica e me fazer ver que não sou o único doido a gostar das quatro áreas da química.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Radiação eletromagnética e sua interação com a matéria	13
2.1.1 Banda Soret e Bandas Q.....	16
2.2 Terapia Fotodinâmica	18
2.2.1 <i>Mecanismos de formação espécies de oxigênio</i>	18
2.2.2 <i>Oxigênio singlete</i>	22
2.3 <i>Fotossensibilizadores</i>	24
2.3.1 <i>Fotossensibilizadores Ideais</i>	26
2.4 <i>Porfirinas</i>	27
2.4.1 <i>Metaloporfirinas</i>	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 <i>Materiais</i>	30
4.2 <i>Métodos</i>	30
4.2.1 <i>Obtenção do extrato e da feofítina a síntese e caracterização do feoforbídeo a e derivados de paládio e zinco</i>	30
4.2.2 <i>Caracterização dos processos fotofísicos</i>	32
4.3 <i>Segurança no Laboratório</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 <i>Resultados</i>	34
5.1.1 <i>Obtenção do Feoforbídeo a e Derivados Metalados</i>	34
5.1.1 <i>Espectros de Absorção e de Emissão em solventes de diferentes polaridades</i>	37
5.1.2. <i>Rendimento Quântico de Fluorescência</i>	41
5.1.3 <i>Avaliação das cinéticas de Fotobranqueamento</i>	44
5.2 <i>Discussão</i>	45
5.2.1 <i>Espectro de Absorção e de Emissão</i>	45
5.2.2 <i>Cinéticas de Fotobranqueamento</i>	46
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da molécula do feoforbídeo a – Um FS com potencial para TFD	12
Figura 2. Exemplo usando parte do diagrama de orbital molecular – (a) Spin total igual à zero	14
Figura 3. Diagrama de Perrin–Jablonski (traduzido do artigo). ¹⁵	15
Figura 4. Espectros de emissão e absorção da clorofila a. As bandas Q (lado direito) se encontram na região do vermelho, com menor intensidade e requerem menor energia para excitar. As bandas Soret (lado esquerdo) se encontram na região do azul, com maior intensidade e requerem maior energia para excitar (adaptado do artigo Björn et.al. ¹⁸).....	17
Figura 5. Esquema da reação tipo I(i) e a sequência de reação com seus produtos	19
Figura 6. Esquema da reação tipo I(ii) e a sequência de reação com seus produtos	20
Figura 7. Esquema representando as etapas da mudança do estado do FS de singlete para triplete incluindo os níveis de energia genéricos de cada estado e seus spins. O esquema é meramente ilustrativo e não representa as transições eletrônicas.....	21
Figura 8. Esquema de todas as etapas da reação tipo II mostrando os níveis de energia genéricos de cada espécie e seus spins. Onde ¹ FS (estado fundamental) absorve luz (hv) formando ¹ FS*; ¹ FS* realiza CIS formando ³ FS; ³ FS e o oxigênio (³ O ₂ estado fundamental)	22
Figura 9. Diagrama de orbitais moleculares do oxigênio triplete. ²⁴	23
Figura 10. Possíveis excitações do oxigênio triplete. As energias estão em relação à configuração original no estado fundamental (3Σ _g ⁻) onde estão com energia inicial de zero	23
Figura 11. Estrutura do grupo heme (esquerda) e estrutura da clorofila a (direita).....	27
Figura 12. Molécula de feoforbídeo a complexando o íon M ²⁺	29
Figura 13. Reação e estrutura da clorofila a formando feofítina a.	30
Figura 14. Estrutura das reações de formação do feoforbídeo a de zinco e de paládio.....	32

Figura 15. (A) Espectro de massas do feoforbídeo a em etanol (modo de ionização ESI-) íon molecular em 591 (-1H+). (B) Espectro de absorção do feoforbídeo em acetona com Banda Soret em 409 nm e Banda Q em 667 nm.	35
Figura 16. Espectros de absorção eletrônica em etanol do feoforbídeo de zinco (A) com bandas Soret em 427 nm e Q em 657 nm e do feoforbídeo de paládio (B) com bandas Soret em 412 nm e Q em 649 nm.	36
Figura 17. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em água. Com comprimento de onda máximo em 664,0 nm no espectro de absorção e 668,07 nm no de emissão.	37
Figura 18. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em Etanol. Com comprimento de onda máximo em 659,9 nm no espectro de absorção e 666,0 nm no de emissão.	37
Figura 19. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em Clorofórmio. Com comprimento de onda máximo em 659,9 nm no espectro de absorção e 666,0 nm no de emissão.....	38
Figura 20. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em água. Com comprimento de onda máximo em 648,9 nm no espectro de absorção e 768,0 nm no de emissão.	40
Figura 21. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em etanol. Com comprimento de onda máximo em 648,9 nm no espectro de absorção e 668,0 nm no de emissão.....	40
Figura 22. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em clorofórmio. Com comprimento de onda máximo em 644,0 nm no espectro de absorção e 703,9 nm no de emissão.....	41
Figura 23. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo em Etanol (Padrão). Com comprimento de onda máximo em 667,06 nm no espectro de absorção e 671,99 nm no de emissão.....	43
Figura 24. Cinética de fotodegradação do feoforbídeo a de zinco em etanol..	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de deslocamento de Stokes para os derivados de feoforbídeo a. 39
- Tabela 2.** Dados do padrão de feoforbídeo em etanol de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_p), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_p). 42
- Tabela 3.** Dados do feoforbídeo de zinco de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_d), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_d), absortividade molar, rendimento de fluorescência (ΦF). 42
- Tabela 4.** Dados do feoforbídeo a de paládio, em água, clorofórmio e etanol. Valores de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_d), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_d), absortividade molar, rendimento quântico de fluorescência (ΦF). 43
- Tabela 5.** Dados de constante de velocidade para os derivados de feoforbídeo a. 44

LISTA DE ABREVIATURAS

Introdução

TFD – Terapia Fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

CIS – Cruzamento intersistema

Estados Quânticos

$^3\text{O}_2$ ou O_2 – Oxigênio no estado fundamental

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

S_0 – Estado fundamental singlete (não confundir com S de Spin total).

S_1 - Primeiro estado excitado singlete

T_1 – Primeiro estado excitado triplete

S_2 – Estado excitado singlete de maior energia que S_1

\rightarrow - Transição de um estado para outro (ex. $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$)

^1FS – Fotossensibilizador no estado fundamental singlete

Diversos

S – Spin total

EROS - espécies reativas de oxigênio

PDI - inativação fotodinâmica de microrganismos

M^{2+} - íon metálico de carga (II)

Propriedades Fotoquímicas e Fotofísicas

Φ - Rendimento Quântico

Φ_F - Rendimento quântico de fluorescência

Φ_Δ - Rendimento quântico de oxigênio singlete

Φ_T - Rendimento quântico de estado triplete

Φ_p - Rendimento quântico de fluorescência do padrão de feoforbídeo a em etanol

τ_T - Tempo de vida no estado triplete

$\Delta\nu$ - Deslocamento de Stokes

k – Constante de velocidade de fotobranqueamento

λ – Comprimento de onda

E - Energia do fóton

h - Constante de Planck

c - a velocidade da luz

ε - Coeficiente de absorvidade molar

$h\nu$ - Energia de um fóton expressando o número de onda (ν). Ver **Equação (1)**.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na utilização de luz e uma molécula chamada de fotossensibilizador (FS) que irá reagir com oxigênio do meio formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), uma molécula reativa para destruir células cancerígenas e microrganismos. No presente trabalho foi sintetizado um FS derivado da clorofila, o feoforbídeo a, uma molécula com várias características de interesse para a TFD, como alta absorção de luz na região do visível e alto rendimento quântico de oxigênio singlete. Com o intuito de aprimorar as propriedades do feoforbídeo para aplicação em TFD, preparou-se complexos com Paládio e Zinco. As análises de fluorescência mostraram que a inserção dos metais zinco e paládio minimizaram a possibilidade de relaxamento da luz absorvida por meio de fluorescência, dando oportunidade para relaxamento por meio de conversão intersistema, conseqüentemente a formação de oxigênio singlete. Através de análises de fotobranqueamento observou-se que a complexação com o paládio não altera de forma significativa a fotoestabilidade do fotossensibilizador, enquanto a maior fotoinstabilidade é encontrada para o complexo de zinco. Assim, a incorporação de íons metálicos ao feoforbídeo é uma estratégia interessante visto que pode aumentar a formação do estado triplete. Contudo, uma atenção especial deve ser dada ao efeito desses metais na fotoestabilidade do fotossensibilizador em futuros estudos visando terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Fotossensibilizador; Oxigênio Singlete; Feoforbídeo a; Fluorescência; Fotobranqueamento.

1. INTRODUÇÃO

A busca por tratamentos mais acessíveis e eficientes para diferentes condições patológicas é a motivação para a criação e melhoramento de fármacos e seus sistemas de liberação, cada vez mais específicos e aperfeiçoados objetivando menores efeitos adversos aos pacientes. Atualmente, a terapia fotodinâmica (TFD) se destaca dentre as alternativas de tratamento para infecções bacterianas, condições dermatológicas e até oncológicas.

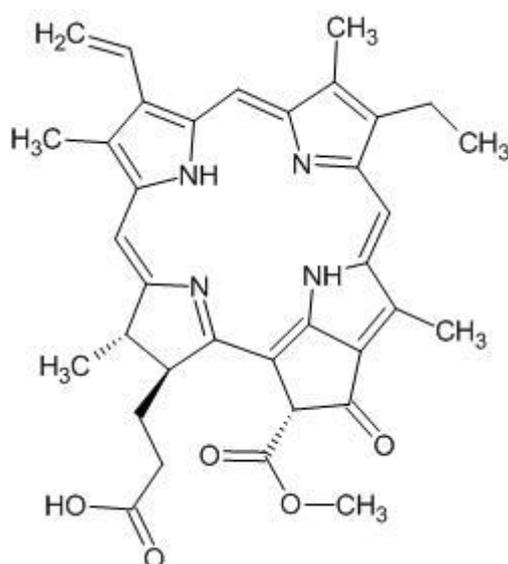
A TFD é pouco invasiva¹ e utiliza como componente algo simples como a luz, sendo que a mesma tem sido usada há 3000 anos atrás nas antigas civilizações do Egito, Índia e China para o tratamento de doenças como câncer de pele e vitiligo². O tratamento de doenças utilizando a luz, conhecido como fototerapia, foi explorada por Niels Finsen através de diversas abordagens que o fizeram ganhar o Nobel em 1901.² Além disso, a utilização de moléculas oriundas de matérias-primas naturais como fotossensibilizador (FS) pode trazer ainda mais benefícios para o paciente, seja pela sua possível biocompatibilidade, devido à similaridade das estruturas, e/ou fácil obtenção, o que resultaria em um possível baixo custo.

Vários derivados de porfirinas e seus complexos metálicos possuem a capacidade de uma forte absorção de luz na janela fototerapêutica e essa energia absorvida pode ser utilizada em processos fotofísicos, tais como a sua investigação como um FS ou em processos fotoquímicos, como a geração de oxigênios singlete em tecidos biológicos. Por esses motivos, a química destas moléculas têm sido bastante estudada.³

O Feoforbídeo *a*, **Figura 1**, é um derivado de porfirina oriundo do produto de degradação da Clorofila *a*. Tem propriedades fotofísicas de interesse para a TFD, tais como a absorção máxima dentro da janela

fototerapêutica, que possibilita a penetração na pele sem prejudicar tecidos saudáveis; alto rendimento quântico de oxigênio singlete (0,60⁴); alto tempo de vida do estado excitado e alto tempo de vida de oxigênio singlete gerado⁴. Estudos com o feoforbídeo *a* mostram a sua eficiência como um FS na TFD, sendo possível participar em atividades antitumorais,^{5,6} bactericidas,⁷ antiinflamatórias⁸ e inseticidas.^{5,9} A obtenção de maiores rendimentos quânticos de oxigênio singlete é possível através da complexação do feoforbídeo *a* com diferentes metais, tais como o zinco e paládio, pois favorecem o cruzamento intersistema (CIS)³ e conseqüentemente o rendimento quântico do estado triplete, permitindo a possibilidade de maiores reações com o oxigênio para a formação do oxigênio singlete, o produto mais importante para a TFD.

Figura 1. Estrutura da molécula do feoforbídeo *a* – Um FS com potencial para TFD



Assim, a modificação de fotossensibilizadores (FS) pode ser adotada para obtenção de uma eficiência fotodinâmica maior. O presente trabalho tem como estratégia a preparação de dois FS, complexado com íon zinco (II) e o íon paládio (II) para aumentar a eficiência nos seus processos fotodinâmicos, sendo possível a sua investigação como FS para a TFD.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiação eletromagnética e sua interação com a matéria

A radiação eletromagnética (fótons) é uma forma de energia que pode ser caracterizada em termos de um comprimento de onda. O conjunto desses comprimentos de onda compõe o que se conhece por espectro eletromagnético. A equação de Planck, **Equação (1)**, relaciona o comprimento de onda (λ) com a energia de um fóton (E), onde h é constante de Planck e c é a velocidade da luz.¹⁰

$$E = h \cdot \left(\frac{c}{\lambda}\right) \quad (1)$$

Uma molécula, ao receber uma determinada quantidade de energia (fótons) na forma de radiação, pode sofrer uma excitação passando de um nível de mais baixa energia (fundamental, S_0) para um nível excitado (S_1). O tempo na qual essa molécula pode se manter nesse estado excitado é chamado de tempo de vida. O relaxamento deste sistema, isto é, seu retorno ao estado fundamental, pode ocorrer de duas formas:

- **Transição não radiativa**, como uma conversão interna (IC) e conversão intersistema (CIS). Na IC ocorre uma mudança de estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin e de estados vibrônicos liberando calor³. Na CIS ocorre a mudança do estado singlete (S_1) para estado triplete simbolizado por T_1 .¹¹
- **Transição radiativa**, como a emissão direta de luz absorvida ($S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$) (fluorescência), e a emissão de luz de um estado triplete excitado ($S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$) (fosforescência).¹²

Os nomes “singlete” e “tripleto” surgem da multiplicidade de spin em que os elétrons da molécula se encontram e pode ser calculado. Para isso, primeiramente, somam-se todos os momentos angulares de spin da molécula, dando o spin total (S). Como exemplificado na **Figura 2(a)** para um estado singlete tem-se S igual à zero, isso porque os momentos angulares de spin são $+1/2$ e $-1/2$. Em um estado tripleto, tem-se um spin total de um ($S = 1$), como descrito na **Figura 2(b)**.

Figura 2. Exemplo usando parte do diagrama de orbital molecular – (a) Spin total igual à zero



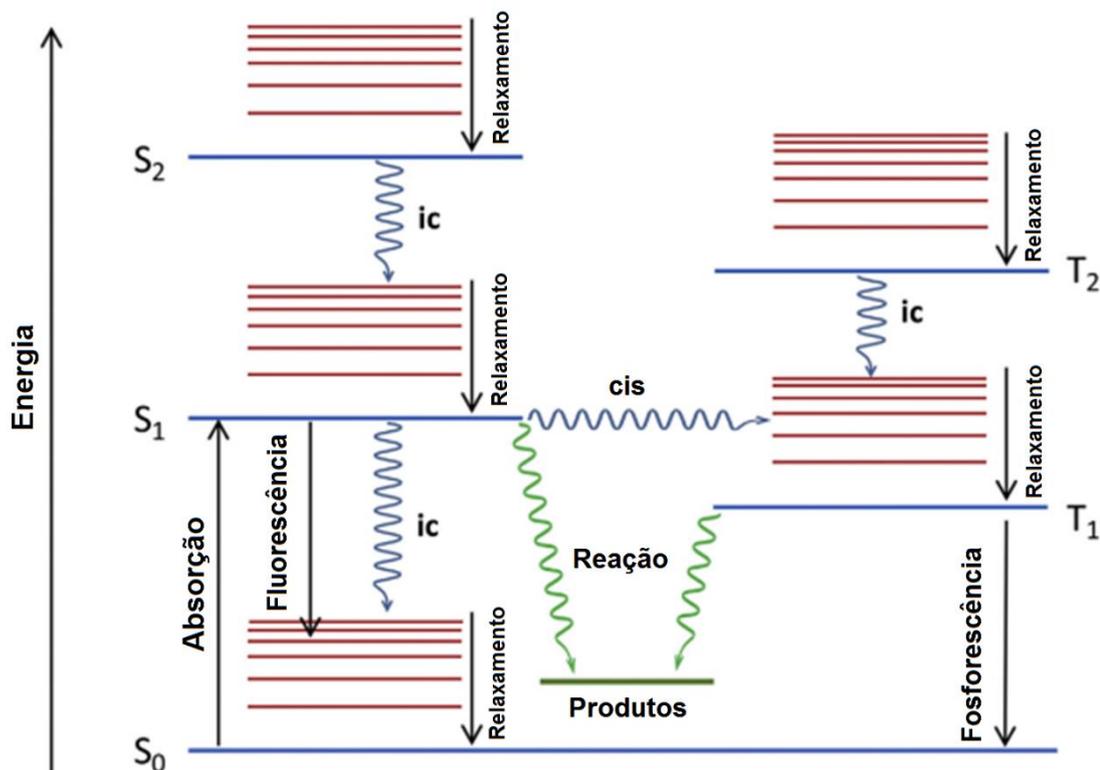
Em seguida multiplica-se o valor de S por 2 e soma 1, **Equação (2)**:

$$\text{Multiplicidade de spin} = 2S + 1 \quad (2)$$

O resultado será igual a 1 caso seja um estado singlete e será igual a 3 se for um estado triplete

A absorção de um fóton e as formas de relaxamento podem ser visualizadas de forma mais simples pelo diagrama Perrin–Jablonski^{11,13,14,15} (**Figura 3**). Onde o sentido da energia está na vertical e as multiplicidades dos níveis de energia estão na horizontal.

Figura 3. Diagrama de Perrin–Jablonski (traduzido do artigo).¹⁵



Pelo diagrama, temos uma espécie no estado fundamental com dois elétrons emparelhados (spins opostos) no estado singlete S_0 . Quando a molécula absorve um fóton, seu estado é mudado de S_0 para S_1 devido um de seus elétrons emparelhados ter sido excitado para um nível maior de energia. Não há uma mudança de multiplicidade neste processo, pois o momento angular de spin do elétron excitado se conserva. No estado S_1 podem ocorrer:

- Uma CIS, transição $S_1 \rightarrow T_1$ através da mudança do momento angular de spin de um dos elétrons (transição não radiativa);
- Uma IC, transição S_1 em níveis vibracionais de menores energias emitindo calor (transição não radiativa);
- A transição $S_1 \rightarrow S_0$, emitindo luz (fluorescência - transição radiativa), a qual pode ser detectada através de um fluorímetro e

analisada através de um espectro de emissão. A diferença na posição da banda máxima de absorção com o máximo do espectro de emissão é chamada de deslocamento de Stokes($\Delta\nu$);

- Possíveis reações com outras moléculas, como é discutido na seção 2.2.1.

No estado T_1 também podem ocorrer:

- A transição $T_1 \rightarrow S_0$, emitindo luz (fosforescência)
- A reação com um composto. Na seção 2.2.1 os mecanismos foto-oxidativos são apresentados.

A razão entre o número de fótons (ou espécies) produzidos para um processo de interesse (ex: número de fótons que a molécula emitiu; número de moléculas que foram para o estado T_1 ; número de moléculas degradadas pela luz) pelo número fótons absorvidos pela molécula é definido como Rendimento Quântico (Φ), **Equação (3)**.¹⁶ Por exemplo, quando se avalia o processo de emissão do estado S_1 para o estado excitado ($S_1 \rightarrow S_0$), tem-se o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F). Caso $\Phi_F \approx 1$, ou seja $\approx 100\%$, a maior parte dos fótons absorvidos estão sendo usados para emissão de luz ao voltar do estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$). Caso $\Phi_F \approx 0$ maior parte dos fótons absorvidos estão sendo usados para transições não radiativas como, por exemplo, uma transferência de calor ao meio.¹²

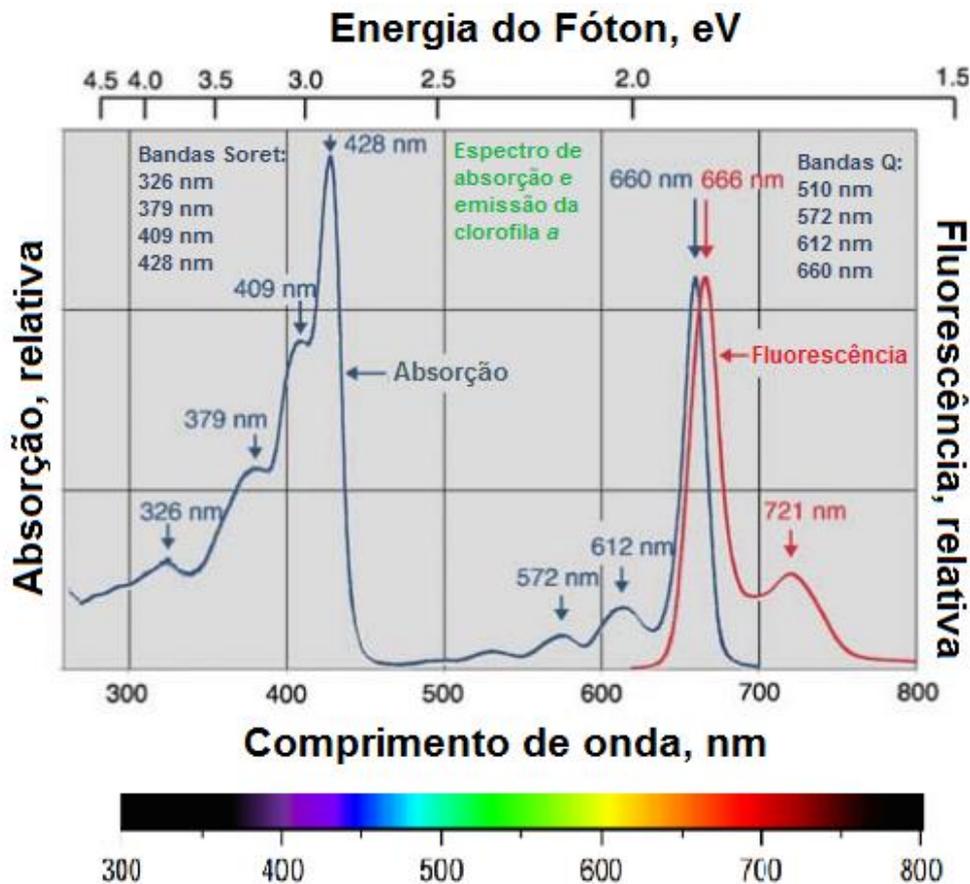
$$\Phi = \frac{\text{Número Fótons ou espécies utilizados}}{\text{Número Fótons Absorvidos}} \quad (3)$$

2.1.1 Banda Soret e Bandas Q

As bandas Soret e Q surgem no espectro de absorção de moléculas com um sistema de conjugação de elétrons π , como as porfirinas. As bandas de menor intensidade são chamadas de bandas Q, se encontram na região do vermelho (~600-700 nm) do espectro. A menor intensidade destas bandas é devido à baixa energia necessária para excitar os elétrons ($S_0 \rightarrow S_1$). As bandas

de maior intensidade são chamadas de bandas Soret, se encontram na região do azul (~400-500 nm) no espectro, ocorrendo devido à excitação da molécula no estado fundamental para o estado S_2 ($S_0 \rightarrow S_2$).¹⁷ Um exemplo da distinção das bandas Soret e Q é mostrada no espectro de absorção da clorofila a (Figura 4).¹⁸

Figura 4. Espectros de emissão e absorção da clorofila a. As bandas Q (lado direito) se encontram na região do vermelho, com menor intensidade e requerem menor energia para excitar. As bandas Soret (lado esquerdo) se encontram na região do azul, com maior intensidade e requerem maior energia para excitar (adaptado do artigo Björn et.al. ¹⁸).



2.2 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na ativação de moléculas fotossensíveis pela incidência de luz em presença de oxigênio.¹ Moléculas fotossensíveis são capazes de gerar reações em outras moléculas na presença de luz.¹⁹ Após absorver fótons em um determinado comprimento de onda, o estado fundamental singlete do fotossensibilizador (^1FS) é promovido para um estado excitado de maior energia ($^1\text{FS}^*$).²⁰ O fotossensibilizador (FS) no estado S_1 pode então sofrer uma conversão intersistema e mudar seu spin o estado triplete (T_1), reagindo com oxigênio molecular do meio (tripleto em seu estado fundamental). Este processo acaba por gerar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio (EROS), de acordo com seu mecanismo tipo I e tipo II.²¹ A geração de oxigênios singlete é de interesse para a TFD, pois a molécula permite a destruição de um alvo biológico de interesse (Mais sobre o oxigênio singlete e os alvos biológicos estarão na sessão 2.2.2).²²

2.2.1 Mecanismos de formação espécies de oxigênio

O início das reações tipo I e tipo II começam pela ativação do FS por luz indo para o estado $^1\text{FS}^*$, sofrendo conversão intersistema para o estado $^3\text{FS}^*$ em seguida temos as seguintes possibilidades:

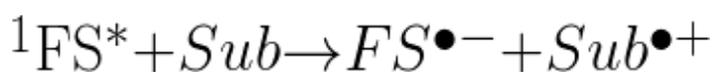
I) Tipo I:

A reação tipo I envolve a formação de radicais livres ou íons de radicais (EROS) através da reação do FS com um substrato, que pode ser uma membrana celular ou outra molécula² (desde que ela esteja suscetível às reações de oxidação ou de redução¹⁶). Essa reação pode ocorrer de duas maneiras, através da transferência de elétron, tipo I(i), ou de hidrogênio, tipo I(ii).

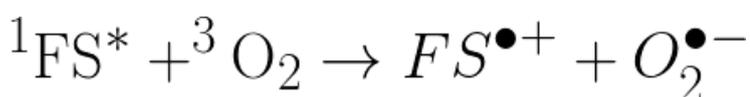
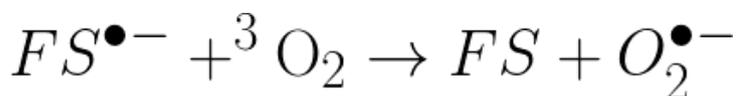
i. Tipo I(i):

Na reação tipo I(i) ocorre a transferência do elétron do substrato (Sub) para o FS excitado ($^1FS^*$), gerando o ânion radical FS ($FS^{\bullet-}$) e o cátion radical do substrato ($Sub^{\bullet+}$). Tais espécies reativas reagem rapidamente com o oxigênio molecular do meio (3O_2), podendo gerar uma mistura de espécies de oxigênio como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual pode sofrer outras reações e formar o ânion hidroxila ($OH^{\bullet-}$). A subsequente reação destes radicais com componentes celulares leva ao dano oxidativo (ou stress oxidativo) destas estruturas, ex: ácidos graxos e outros lipídeos. O esquema destas reações são descritos na **Figura 5**.¹⁶

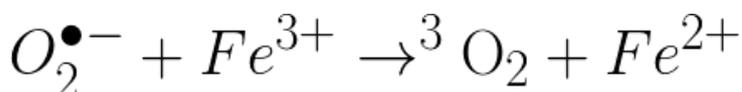
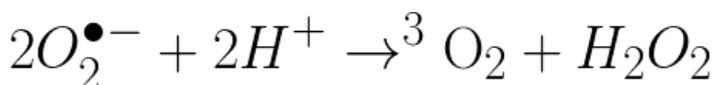
1) Reação Tipo I(i):



2) Reação de formação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$):



3) Superóxido reagindo com o organismo:



4) Reação de formação do radical hidroxila (OH^{\bullet}):



5) Reação de formação de oxigênio singlete:

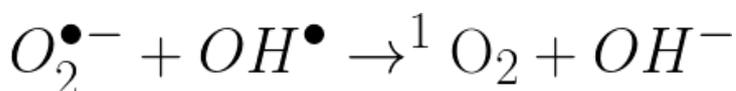
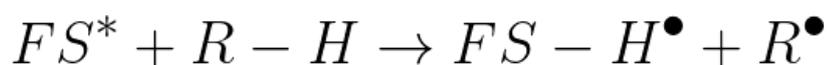


Figura 5. Esquema da reação tipo I(i) e a sequência de reação com seus produtos

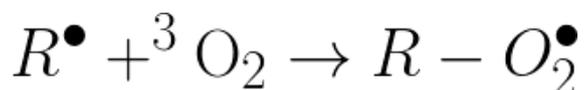
ii. Tipo I(ii)

Na reação tipo I(ii) ocorre a transferência do hidrogênio do substrato (R-H) para o FS excitado ($^1FS^*$), gerando o radical ($^1FS-H^\bullet$) e o radical do substrato (R^\bullet). Onde novamente essas espécies reativas reagem rapidamente com o oxigênio do meio (3O_2), podendo gerar uma mistura de intermediários de oxigênio incluindo os peróxidos reativos. Esquema das reações se encontra na **Figura 6**.¹⁶

1) Reação tipo I(ii)



2) Reação do radical substrato (R^\bullet).



3) Reação de formação do radical substrato através do próprio substrato

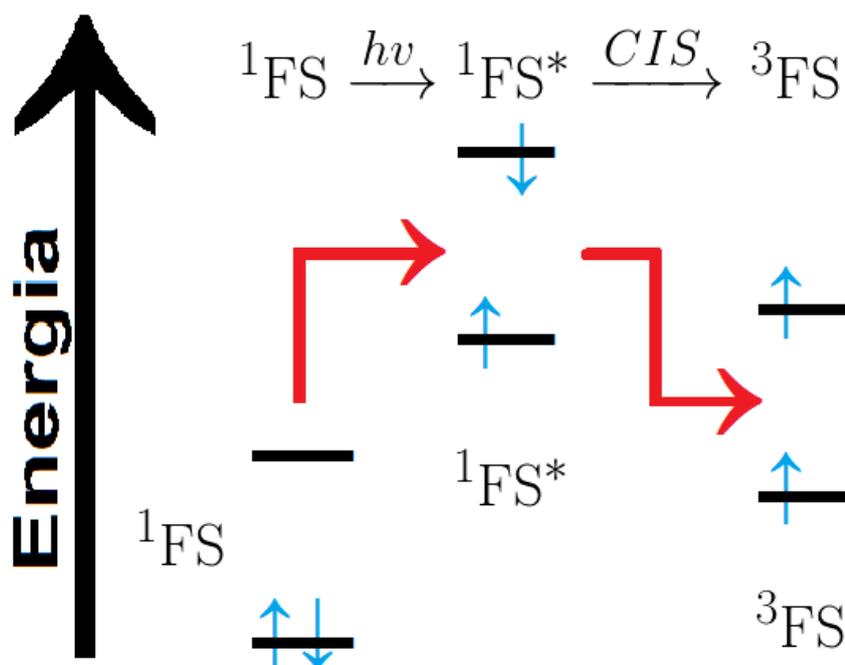


Figura 6. Esquema da reação tipo I(ii) e a sequência de reação com seus produtos

II) Tipo II

A reação tipo II envolve a formação de oxigênio singlete através da transferência de energia do FS para o oxigênio. O FS, em seu estado fundamental singlete (^1FS), absorve a radiação indo para o seu estado singlete excitado, $^1\text{FS}^*$, em seguida ele relaxa essa energia absorvida de forma não radiativa, através de uma conversão intersistema (CIS) mudando sua multiplicidade para seu estado triplete (^3FS) como mostrado no esquema abaixo (**Figura 7**):^{23,16}

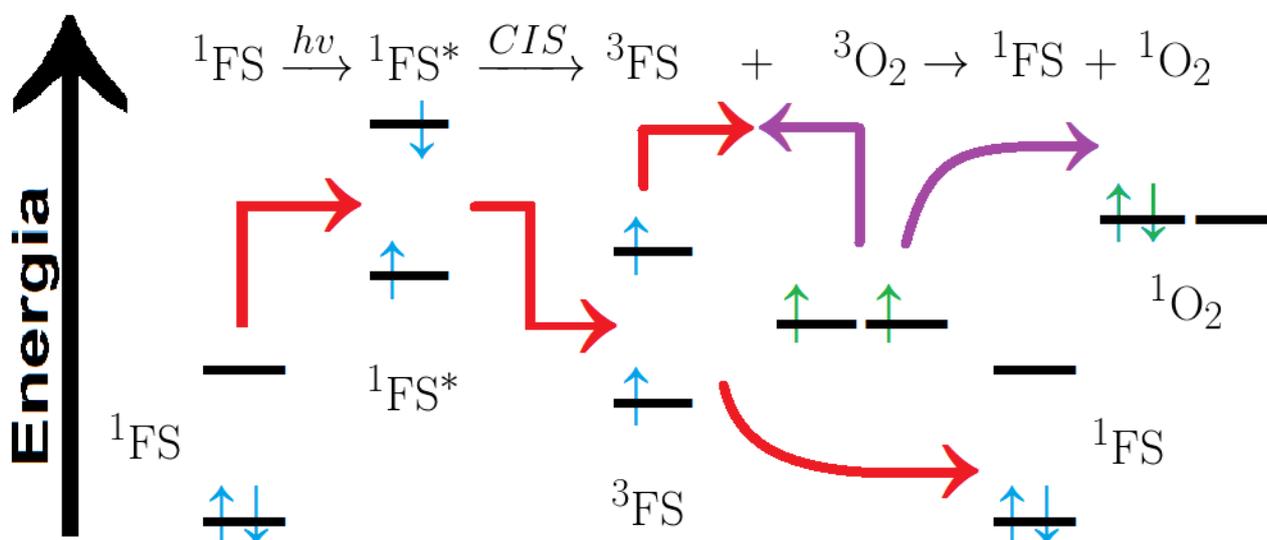
Figura 7. Esquema representando as etapas da mudança do estado do FS de singlete para triplete incluindo os níveis de energia genéricos de cada estado e seus spins. O esquema é meramente ilustrativo e não representa as transições eletrônicas.



No estado triplete, ^3FS , o FS pode colidir com a molécula de oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) ocorrendo o processo de transferência de energia chamado de aniquilação triplete-triplete, gerando ^1FS e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).¹⁶ A aniquilação triplete-triplete ou transferência de energia triplete-triplete é um processo onde ocorre a transferência de energia de um doador eletronicamente excitado no estado triplete para um aceptor no estado triplete,

produzindo um acceptor eletronicamente excitado.¹⁹ O esquema de todo o processo da reação tipo II pode ser visto na **Figura 8**.

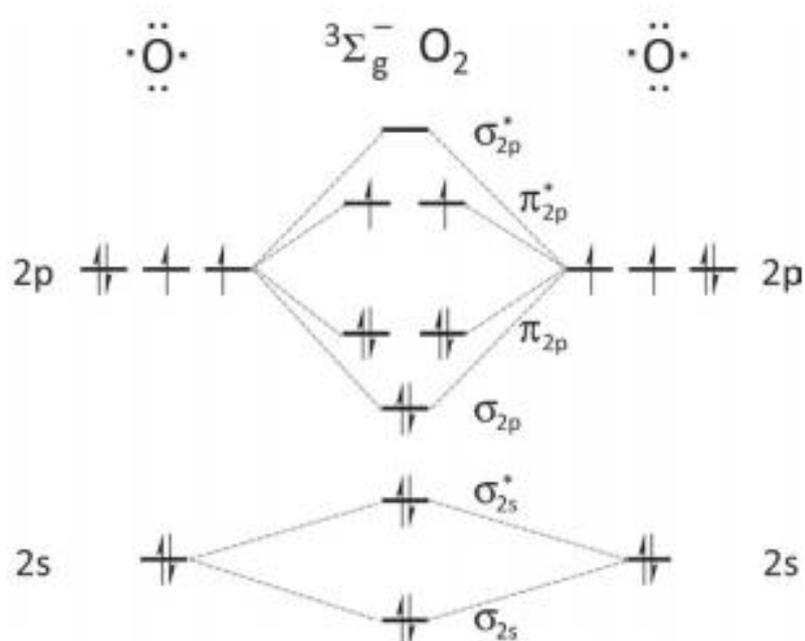
Figura 8. Esquema de todas as etapas da reação tipo II mostrando os níveis de energia genéricos de cada espécie e seus spins. Onde ^1FS (estado fundamental) absorve luz ($h\nu$) formando $^1\text{FS}^*$; $^1\text{FS}^*$ realiza CIS formando ^3FS ; ^3FS e o oxigênio ($^3\text{O}_2$ estado fundamental) formam ^1FS e $^1\text{O}_2$.



2.2.2 Oxigênio singlete

O oxigênio singlete é uma molécula reativa gerada pelo mecanismo tipo II. O oxigênio molecular no estado fundamental se encontra no estado triplete ($^3\text{O}_2$ ou simplesmente O_2), ao ser excitado, o oxigênio possui dois estados excitados possíveis. De acordo com a Teoria do Orbital Molecular na **Figura 9**, o oxigênio triplete (estado fundamental) possui dois elétrons degenerados. Ao excitá-lo, um de seus elétrons poderá ter duas ocupações diferentes gerando um novo estado para sua molécula.²⁰ Para descobrir qual seu estado predominante após sua excitação podemos observar os orbitais moleculares do oxigênio triplete ao ser excitado.

Figura 9. Diagrama de orbitais moleculares do oxigênio triplete.²⁴



Pelo diagrama de orbitais moleculares acima podemos analisar que ao excitar o oxigênio triplete no seu orbital molecular π^*_{2p} , temos a seguintes possibilidades de excitação (**Figura 10**):

Figura 10. Possíveis excitações do oxigênio triplete. As energias estão em relação à configuração original no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$) onde estão com energia inicial de zero

		Energias acima da energia do estado fundamental			
		ev	kJ/mol	kcal/mol	
\uparrow	\uparrow	$^1\Sigma_g^+$	1.63	157	37.5
$\uparrow\downarrow$	—	$^1\Delta_g$	0.98	94.3	22.5
\uparrow	\uparrow	$^3\Sigma_g^-$			

A configuração singlete com spins antiparalelos em orbitais diferentes designado por $^1\Sigma_g^+$ possui uma energia mais alta dos estados excitados possíveis, baixo tempo de vida (0,33 - 1,4 ms em metanol) e é indetectável em H₂O/D₂O, sendo que rapidamente relaxa para o estado excitado de menor energia ($^1\Delta_g$).²⁵ A configuração $^1\Delta_g$ possui um tempo de vida maior na ordem de micro a nano segundos em fase condensada.²⁴ Devido ao menor tempo de vida da configuração $^1\Sigma_g^+$ devido seu rápido relaxamento para configuração $^1\Delta_g$, este último é o considerado responsável pelas subseqüentes reações oxidativas e denominado unicamente neste trabalho como oxigênio singlete.

Devido a alta reatividade do oxigênio singlete, a sua geração e de EROS (radicais livres ou íons de radicais provenientes da reação tipo I) em um meio biológico possuem várias aplicações na TFD que incluem a morte de células cancerígenas ou bacterianas.^{2,23,26,27,28,29,30,31} Os mecanismos de ação do oxigênio singlete incluem reações de Diels-Alder de dienos (cicloadição [2+4]) para formar endoperóxidos (anéis com ligações -O-O-), reações eno com alcenos formando peróxidos em posições alila, e reações de cicloadição [2+2] em alcenos rico em elétrons e estericamente impedidos ou sem hidrogênios alílicos.³²

2.3 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores ao longo do século XX e XXI foram classificados por gerações, onde cada nova geração envolvia novas moléculas que solucionavam os problemas da geração anterior. A primeira geração de moléculas inclui:

- “Derivado de Hematoporfirina” (HdP). Uma mistura de porfirinas produzida através da adição de uma base na hematoporfirina acetilada.
- *Photofrin*®. Um HdP na forma de oligômeros chamada de Porfímero de Sódio.³³

O problema da primeira geração é que as moléculas possuem uma baixa absorção em 630 nm ou acima, como no caso da Photofrin, e também podem ocasionar irritação ou coceira em pacientes com sensibilidade na pele.^{16,34,35,36,37} Apesar do Photofrin absorver em diversos comprimentos de onda entre 400 nm e 650 nm, possui uma baixa absorção (baixo coeficiente molar) em 630 nm, a qual é a mais utilizada para excitar o FS, já que a penetração da luz aumenta com o aumento do comprimento de onda de acordo com a janela fototerapêutica.³⁸ Apesar desta limitação o Photofrin foi o primeiro FS usado como medicamento aprovado pela *US Food and Drug Administration* (agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) e ainda é utilizado para tratamento profilático de câncer de: bexiga, esôfago, pulmão, trato digestivo e urinário^{30,39} pois mesmo com as limitações o medicamento pode ser eficiente em certos tratamentos.

A segunda geração segue para resolver os problemas como a hidrossolubilidade dos FS de primeira geração. Alguns deles são: *meso*-tetra-hidroxiifenil-clorina (*m*THPC)(Foscan[®], Temoporfin),^{40,41} Bacteriofeoforbídeo de paládio (TOOKAD[®]),⁴² Mono-L-aspartil clorina e6 (NPe6),⁴³ Ácido 5-Aminolevulínico (Levulan[®]) (aumenta a geração da protoporfirina IX).⁴⁴

Como mencionado acima, os FS descritos acima possuem sua baixa solubilidade aquosa, gerando agregação dos mesmos,⁴⁵ e diminuindo suas atividades fotoquímicas e físicas importantes para TFD, além de diminuir sua retenção em células desejadas e impedindo seu transporte pela corrente sanguínea.⁴⁶ Porém, o FS deve possuir uma certa hidrofobicidade para que seja capaz de atravessar membranas lipídicas para ir nas células.⁴⁶

As formas de contornar o problema de solubilidade é torná-las mais hidrofílicas ao incorporá-las em um sistema adequado que possa se difundir melhor pelo meio, como o uso de nanopartículas,⁴⁷ sistemas de dispersão em óleo, sistemas lipossômicos, polímeros ligados ao FS ou inserção de cadeias hidrofílicas.

2.3.1 Fotossensibilizadores Ideais

Na TFD busca-se um FS que absorva a luz e reaja com o oxigênio do meio para gerar espécies reativas de oxigênios. Para que esse percurso seja o mais proveitoso, eficiente e com o mínimo de efeitos indesejados analisa-se em cada etapa o comportamento do FS às interações externas (ex: luz, oxigênio, tecido humano) e sua estrutura (ex: estabilidade, solubilidade). Logo, compara-se o FS a ser investigado com um FS ideal, analisando seus requisitos de idealidade, que são:

1) Propriedades Fotofísicas:

- a) Alta absorção - alto coeficiente de absortividade molar ($\epsilon, cm^{-1} mol^{-1} L$) - dentro da faixa de ~600-850 nm para uma maior penetração no tecido,^{48,49} esta região é chamada de janela fototerapêutica;³
- b) Alto rendimento quântico de formação de FS no estado triplete ($\Phi_T \geq 0,5$);^{16,49}
- c) Longo tempo de vida do FS no estado triplete (τ_T).¹⁶ Pois somente FS com grande τ_T podem gerar quantidades elevadas de oxigênio singlete;¹⁷
- d) Alta energia do estado triplete ($\geq 94 KJ mol^{-1}$).¹⁶

2) Propriedades Fotoquímicas

- a) Alto rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_\Delta \geq 0,5$),^{16,48}
- b) Baixo fotobranqueamento ou fotodegradação (para manter a eficiência durante o tratamento) ou como outra alternativa o fotobranqueamento rápido (“rapid photobleaching” para que o tratamento se torne auto limitante (“self-limiting”).⁴⁸

3) Propriedades Químicas^{16,48,49}

- a) Alta estabilidade.
- b) FS seja uma única molécula e esteja na forma pura;
- c) Síntese seja fácil e de baixo custo;
- d) Razoável hidrossolubilidade, permitindo transporte no organismo.

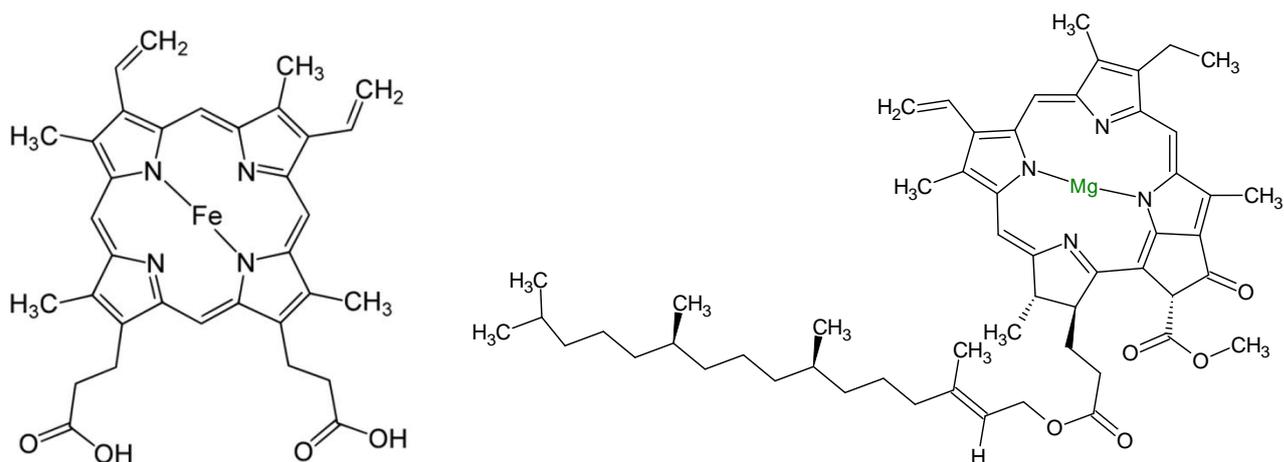
4) Propriedades Biológicas^{16,48,49}

- a) Baixa toxicidade na ausência de luz;
- b) Maior retenção no tecido desejado (ex. célula cancerígena).

2.4 Porfirinas

As porfirinas são moléculas em que possuem em sua estrutura quatro grupos pirrólicos (heterocíclico aromático de cinco membros, quatro carbonos e um nitrogênio).⁵⁰ São mais conhecidas por estarem nas estruturas de folhas de plantas em moléculas de clorofila (*a* e *b*) e no sangue, na estrutura da hemoglobina como grupo heme (**Figura 11**), em que ambas são pigmentos e são produzidas pelo mesmo caminho metabólico.⁵ Na área medicinal, elas ganharam um reconhecimento especial na TFD devido a sua aplicabilidade em eliminar células tumorais e na inativação fotodinâmica de microrganismos (PDI), através da produção de oxigênio singlete,³⁵ na atividade de nuclease e fotonuclease, terapia gênica e interações de proteínas.²³

Figura 11. Estrutura do grupo heme (esquerda) e estrutura da clorofila *a* (direita).



2.4.1 Metaloporfirinas

A utilização de novos FS com novos grupos funcionais, formas de encapsulamento, aumento de cadeias e adição de diferentes metais têm como

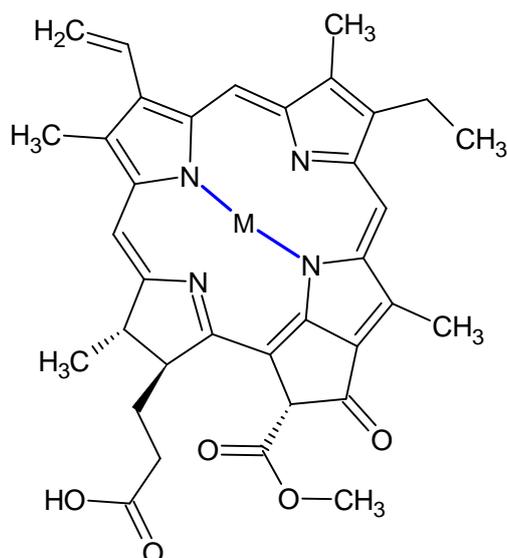
objetivo tornar o FS mais próximo do ideal, possivelmente a tornar-se um possível fármaco com importância medicinal na TFD. As metaloporfirinas são moléculas de porfirinas complexadas a um metal. A inserção deste metal altera suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas e se torna uma alternativa interessante na otimização de FS existentes. Neste sentido, pode-se citar o maior rendimento quântico de oxigênio singlete.

Como visto anteriormente, o cruzamento intersistema (CIS) é a conversão de multiplicidade (ex: singlete para triplete), porém ela é uma transição proibida pela regra de seleção de spin. O que aumenta a probabilidade desta transição é o acoplamento spin-órbita, já que este acoplamento possibilita uma pequena interação entre estados com diferentes multiplicidades.¹³ O acoplamento spin-órbita é um efeito relativístico que surge da interação entre o momento magnético de spin do elétron e o campo magnético gerado pelo movimento do núcleo. Como este campo magnético nuclear depende da carga do núcleo, quanto maior for o número atômico, maior será o acoplamento spin-órbita.⁵¹

Para TFD, este efeito é de grande interesse pois irá gerar mais moléculas de FS no estado triplete, por consequência mais FS disponíveis para reagir com o oxigênio, gerando um maior rendimento quântico de oxigênio singlete (Tipo II).^{52,53} A interação do acoplamento spin-órbita se torna maior com o aumento do número atômico, chamado de efeito do átomo pesado.¹³

Neste trabalho busca-se compreender a importância do metal complexado a uma porfirina (feoforbídeo) com relação a propriedades fotofísicas e fotoquímicas do fotossensibilizador. A compreensão destes dados será importante para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores eficientes.

Figura 12. Molécula de feoforbídeo a complexando o íon M^{2+} .



3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Obtenção de feoforbídeo *a* e derivados metalados e posterior caracterização de suas propriedades fotofísicas.

Objetivos específicos

- (i) Obtenção do feoforbídeo *a* a partir do agrião;
- (ii) Síntese de derivados metalados com íon zinco (II) e o íon paládio (II);
- (iii) Caracterização das propriedades fotofísicas das moléculas sintetizadas, como: deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$); constante de velocidade de fotobranqueamento (k) e rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F).
- (iv) Melhorar a eficiência de um FS derivado da clorofila *a* através da inserção de metais de Zinco e Paládio.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

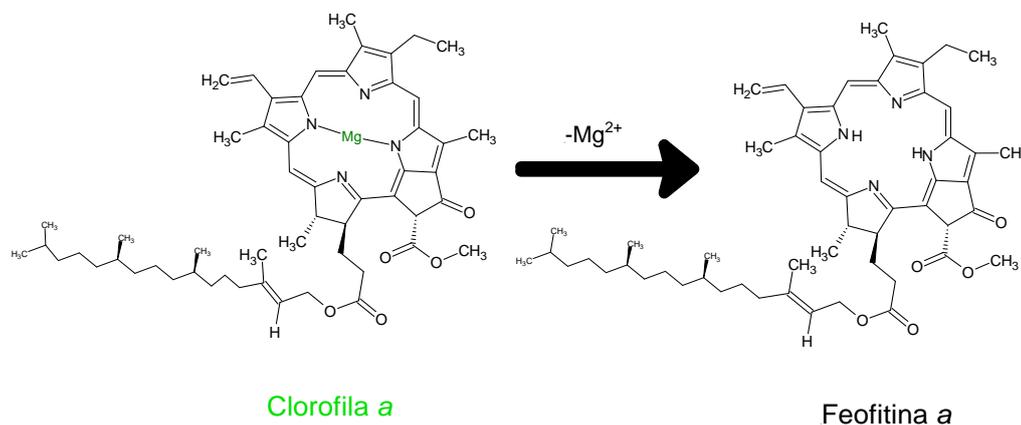
Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados reagentes e solventes comercialmente adquiridos disponíveis no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais (LACFI) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do extrato e da feofitina a síntese e caracterização do feoforbídeo a e derivados de paládio e zinco

Obtenção do extrato do agrião e feofitina a: A partir do agrião (*Nasturtium officinale*), 98,0582 g de suas folhas foram retiradas e suspensas em metanol:éter de petróleo (2:1). Em seguida, foi realizado uma extração líquido/líquido usando éter etílico:éter de petróleo (1:1). A fase orgânica é separada e o solvente éter de petróleo é evaporado obtendo pigmentos. Os pigmentos do extrato formados são separados por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60Å, 70-230 mesh, com eluente de éter de petróleo:etanol (95:5). Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, obtém-se a feofitina a, um sólido verde escuro.

Figura 13. Reação e estrutura da clorofila a formando feofitina a.



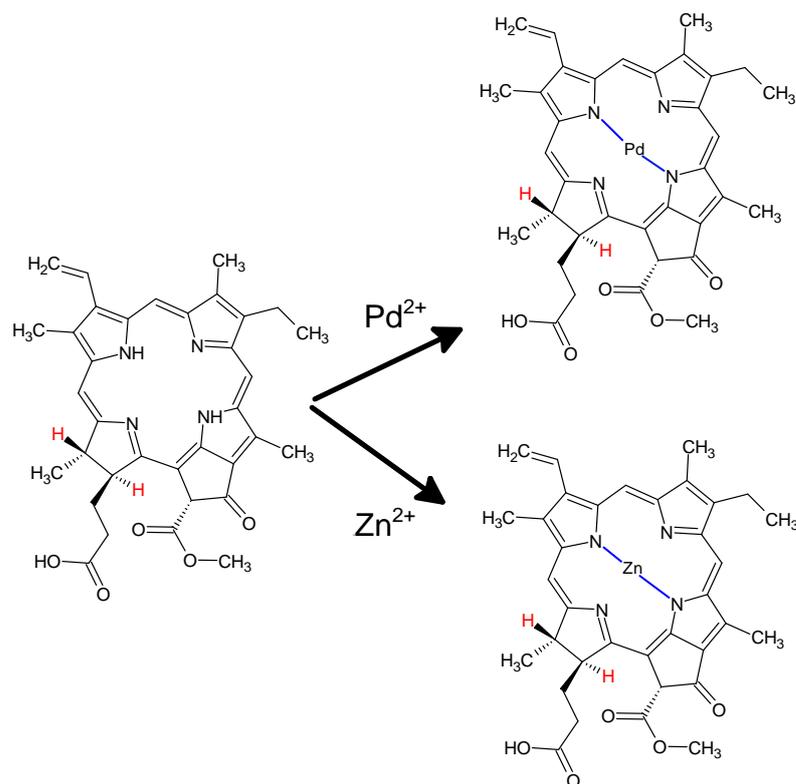
Obtenção do feoforbídeo a - remoção do grupo fitol da feofitina a: A partir da feofitina *a* obtém-se o feoforbídeo *a* usando uma adaptação da metodologia estabelecida por YOU et al. (2011). 0,107 mmol de feofitina *a* são hidrolisadas utilizando 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 80%, sob agitação numa temperatura de 0°C e protegido por luz durante 1 hora. Após concentração do produto no meio, o substrato é extraído usando acetato de etila 3 vezes. A água do meio é retirada utilizando sulfato de sódio anidro que em seguida é filtrado.

A molécula de feoforbídeo *a* foi identificada utilizando o espectrômetro de massas (Applied Biosystems 3200 Q TRAP) acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies 1200 Series). A espectrometria de massas foi realizada no modo de operação de ionização por eletrospray, com íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 591 de fórmula molecular $C_{35}H_{36}N_4O_5$.

Síntese do feoforbídeo a de zinco: 0,0166 mmol do feoforbídeo *a* é dissolvido em 5 mL de diclorometano (DCM). 0,0332 mmol de acetato de zinco dihidratado é dissolvido em 5 mL de metanol, adicionado junto a solução anterior de feoforbídeo *a* e deixados em refluxo por 2 horas. Após término da reação é realizado uma purificação adicionando aproximadamente 150 mL de água e extraído com DCM. A fase orgânica formada é secada com sulfato de sódio anidro e filtrado. O solvente foi evaporado, obtendo-se um sólido escuro.

Síntese do feoforbídeo a de paládio: Em 10 mL de DCM são dissolvidos \approx 50 mg de feoforbídeo *a* e \approx 92,5 mg de acetato de paládio, misturados por 2 horas à temperatura ambiente e em seguida a solução é evaporada. O produto formado é purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel, seguida por TLC preparativa em 2% acetona/DCM.

Figura 14. Estrutura das reações de formação do feoforbídeo a de zinco e de paládio



4.2.2 Caracterização dos processos fotofísicos

A avaliação das propriedades fotofísicas do derivado do feoforbídeo, foram realizadas em diferentes solventes (água, etanol, clorofórmio). As análises foram feitas através das seguintes técnicas: espectrometria na região do ultravioleta-visível (UV-vis Varian Cary-50) e; espectrometria de fluorescência estacionária. Os equipamentos foram disponibilizados no LACFI, localizado no Departamento de Química da UFSC.

Para a determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), foi utilizado um padrão, o feoforbídeo a em etanol ($\Phi_p = 0,30^{55}$). Os espectros de absorção e emissão das amostras foram registrados. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 411 nm e a emissão foi registrada na faixa de 600 a 800 nm. Os valores de Φ_F foram calculados a partir da **Equação (4)**:¹³

$$\Phi_F = \frac{Abs_p F_d n_p^2}{Abs_d F_p n_d^2} \Phi_p \quad (4)$$

Em que, o subíndice p representa o composto padrão e o subíndice d representa o derivado feoforbídeo; Abs a absorvância em 411 nm, F a área espectro de emissão, e n o índice de refração do solvente no meio.

O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) foi calculado para os derivados nos diferentes meios pela **Equação (5)**:

$$\Delta\nu(cm^{-1}) = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{abs,max}} - \frac{1}{\lambda_{emi,max}} \right) \quad (5)$$

A qual $\lambda_{abs,max}$ e $\lambda_{emi,max}$ são os comprimentos de onda de máxima absorção (ou excitação) e emissão, respectivamente.

Para a análise da fotodegradação dos compostos na exposição de luz, foram determinados os valores da constante de velocidade dos derivados de zinco e paládio e padrão. Foi analisado o sistema do feoforbídeo *a* de zinco dissolvido nos solventes de água, clorofórmio e etanol, feoforbídeo *a* (padrão) dissolvido em etanol, e feoforbídeo *a* de paládio dissolvido nos solventes água, clorofórmio e etanol. Os sistemas foram iluminados constantemente com uma radiação de comprimento de onda de 648 nm ($P = 100$ mW). A reação de degradação dos compostos com a luz foi acompanhada pela diminuição da sua absorvância no espectrofotômetro UV-vis Varian Cary® 50 numa faixa de 350 nm a 800 nm.

4.3 Segurança no Laboratório

Todos os processos foram realizados com a adequada utilização dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como guarda-pó e luvas. Além disso, foi realizado o descarte apropriado do resíduo, separados em aquosos, orgânicos e halogenados, observando o manual de Segurança do Departamento de Química da UFSC.²⁴

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

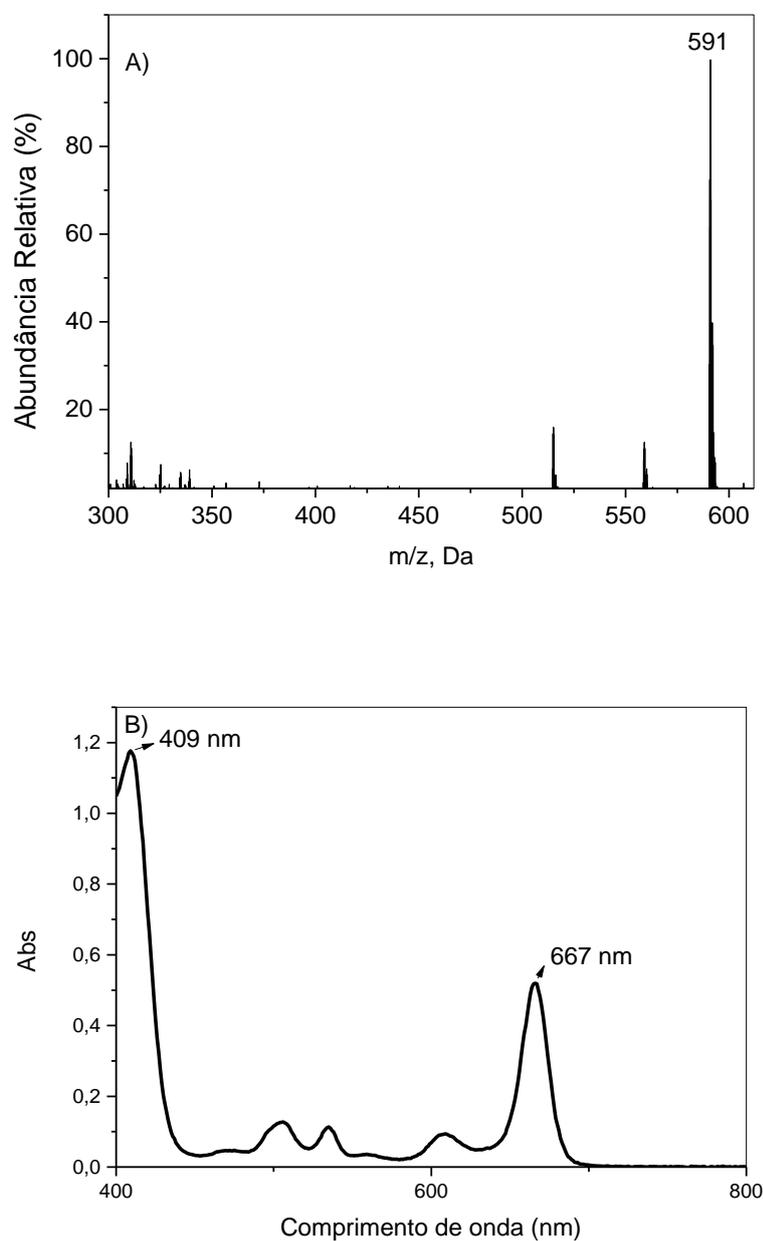
5.1 Resultados

5.1.1 Obtenção do Feoforbídeo *a* e Derivados Metalados

As moléculas de clorofila *a* e *b*, são pigmentos de coloração verde encontrados na natureza em organismos fotossintéticos,⁵⁶ onde são facilmente extraídos de plantas.⁵⁷ A clorofila (*a* e *b*) possuem em sua estrutura base a forma de uma clorina.⁵⁸

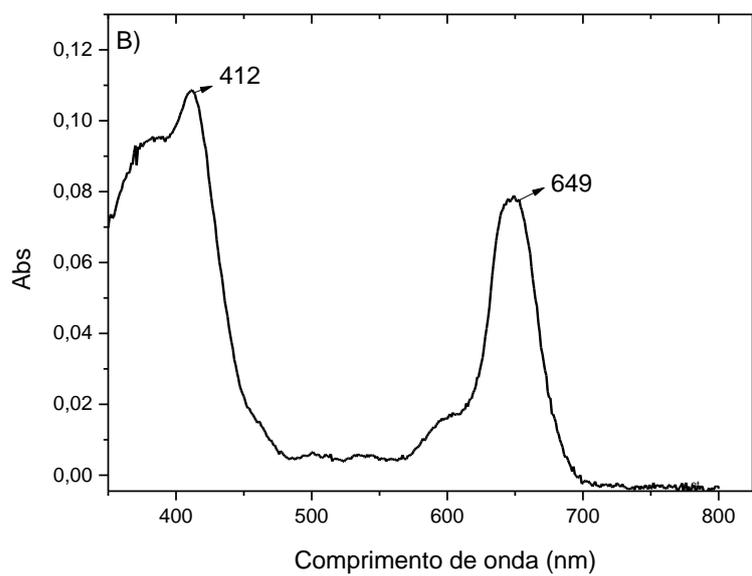
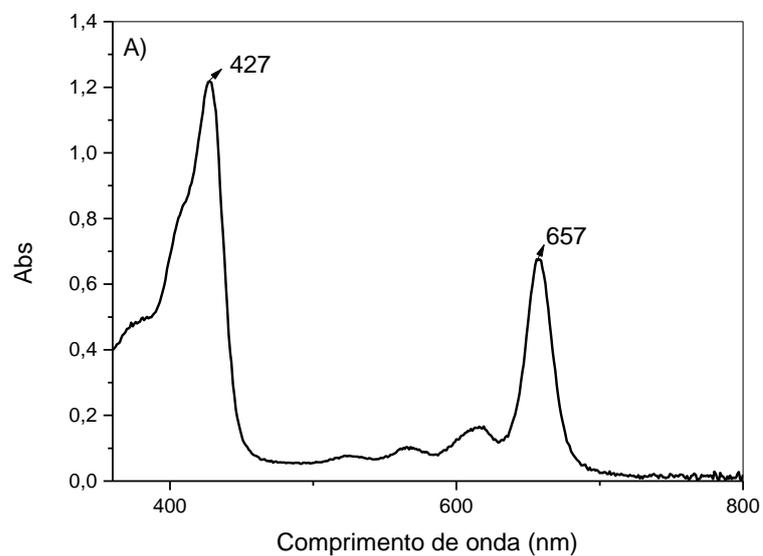
O feoforbídeo *a* foi obtido através da hidrólise ácida da feofitina *a* através da remoção do grupo fitol.^{54,59,58} A obtenção do feoforbídeo *a* foi confirmada por espectrometria de massas (**Figura 15a**), observando-se o íon molecular em 591 m/z. Adicionalmente, o espectro de absorção na região do visível apresentou o perfil característico do feoforbídeo,^{54,60} com duas bandas principais de absorção (**Figura 15b**), sendo que a banda Soret mostrou um máximo em 409 nm e a banda Q em 667 nm. A remoção da cadeia fitílica é vantajosa em TFD, pois aumenta a solubilidade da molécula em sistemas de pH fisiológico,⁸ dando à sua estrutura uma maior facilidade no transporte pela corrente sanguínea, e assim diminuindo um problema recorrente dos fotossensibilizadores de segunda geração.

Figura 15. (A) Espectro de massas do feoforbídeo a em etanol (modo de ionização ESI-) íon molecular em 591 (-1H+). (B) Espectro de absorção do feoforbídeo em acetona com Banda Soret em 409 nm e Banda Q em 667 nm.



Em adição, neste trabalho tem-se um interesse na preparação de metaloporfirinas de Zn e Pd. Os feoforbídeos de Zn e Pd foram obtidos por metodologias descritas na literatura. Os espectros de absorção são apresentados na **Figura 16**.

Figura 16. Espectros de absorção eletrônica em etanol do feoforbídeo de zinco (A) com bandas Soret em 427 nm e Q em 657 nm e do feoforbídeo de paládio (B) com bandas Soret em 412 nm e Q em 649 nm.



5.1.1 Espectros de Absorção e de Emissão em solventes de diferentes polaridades

Os espectros de emissão e de absorção para o feoforbídeo de zinco em água, clorofórmio e etanol são apresentados nas **Figuras 17, 18 e 19**.

Figura 17. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em água. Com comprimento de onda máximo em 664,0 nm no espectro de absorção e 668,07 nm no de emissão.

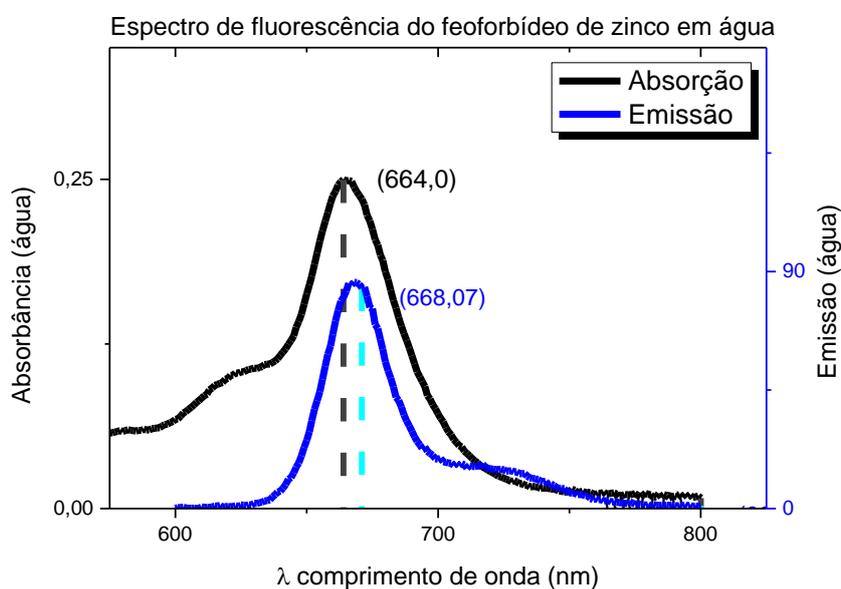


Figura 18. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em Etanol. Com comprimento de onda máximo em 659,9 nm no espectro de absorção e 666,0 nm no de emissão.

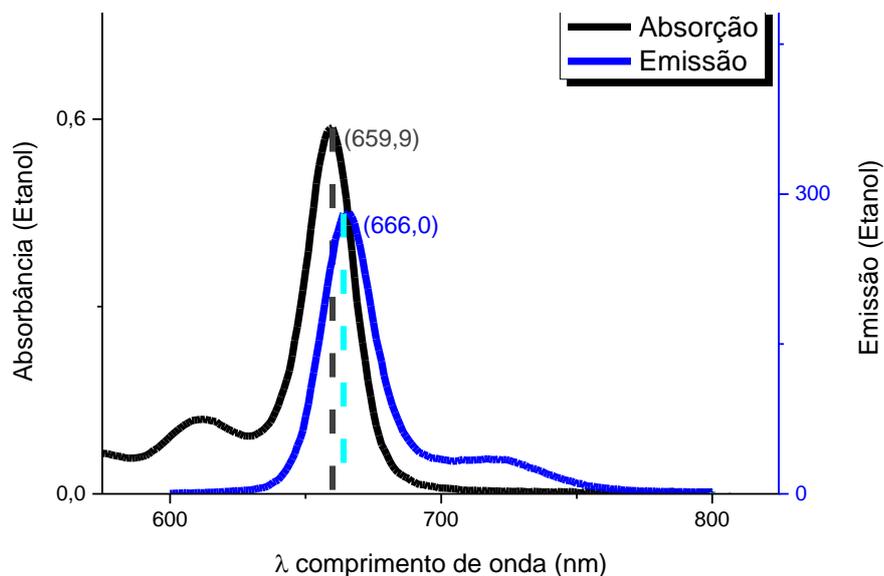
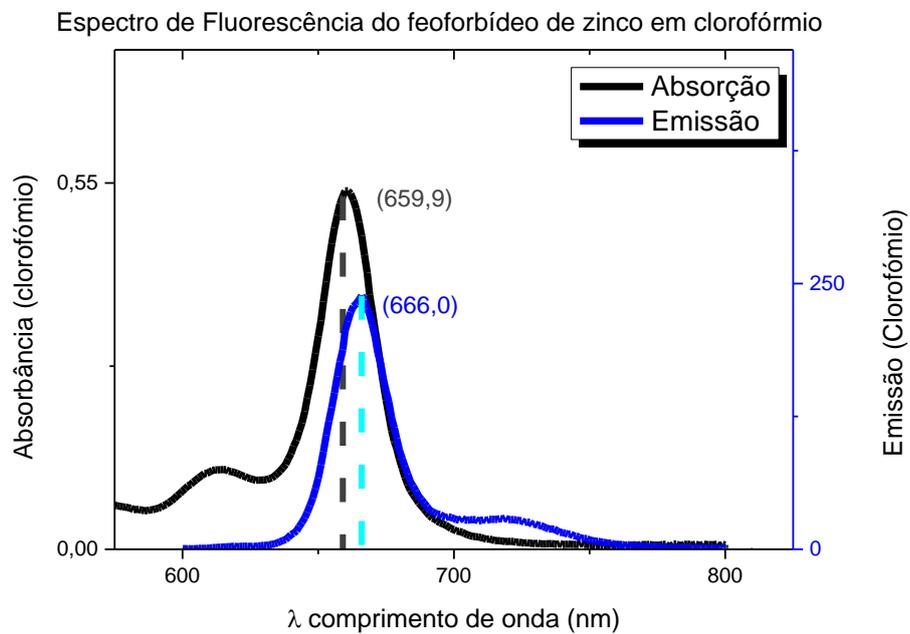


Figura 19. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de zinco em Clorofórmio. Com comprimento de onda máximo em 659,9 nm no espectro de absorção e 666,0 nm no de emissão



O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) foram calculados a partir dos dados dos espectros de absorção e emissão e da **Equação (4)** para as moléculas de feoforbídeo *a* em etanol, feoforbídeo *a* de zinco nos solventes água, clorofórmio e etanol, e para a molécula de feoforbídeo *a* de paládio em água, clorofórmio e etanol (**Tabela 1**)

Tabela 1. Valores de deslocamento de Stokes para os derivados de feoforbídeo *a*.

Molécula	Solvente	$\lambda_{abs,max}$ (nm)	$\lambda_{emi,max}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)
Feoforbídeo <i>a</i> (Padrão)	Etanol	667,06	671,99	110,0
Feoforbídeo <i>a</i> de Zinco	Água	664,0	668,07	91,75
	Etanol	659,9	666,04	139,7
	Clorofórmio	659,9	666,04	139,7
Feoforbídeo <i>a</i> de Paládio	Água	648,9	768,0	2390
	Etanol	648,9	668,0	440,6
	Clorofórmio	644,0	703,9	1321

Os espectros de absorção e emissão para o feoforbídeo de paládio são mostrados em água, etanol e clorofórmio nas **Figuras 20, 21 e 22**, respectivamente, nota-se ruído nos espectros devido à baixa capacidade do derivado de relaxar via fluorescência, que por consequência há baixa intensidade. Os valores de deslocamentos de Stokes determinados são apresentados na **Tabela 1**.

Figura 20. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em água. Com comprimento de onda máximo em 648,9 nm no espectro de absorção e 768,0 nm no de emissão.

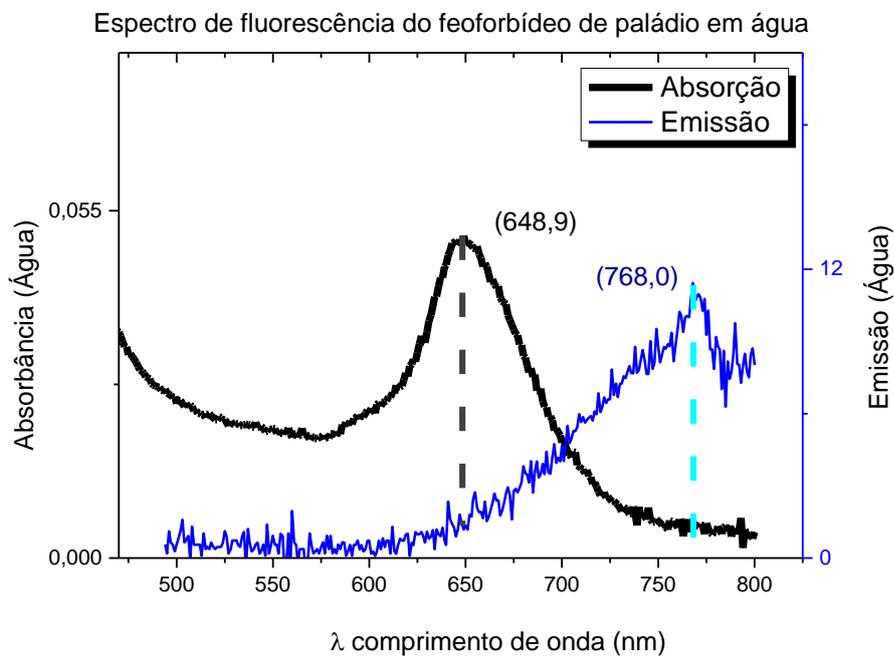


Figura 21. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em etanol. Com comprimento de onda máximo em 648,9 nm no espectro de absorção e 668,0 nm no de emissão.

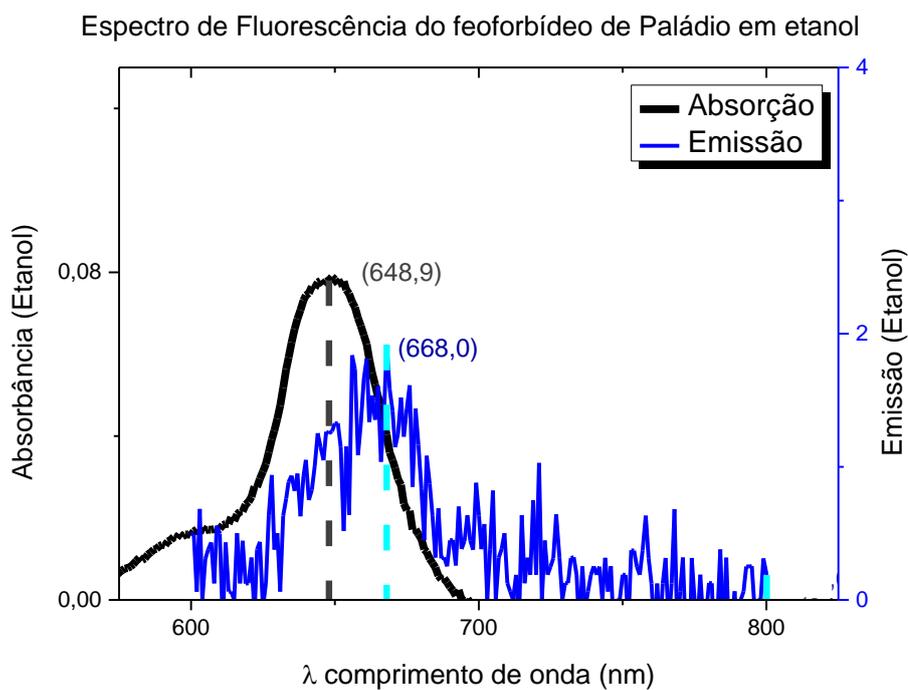
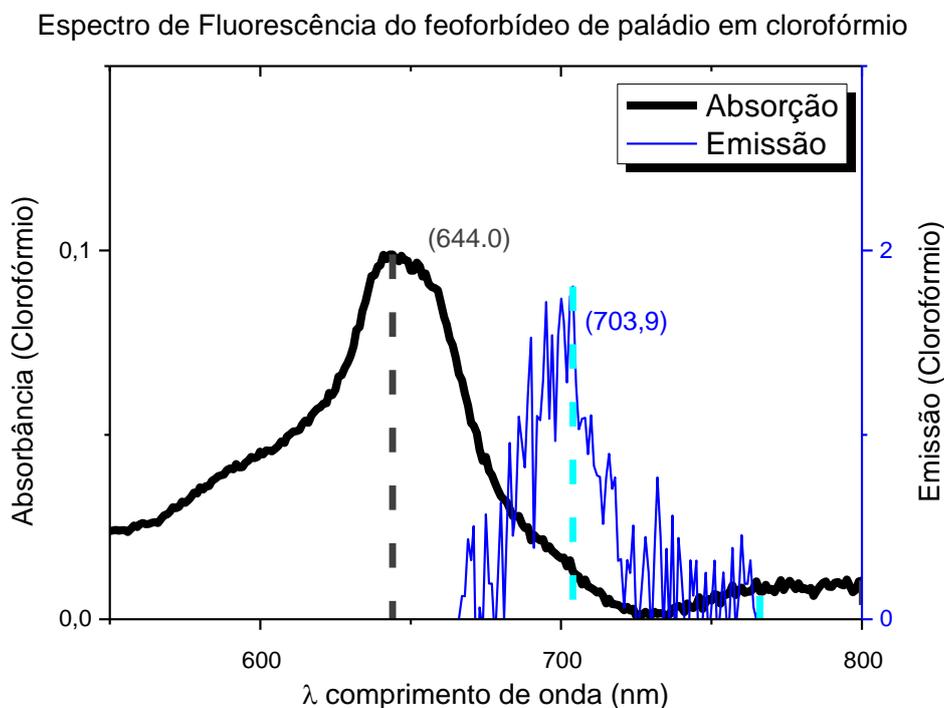


Figura 22. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo de paládio em clorofórmio. Com comprimento de onda máximo em 644,0 nm no espectro de absorção e 703,9 nm no de emissão.



5.1.2. *Rendimento Quântico de Fluorescência*

O absorvidade molar (ϵ) para o padrão e o derivado, foram determinados usando a lei de Lambert-Beer através das concentrações do feoforbídeo de zinco em água, clorofórmio e etanol na análise de absorção ($7,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e de emissão ($4,2 \times 10^{-7}$), e o padrão de feoforbídeo em etanol na análise de absorção ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e emissão ($4,2 \times 10^{-7}$). Através destes dados, determinou-se o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) do feoforbídeo de zinco e de paládio em cada solvente, utilizando o feoforbídeo *a* como padrão (**Figura 23, Tabela 2**). O rendimento quântico de fluorescência foi calculado a partir da **Equação 3**, os resultados são apresentados nas **Tabelas 3 e 4**, para o feoforbídeo de zinco e paládio, respectivamente.

Tabela 2. Dados do padrão de feoforbídeo em etanol de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_p), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_p).

	Espectro de Absorção		ϵ (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹ x10 ⁴)	Espectro de Emissão		
	$\lambda_{abs,max}$ (nm)	Abs_p (em 411nm)		$\lambda_{emi,max}$ (nm)	F_p	Φ_F
Feoforbídeo a em etanol	667,06	0,07463	7,46	671,99	-14997	0,30*

* Valor da literatura ⁵⁵

Tabela 3. Dados do feoforbídeo de zinco de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_d), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_d), absorvidade molar, rendimento de fluorescência (Φ_F).

Solvente	Espectro de Absorção		ϵ (em 411nm) (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹ x10 ⁴)	Espectro de Emissão		
	$\lambda_{abs,max}$ (nm)	Abs_d (em 411nm)		$\lambda_{emi,max}$ (nm)	F_d	Φ_F
Água	664,0	0,35241	4,58	668,07	3641,9	0,11
Etanol	659,9	0,60951	7,92	666,04	9185,8	0,17
Clorofórmio	659,9	0,62505	8,12	666,04	7814,1	0,16

Figura 23. Espectro de absorção (preto) e de emissão (azul) do feoforbídeo em Etanol (Padrão). Com comprimento de onda máximo em 667,06 nm no espectro de absorção e 671,99 nm no de emissão.

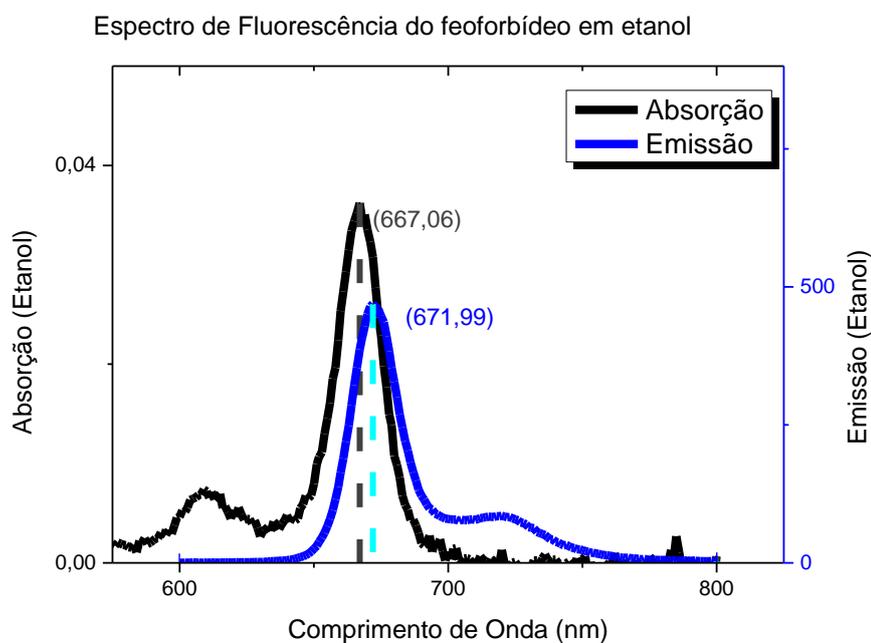


Tabela 4. Dados do feoforbídeo e de paládio, em água, clorofórmio e etanol. Valores de comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{abs,max}$), absorbância de absorção em 411 nm (Abs_d), comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{emi,max}$), área do espectro de emissão (F_d), absorvidade molar, rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).

Solvente	Espectro de Absorção			Espectro de Emissão		
	$\lambda_{abs,max}$ (nm)	Abs_d (em 411nm)	ϵ (em 411nm) (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹ x10 ⁴)	$\lambda_{emi,max}$ (nm)	F_d	Φ_F
Água	648,9	0,04420	10,5	768,0	-1029,7	0,0170
Etanol	648,9	0,05077	12,1	668,0	-92,715	0,0012
Clorofórmio	644,0	0,07056	16,8	703,9	-46,550	0,0004

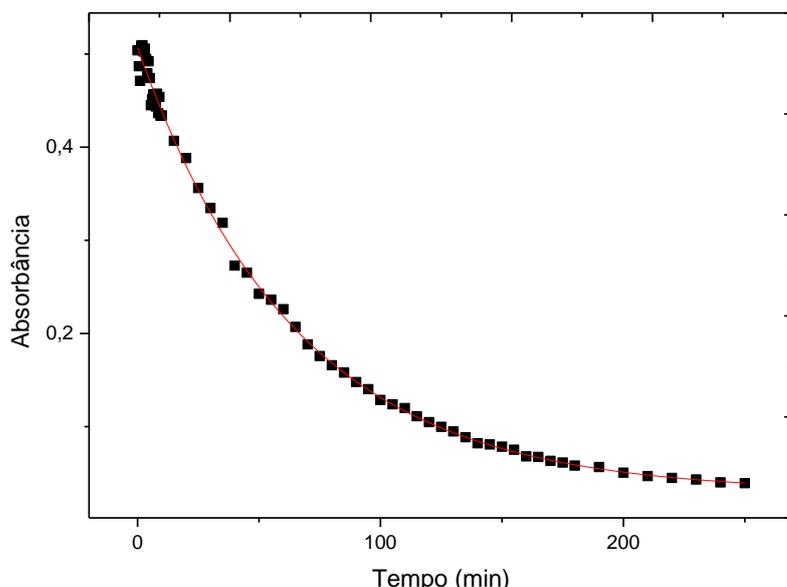
5.1.3 Avaliação das cinéticas de *Fotobranqueamento*

A partir dos dados obtidos de absorvância dos compostos em função do tempo de iluminação, obteve-se as cinéticas de fotobranqueamento das moléculas, como exemplificado para o feoforbídeo de zinco na **Figura 24**. As cinéticas foram ajustadas a um modelo de primeira ordem utilizando um ajuste exponencial da forma $y=A*\exp(-x/t)+y_0$. Os valores de constante de velocidade k obtidos são mostrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Dados de constante de velocidade para os derivados de feoforbídeo a.

Molécula	Solvente	k (min ⁻¹)
Feoforbídeo a (Padrão)	Etanol	4,52496x10 ⁻⁵
Feoforbídeo a de Zinco	Água	0,06800
	Etanol	0,01544
	Clorofórmio	0,01026
Feoforbídeo a de Paládio	Água	8,62364x10 ⁻⁴
	Etanol	0.00112
	Clorofórmio	7,18809x10 ⁻⁸

Figura 24. Cinética de fotodegradação do feoforbídeo a de zinco em etanol.



5.2 Discussão

5.2.1 Espectro de Absorção e de Emissão

Nos espectros de fluorescência do feoforbídeo de zinco tem-se uma baixa intensidade em água em comparação aos solventes de etanol e clorofórmio. Isso se deve à possibilidade de formação de agregados das moléculas do derivado em água que dificulta sua emissão.

Nos espectros do feoforbídeo de paládio tem-se uma baixa intensidade nos seus três espectros e com intensidades mais baixas que os espectros de feoforbídeo de zinco. Isso indica a possibilidade de agregação da molécula do meio nos três solventes, mas também o possível efeito do átomo pesado devido a inserção do paládio, na qual o sistema terá um aumento do relaxamento via CIS e diminuindo as outras possibilidades de relaxar, em que inclui via fluorescência.

A importância da medição do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e do deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) está nas formas com que a molécula pode dissipar a sua energia. Para a TFD é interessante que o FS converta seu estado singlete (1FS) para triplete (3FS) para formar oxigênio singlete. Assim,

valores baixos de Φ_F podem ser desejados para que o FS não use a sua energia absorvida no processo de fluorescência e sim em processos de conversão intersistema e geração do estado tripleto. Nota-se nas **Tabelas 2 e 3** também uma diminuição do rendimento quântico de fluorescência ao complexar o feoforbídeo com o íon zinco, e esse efeito foi mais importante em um solvente mais polar, possivelmente em decorrência de sua agregação em meio aquoso. Para o feoforbídeo de paládio na **Tabela 4**, nota-se a importância do efeito do átomo pesado na diminuição da emissão de fluorescência devido a utilização da energia absorvida em processos de conversão intersistema.⁶¹ O aumento de conversão intersistema da molécula pode resultar valores altos de rendimentos quântico de estado tripleto (Φ_T). Por exemplo, para feofitina a (molécula similar ao feoforbídeo a) em metanol o rendimento quântico do estado tripleto é de $\Phi_T = 0,76$ (Kotkowiak *et. al*), enquanto para o feoforbídeo a de paládio em metanol é de 0,83. Tal dado pode indicar que a diminuição do rendimento quântico de fluorescência para o feoforbídeo ao inserir o íon paládio é devido à possibilidade do aumento efeito do átomo pesado.

5.2.2 Cinéticas de Fotobranqueamento

A constante de velocidade da reação de fotodegradação (fotobranqueamento) fornece a informação do quão rápido é a sua degradação, ou seja, do quanto uma molécula é estável na presença de luz e oxigênio. A estabilidade do FS é importante para a TFD pois o composto será exposto constantemente à radiação para a geração de oxigênio singleto. Tem-se pelos dados da **Tabela 5** o comportamento dos FS em diferentes solventes frente à luz. As maiores velocidades de fotodegradação foram observadas para o feoforbídeo de zinco em água e etanol. Além disso, os solventes menos polares favoreceram a fotoestabilidade. As maiores constantes de velocidade para o complexo de zinco deve-se à sua possibilidade de interagir com os oxigênios reativos (devido os intermediários radicalares seres mais estabilizados em solventes mais polares como etanol e água, logo facilita sua formação - reações tipo I e tipo II) formados e se auto degradar.

Os processos de relaxamento do sistema estão interligados, o aumento de um processo ocasiona a diminuição dos outros. Uma maior constante de velocidade de fotobranqueamento pode indicar um aumento no rendimento quântico de fotobranqueamento, podendo ocasionar uma diminuição nos outros processos de relaxamento como o de Φ_F . Isto pode ser visto nos valores de constante de velocidade e de Φ_F para o feoforbídeo de zinco, onde o aumento na constante de velocidade pode ter ocasionado uma diminuição nos seus valores de Φ_F .

6. CONCLUSÃO

A busca para obtenção de fotossensibilizadores ideais requer a avaliação de vários fatores. Desde a sua síntese, sua interação com o meio e suas possíveis reações. No presente trabalho foi obtido um FS a partir do agrião e obtidos dois derivados a partir da complexação da molécula de feoforbídeo *a* com íons de paládio e zinco, caracterizadas em diferentes solventes. Através de análises de fotobranqueamento observou-se que a complexação com o paládio não altera de forma significativa a fotoestabilidade.

As análises de fluorescência mostraram que a inserção dos metais zinco e paládio minimizaram a possibilidade de relaxamento por meio de fluorescência, dando oportunidade para relaxamento por meio de conversão intersistema, com o dado do artigo Kotkowiak *et. al* de rendimento quântico de estado triplete para o paládio pode-se verificar esta possibilidade.

Assim, a incorporação de íons metálicos ao feoforbídeo é uma estratégia interessante visto que aumenta a formação do estado triplete. Contudo, uma atenção especial deve ser dada ao efeito desses metais na fotoestabilidade do fotossensibilizador.

7. REFERÊNCIAS

1. Bown, S. G. Photodynamic therapy for photochemists. *Phil. Trans. R. Soc. A* 371:20120371 (2013).
2. Dennis E.J.G.J. Dolmans, D. F. and R. K. J. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380–387 (2003).
3. Dąbrowski, J. M. *et al.* Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews* vol. 325 (2016).
4. Campanholi, K. da S. S. *et al.* Development of Pluronic® nanocarriers comprising Pheophorbide, Zn-Pheophorbide, Lapachol and β -lapachone combined drugs: Photophysical and spectroscopic studies. *Dye. Pigment.* **157**, 238–250 (2018).
5. Singh, K., Chaturvedi, D. & Singh, V. K. Review on Different Aspects of the Photodynamic Product Pheophorbide. **5**, 6–13 (2019).
6. Jakubowska, M. *et al.* Zinc-pheophorbide a-Highly efficient low-cost photosensitizer against human adenocarcinoma in cellular and animal models. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **10**, 266–277 (2013).
7. Yamamoto, T. *et al.* Bactericidal effect of photodynamic therapy using Naphthepheophorbide a: Evaluation of adequate light source. *Photomed. Laser Surg.* **27**, 849–853 (2009).
8. Solymosi, K. & Mysliwa-Kurdziel, B. Chlorophylls and their Derivatives Used in Food Industry and Medicine. *Mini-Reviews Med. Chem.* **17**, (2016).
9. Jing, Y. *et al.* Sodium pheophorbide a has photoactivated fungicidal activity against *Pestalotiopsis neglecta*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **158**, 25–31 (2019).
10. Almeida, W. B. de & Santos, H. F. dos. Modelos Teóricos para a Compreensão da Estrutura da Matéria. *Química Nov. na Esc.* **4**, 6–13 (2001).
11. Adcock, J. L., Barnett, N. W. & Francis, P. S. Luminescence - Overview. *Encycl. Anal. Sci.* **6**, 270–280 (2019).
12. Fleming, K. G. *Fluorescence Theory. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (Elsevier Ltd., 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374413-5.00357-2.
13. Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications. Methods* vol. 8 (2001).
14. Allison, R. R. *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **1**, 27–42 (2004).
15. Navea, J. G. & Grassian, V. H. *Photochemistry of Atmospheric Particles. Encyclopedia of Interfacial Chemistry* (Elsevier, 2018). doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.13210-x.
16. Josefsen, L. B. & Boyle, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based. Drugs* **2008**, (2008).
17. Arnaut, L. G. *Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy. Advances in Inorganic Chemistry* vol. 63 (Elsevier Inc., 2011).
18. Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E. & Govindjee. A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynth. Res.* **99**, 85–98 (2009).

19. VERHOEVEN, J. W. GLOSSARY OF TERMS USED IN PHOTOCHEMISTRY. *Pure Appl. Chem* **68**, 2223–2286 (1996).
20. Machado, A. E. da H. TERAPIA FOTODINÂMICA: PRINCÍPIOS, POTENCIAL DE APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS. *Quim. Nova* **23**, 237–243 (2000).
21. Perussi, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim. Nova* **30**, 988–994 (2007).
22. Isabel Bacellar, Maria Cecília Oliveira, Lucas Dantas, Eliege Costa, Helena Couto Junqueira, Waleska Kerllen Martins, Andrés M. Durantini, Gonzalo Cosa, Paolo Di Mascio, Mark Wainwright, Ronei Miotto, Rodrigo Maghdissian Cordeiro, Sayuri Miyamoto, and M. S. B. Photosensitized membrane permeabilization requires contact- dependent reactions between photosensitizer and lipids. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 1–22 (2018).
23. Soares Lopes, L. Q. *et al.* Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl)platinum(II) porphyrin. *Microb. Pathog.* 1–32 (2019) doi:10.1016/j.micpath.2018.12.038.
24. Pickett, J. E. *Chapter 16 Non-Free Radical Oxidation Mechanisms. Service Life Prediction of Polymers and Plastics Exposed to Outdoor Weathering* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-323-49776-3/00016-7.
25. Lang, K., Mosinger, J. & Wagnerová, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **248**, 321–350 (2004).
26. Khot, M. I. *et al.* The role of ABCG2 in modulating responses to anti-cancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2019) doi:10.1016/j.pdpdt.2019.10.014.
27. Zhang, J. *et al.* An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **8**, 137–146 (2018).
28. Hamblin, M. R. *Photodynamic Therapy and Photobiomodulation: Can All Diseases be Treated with Light? Encyclopedia of Modern Optics* vol. 3 (Elsevier Ltd., 2018).
29. Alexandrino, F. J. R. *et al.* Rose Bengal incorporated to α -cyclodextrin microparticles for photodynamic therapy against the cariogenic microorganism *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **25**, 111–118 (2019).
30. Tedesco, A. C., Primo, F. L. & Jesus, P. da C. C. de. *Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers. Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/b978-0-323-52725-5.00002-2.
31. Wang, Y., Chen, H., Li, C. & Wu, P. Octachloro-fluorescein: Synthesis and photosensitizer performance evaluation. *Dye. Pigment.* **170**, 1–7 (2019).
32. Agnez-Lima, L. F. *et al.* DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **751**, 15–28 (2012).
33. Weijer, R. *et al.* Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*

- 23**, 103–131 (2015).
34. Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Piskorz, J. & Mielcarek, J. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **175**, 72–106 (2019).
 35. Gade, L. H., Darensbourg, D., Gray, H. B. & Green, M. L. H. *Advances in Inorganic Chemistry*. vol. 14 (Elsevier Inc., 2014).
 36. Sobczynski, J. & Polski, A. Nanocarriers for Photosensitizers for Use in Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Nanostructures Antimicrob. Ther. Nanostructures Ther. Med. Ser.* 481–502 (2017) doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00021-4.
 37. Gomer, C. J. PRECLINICAL EXAMINATION OF FIRST and SECOND GENERATION PHOTSENSITIZERS USED IN PHOTODYNAMIC THERAPY. *Photochem. Photobiol.* **54**, 1093–1107 (1991).
 38. Sharman, W. M., Allen, C. M. & Van Lier, J. E. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today* **4**, 507–517 (1999).
 39. Ribeiro, J. N. & Jorge, R. A. Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesitylporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível. *Eclét. Quim.* **30**, 7–13 (2005).
 40. Alian, W., Andersson-Engels, S., Svanberg, K. & Svanberg, S. Laser-induced fluorescence studies of meso-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in malignant and normal tissues in rats. *Br. J. Cancer* **70**, 880–885 (1994).
 41. Hopper, C., Niziol, C. & Sidhu, M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol.* **40**, 372–382 (2004).
 42. Weersink, R. A. *et al.* Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: Clinical experience and practicalities. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **79**, 211–222 (2005).
 43. Wong, T. W., Aizawa, K., Sheyhedin, I., Wushur, C. M. G. & Kato, H. Pilot study of topical delivery on mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): Implication of topical NPe6-photodynamic therapy. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 136–142 (2003).
 44. Krammer, B. & Plaetzer, K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 283–289 (2008).
 45. Oenbrink, G., Jurgenlimke, P. & Gabel, D. Accumulation of Porphyrins in Cells: Influence of Hydrophobicity Aggregation and Protein Binding. *Photochem. Photobiol.* **48**, 451–456 (1988).
 46. Konan, Y. N., Gurny, R. & Allémann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **66**, 89–106 (2002).
 47. Cheng, Y. & Burda, C. Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Compr. Nanosci. Technol.* **1–5**, 1–28 (2011).
 48. Wilson, B. C. & Patterson, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **53**, (2008).
 49. Huang, Y. Y. *et al.* Functionalized fullerenes in photodynamic therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 1918–1936 (2014).
 50. Moss, G. P. Nomenclature of tetrapyrroles Recommendations. *Eur. J. Biochem.* **178**, 277–328 (1988).

51. De Simone, B. C., Mazzone, G., Russo, N., Sicilia, E. & Toscano, M. Metal atom effect on the photophysical properties of Mg(II), Zn(II), Cd(II), and Pd(II) tetraphenylporphyrin complexes proposed as possible drugs in photodynamic therapy. *Molecules* **22**, 1–9 (2017).
52. Obata, M. *et al.* In vitro heavy-atom effect of palladium(II) and platinum(II) complexes of pyrrolidine-fused chlorin in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **52**, 2747–2753 (2009).
53. Fukuzumi, S. *et al.* Metal bacteriochlorins which act as dual singlet oxygen and superoxide generators. *J. Phys. Chem. B* **112**, 2738–2746 (2008).
54. You, H., Yoon, H. E., Yoon, J. H., Ko, H. & Kim, Y. C. Synthesis of pheophorbide-a conjugates with anticancer drugs as potential cancer diagnostic and therapeutic agents. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 5383–5391 (2011).
55. Gerola, A. P. *et al.* Liposome and polymeric micelle-based delivery systems for chlorophylls: Photodamage effects on *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **177**, 487–495 (2019).
56. Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E. & Roca, M. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Curr. Opin. Food Sci.* **26**, 94–100 (2019).
57. Wohllebe, S., Richter, R., Richter, P. & Häder, D. P. Photodynamic control of human pathogenic parasites in aquatic ecosystems using chlorophyllin and pheophorbide as photodynamic substances. *Parasitol. Res.* **104**, 593–600 (2009).
58. Roca, M., Chen, K. & Pérez-Gálvez, A. *Chlorophylls. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color* (2016). doi:10.1016/B978-0-08-100371-8.00006-3.
59. Iwai, K., Ido, T., Iwata, R., Kawamura, M. & Kimura, S. Localizing efficiency of [⁴⁸V]vanadyl-pheophorbide in tumor as a new tumor imaging agent. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation.* **16**, (1989).
60. Ocakoglu, K. *et al.* Evaluation of ^{99m}Tc-Pheophorbide-a use in infection imaging: A rat model. *Appl. Radiat. Isot.* **69**, 1165–1168 (2011).
61. Silva, E. F. F., Schaberle, F. A., Monteiro, C. J. P., Dąbrowski, J. M. & Arnaut, L. G. The challenging combination of intense fluorescence and high singlet oxygen quantum yield in photostable chlorins-a contribution to theranostics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 1187–1192 (2013).
62. Kotkowiak, M., Dudkowiak, A. & Fiedor, L. Intrinsic Photoprotective Mechanisms in Chlorophylls. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **56**, 10457–10461 (2017).