UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

DÉBORA CRISTINA KAWASAKI CODOGNATO

**Interação da albumina de soro bovino (ASB) com
fotossensibilizadores usados em fotoquimioterapia**

Ribeirão Preto – SP
2017

DÉBORA CRISTINA KAWASAKI CODOGNATO

**Interação da albumina de soro bovino (ASB) com
fotossensibilizadores usados em fotoquimioterapia**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração

Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador

Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Codognato, Débora Cristina Kawasaki

Interação da albumina de soro bovino (ASB) com fotossensibilizadores usados em fotoquimioterapia./Débora Cristina Kawasaki Codognato; orientador Iouri Borissevitch – Ribeirão Preto, 2017. 115p.: il.

Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, 2017.

1. Fotoquimioterapia. 2. Fotossensibilizadores. 3. Albumina de soro bovino. 4. Interação. 5. Efeito da estrutura espacial.

Nome: CODOGNATO, Débora Cristina Kawasaki

Título: Interação da albumina de soro bovino (ASB) com fotossensibilizadores usados em fotoquimioterapia

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a minha filha, Dandara,
que me incentivou a lutar por um sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch, pela orientação, pelo carinho, pela paciência, pela confiança depositada, pela oportunidade de trabalhar no Grupo de Fotobiofísica e principalmente pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos durante esses anos.

À minha família, que mesmo sem entender exatamente o que eu faço, me apoiou durante todo esse tempo.

À minha filha que deu a ideia e o estímulo para iniciar uma nova graduação e mestrado.

À Lucimara, pela amizade, incentivo e ajuda na etapa final deste trabalho.

Ao Dr. Edmyr Rosa dos Reis, por extrair e fornecer a Protoporfirina IX (PpIX) endógena para este estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e ao Dr. Eduardo José Crevelin pelos experimentos e análise de Espectrometria de Massas em seu laboratório no Departamento de Química da USP-RP.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos.

À USP, pela infraestrutura fornecida.

Das Pedras

Ajuntei todas as pedras
Que vieram sobre mim...
Levantei uma escada muito alta...
E no alto subi...
Teci um tapete floreado
E no sonho me perdi...
Uma estrada,
Um leito,
Uma casa,
Um companheiro
Tudo de pedras...
Entre as pedras cresceu minha poesia
Minha vida...
Quebrando pedras
E plantando flores...
Entre pedras que me esmagavam
Levantei a pedra rude dos meus versos.

(Cora Coralina)

Лиха беда начало.

(O PRIMEIRO PASSO É SEMPRE O MAIS DIFÍCIL)

RESUMO

Codognato, D. C. K. **Interação da albumina de soro bovino (ASB) com fotossensibilizadores aplicados em Fotoquimioterapia.** 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

A Fotoquimioterapia (FQT) vem sendo usada no tratamento de várias doenças, inclusive câncer, com a vantagem de ser menos agressiva, possuindo efeitos colaterais negativos desprezíveis. Esta técnica envolve a combinação de uma fonte de luz visível e de um fotossensibilizador (FS), que é reativo apenas sob a irradiação com luz adequada, e que se acumula preferencialmente no tecido doente. Uma ideia para deixar essa técnica mais eficiente é potencializar esta última característica do FS com uso de um carreador que tenha afinidade com tecidos doentes. Pensamos na hipótese de usar a albumina do soro como carreador uma vez que ela é uma proteína intrínseca do organismo, tem alta afinidade com os tecidos tumorais e possui sítios para ligar vários compostos extrínsecos. Como modelo usamos a albumina de soro bovino (ASB). Como FS utilizamos acridina laranja, nitrofurantoína, corantes cianicos com dois cromóforos e protoporfirina IX (PpIX) sintética e extraída de glândulas Harderianas de ratos da linhagem Wistar (PpIX endógena). Foram analisadas as características de ligação entre os FS e a ASB e seus efeitos nas características fotofísicas dos FS em função da sua estrutura, utilizando espectroscopias de absorção ótica, fluorescência estática e resolvida no tempo e a técnica de microscopia de imagens por tempo de vida da fluorescência (FLIM). Foi mostrado que a ligação com ASB induz ao deslocamento batocrômico dos espectros de absorção e da fluorescência, aumentando a intensidade e o tempo de vida de fluorescência dos FS. Características como carga positiva, estrutura linear e tamanho pequeno da molécula do FS favorecem sua ligação com a ASB.

Uma comparação entre PpIX sintética e endógena mostrou que a formação de um complexo da PpIX com estruturas anfifílicas também aumenta a probabilidade da sua ligação com a ASB. Os resultados obtidos mostraram que a ASB se liga efetivamente aos FS de diferentes estruturas e pode ser usada como carreador dos mesmos para tecidos tumorais.

Palavras-chave: 1. Fotoquimioterapia. 2. Fotossensibilizadores. 3. Albumina de soro bovino. 4. Interação. 5. Efeito da estrutura espacial.

ABSTRACT

Codognato, D. C. K. **Interaction of bovine serum albumin (BSA) with photosensitizers applied in Photochemotherapy.** 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

Photochemotherapy (PCT) is used for the treatment of various diseases, including cancer, with the advantage of being less aggressive with reduced adverse effects. This technique includes the use of a visible light source and a photosensitizer (PS), which is reactive only under light exposure and localizes preferably in abnormal tissues. To make this technique more efficient it is necessary to increase the PS content in these tissues using a carrier which possesses affinity with these tissues and is able to bind PS. A good opportunity is to use serum albumin as a carrier since it is an intrinsic protein, has high affinity to tumor tissues and possesses sites for binding of various extrinsic compounds. In this work the bovine serum albumin (BSA) was used as a carrier model. Acridine orange, nitrofurantoin, cyanine dyes with two chromophores and protoporphyrin IX synthetic and extracted from Harderian glands of Wistar line rats (endogenous) were used as PS. The characteristics of the PS binding with BSA and the effect of this interaction on PS photophysical properties were studied using optical absorption, steady-state and time resolved fluorescence spectroscopies, and fluorescence lifetime image microscopy (FLIM). It was demonstrated that PS binding with BSA produces a bathochromic shift in the PS absorption and fluorescence spectra and increases its fluorescence intensity and lifetime. The positive charge, linear structure and small size of the PS molecule favors its binding with BSA. A comparison between synthetic and endogenous PpIX demonstrates that complexation of PpIX molecule with an amphiphilic structure increases the probability of its binding with BSA. The obtained

results demonstrate that BSA binds effectively PS with different molecular structures and it is promising for their transport to tumor tissue.

Key words: 1. Photochemotherapy. 2. Photosensitizers. 3. Bovine Serum Albumine. 4. Interaction. 5. Spatial structure effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Lei de Lambert-Beer.....	27
Figura 2.2 Diagrama de Jablonski, baseado em (CHASTEEN).....	28
Figura 2.3: Representação estrutural da PpIX.	38
Figura 2.4: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da PpIX sintética.	39
Figura 2.5: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da PpIX endógena.....	40
Figura 2.6: Estrutura geral dos corantes ciânicos.	41
Figura 2.7: Fórmula estrutural geral dos BCDs.	41
Figura 2.8: Posição relativa dos dipolos induzidos pela luz: a) dipolos com 0° e b) dipolos com 180° entre os cromóforos.	42
Figura 2.9: Fórmula estrutural do BCD-90.	43
Figura 2.10: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência do BCD-90.	43
Figura 2.11: Fórmula estrutural do BCD-180.....	44
Figura 2.12: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência do BCD-180.....	44
Figura 2.13: Fórmula estrutural da acridina laranja.....	45
Figura 2.14: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da Acridina Laranja.....	45
Figura 2.15: Fórmula estrutural da NFT.....	46
Figura 2.16: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da Nitrofurantoína em função do pH da solução.	47
Figura 2.17: Estrutura tridimensional da ASB modificada de (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013).....	48
Figura 2.18: Espectros de absorção e de emissão de fluorescência da ASB.....	49
Figura 4.1: Princípio das medidas feitas pelo TCSPC, modificado de (Handbook: PML-16C and PML-16 GaAsP 16-Channel TCSPC / FLIM	

Detectors; PML-SPEC and MW FLIM Multi-Wavelength Detectors., 2016).

..... 55

Figura 4.2: Configuração TCSPC para a obtenção de imagens de tempo de vida de fluorescência (FLIM), modificado de (*Handbook: PML-16C and PML-16 GaAsP 16-Channel TCSPC / FLIM Detectors; PML-SPEC and MW FLIM Multi-Wavelength Detectors.*, 2016) 56

Figura 5.1: Espectro de absorção da PpIX endógena (129 μM) na ausência e na presença de ASB em concentrações 0,2; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,4 μM 59

Figura 5.2: Mudanças no espectro de absorção da PpIX sintética (153 μM) devido à adição de ASB (0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 51; 201 e 301 μM). . 60

Figura 5.3: Espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena em função da concentração de ASB: 0,2; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,4 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$ 61

Figura 5.4: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em função da concentração de ASB. $\lambda_{\text{exc}} = 407 \text{ nm}$ 62

Figura 5.5: Perfil do decaimento da fluorescência da PpIX endógena em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 637 \text{ nm}$ 63

Figura 5.6: Perfis de decaimento de fluorescência da PpIX sintética em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 638 \text{ nm}$ 64

Figura 5.7: Mudanças nos espectros de absorção do BCD-180, 3,4 μM (a) e do BCD-90, 2,5 μM (b) em função da concentração de ASB. 65

Figura 5.8: Mudanças nos espectros de emissão de fluorescência do BCD-180 (a) e BCD-90 (b) em função da concentração de ASB. $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$ 67

Figura 5.9: Perfis de decaimento de fluorescência do BCD-180 em função da concentração de ASB. $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ 68

Figura 5.10: Perfis de decaimento de fluorescência do BCD-90 em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ 69

Figura 5.11: Mudanças nos espectros de absorção da NFT em função da concentração de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c).....	71
Figura 5.12: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da NFT com adição de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c), $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$	73
Figura 5.13: Perfil de curvas de decaimento de fluorescência da NFT em função da concentração de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c), $\lambda_{ex} = 423 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$	75
Figura 5.14: Mudanças nos espectros de absorção da AL (9,6 μM) em função da concentração de ASB (de 6 μM a 733 μM).....	76
Figura 5.15 : Mudanças nos espectros de emissão de fluorescência da AL em função da concentração de ASB. $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$	77
Figura 5.16: Perfil de decaimento de fluorescência da AL em função da concentração de ASB. $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 488 \text{ nm}$	78
Figura 5.17: Espectros de absorção da na presença de PpIX sintética (a) e NFT (b) em várias concentrações.	79
Figura 5.18: Mudanças no espectro de absorção da ASB em função da concentração de AL.	79
Figura 5.19: Mudanças no espectro de fluorescência da ASB em função da concentração de PpIX endógena (a) e sintética (b).....	80
Figura 5.20: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da ASB em função da concentração de BCD-180 (a) e BCD-90 (b).....	81
Figura 5.21: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da ASB em função da concentração de NFT.	82
Figura: 5.22: Mudanças no espectro de emissão da fluorescência da ASB em função da concentração de AL.....	82
Figura 5.23: Determinação da constante de supressão de Stern-Volmer da fluorescência da ASB pela PpIX sintética.....	83
Figura 5.24: Perfil de decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração de BCD-180. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$	85
Figura 5.25: Perfil de decaimento de fluorescência da ASB em função da concentração de AL. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$	85

Figura 5.26: Perfil de decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração de PpIX endógena. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$	86
Figura 5.27: Espectros de massas para PpIX sintética (a) e PpIX endógena (b). Espectro de massa para a PpIX com destaque para a região de interesse (c).....	89
Figura 5.28: Exemplo dos perfis dos pontos claros (a) e escuros (b) obtidos no programa Origin 8.5.	91
Figura 5.29: Imagem da PpIX endógena obtida pela análise do seu tempo de vida de fluorescência. Dimensões da imagem 80x80 μm (a) e 40x40 μm (b). Potência de excitação de 2059,6 au.	92
Figura 5.30: Imagens com dimensões de 80x80 μm (a) e 40x40 μm (b) da PpIX endógena na presença de ASB. Potência de excitação de 668,4 au.....	93
Figura 5.31: Imagens com dimensões de 40x40 μm com indicação das estruturas encontradas na solução de PpIX sintética na ausência (a), potência de excitação de 668,4 au e na presença de ASB (b), potência de excitação de 624,7 au).....	94
Figura 5.32: Imagem com dimensões de 80x80 μm do BCD-180 na ausência de ASB. Potência de excitação de 398,3 au.	96
Figura 5.33: Imagem com dimensões de 80x80 μm do BCD-180 na presença de ASB. Potência de excitação de 398,3 au.....	97
Figura 5.34: Imagem dos agregados presentes na solução de BCD-90. Dimensão da imagem: 40x40 μm . Potência de excitação de 398,3 au. ..	98
Figura 5.35: Imagem com dimensões de 80x80 μm do BCD-90 na presença de ASB. Potência de excitação de 407,4 au.	99
Figura 5.36: Imagem com dimensões de 40x40 μm da solução de NFT na ausência de ASB. Potência de excitação de 1644,5 au.....	101
Figura 5.37: Imagem com dimensões de 40x40 μm da solução de NFT na presença de ASB. Potência de excitação de 1759,4 au.	101
Figura 5.38: Imagem com dimensões de 40x40 μm com indicação das estruturas encontradas na solução de AL. Potência de excitação de 7,4 au.	102

Figura 5.39: Imagem com dimensões de $40 \times 40 \mu\text{m}$ da AL na presença de ASB. Potência de excitação de 7,8 au.103

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência da PpIX endógena e sintética em função da concentração de ASB.....	64
Tabela 5.2: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência de BCD-180 e BCD-90 na ausência e na presença de ASB.	69
Tabela 5.3: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência da NFT em pH 7,3 na ausência e na presença de ASB.	76
Tabela 5.4: Contribuição das componentes α_1 e α_2 com tempos $t_1 = 1,8$ ns e $t_2 = 3,6$ ns no decaimento da fluorescência da AL na ausência e na presença de ASB.	78
Tabela 5.5: Constantes de supressão Stern-Volmer da fluorescência da ASB na presença dos diversos FS.....	83
Tabela 5.6: Contribuição das componentes α_1 e α_2 com tempos $t_1 = 5,6$ ns e $t_2 = 1,5$ ns no decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração da PpIX endógena	86
Tabela 5.7: Tamanho estimado dos agregados da PpIX endógena e sintética na ausência e na presença de ASB.	95
Tabela 5.8: Tamanho estimado dos agregados do BCD-90 na presença e na ausência de ASB.	100
Tabela 5.9: Tamanho estimado dos agregados da NFT na ausência e na presença de ASB.	102
Tabela 5.10: Tamanho estimado dos agregados encontrados na imagem da AL na ausência e na presença de ASB.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

FQT: Fotoquimioterapia.

FS: Fotossensibilizador.

DF: Diagnóstico por fluorescência.

NFT: Nitrofurantoína.

PpIX: Protoporfirina.

BCD: Corante ciânico com dois cromóforos.

BCD-90: Corante ciânico com dois cromóforos com ângulo de 90° entre eles.

BCD-180: Corante ciânico com dois cromóforos com ângulo de 180° entre eles.

AL: Acridina laranja.

ASB: Albumina de soro bovino

FLIM: Microscopia de imagem pelo tempo de vida de fluorescência.

TCSPC: Correlação temporal de fótons únicos.

ESI: Ionização de eletrospray.

DNF: Derivado de nitrofurano.

ROS: Espécies reativas de oxigênio.

NO: óxido nítrico.

PI: Ponto isoelétrico.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

ACN: Acetonitrila.

Sumário

1. Introdução.....	22
2. Base Científica	24
2.1 - Natureza da Luz e sua interação com a matéria	25
2.2 – Absorção Ótica	25
2.3 – Diagrama de Jablonski.....	28
2.4 – Fluorescência	30
2.4.1 - Espectroscopia de fluorescência	30
2.4.2 - Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal	32
2.5 - Supressão da Fluorescência	33
2.6 – Espectrometria de massas	37
2.7 – Fotossensibilizadores (FS)	38
2.7.1 – Protoporfirina IX (PpIX)	38
2.7.2 – Corante cianico com dois cromóforos (BCD)	40
2.7.3 - Acridina Laranja (AL)	44
2.7.4 – Nitrofurantoína (NFT)	45
2.8 – Albumina	47
3. Objetivos e Justificativa	50
3.1 - Objetivos	51
3.2 – Justificativa.....	51
4. Materiais e Métodos	52
4.1 – Materiais usados e preparação das amostras.....	53
4.2 – Técnicas experimentais.....	53
4.2.1 – Espectroscopia de Absorção Ótica:	53
4.2.2 – Espectroscopia de fluorescência:	54
4.2.3 – Tempo de vida da fluorescência	54
4.2.4 – Microscopia de imagens pelo tempo de vida de fluorescência (FLIM).....	56
4.2.5 – Espectrometria de massas	57
5. Resultados e Discussões	58
5.1 - Parte 1	59
5.1.1 - Protoporfirina IX (PpIX) endógena e sintética	59

5.1.2 - Corantes ciânicos com dois cromóforos	64
5.1.3 - Nitrofurantoína (NFT)	70
5.1.4 - Acridina Laranja (AL)	76
5.2 - Parte 2	78
5.2.1 – Espectroscopia de Absorção Ótica	78
5.2.2 - Espectros de emissão de Fluorescência.....	80
5.2.3 – Constante de Supressão da fluorescência	83
5.2.4 - Tempos de vida da fluorescência	84
5.2.5 –Efeitos da estrutura dos FS no processo da sua ligação com a ASB.....	87
5.2.6 – Espectrometria de massas da PpIX sintética e endógena	88
5.3 - Parte 3: Imagens do tempo de vida da fluorescência - FLIM	90
5.3.1 – PpIX	91
5.3.2 - BCD-180.....	96
5.3.3 - BCD-90	97
5.3.4 - Nitrofurantoína	100
5.3.5 - Acridina laranja	102
6. Conclusões.....	105
7. Referências Bibliográficas	107

1. Introdução

A cada ano mais de 12,7 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer e 7,6 milhões de pessoas morrem vítimas dessa doença. (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (RIO DE JANEIRO), 2016)

Atualmente as técnicas mais utilizadas para combater o câncer são cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Apesar de muito eficazes em diversos casos, esses tipos de tratamento são caracterizados por sérios efeitos colaterais.

Um tratamento alternativo não invasivo denominado fotoquimioterapia (FQT) surgiu como uma nova terapia, com efeitos colaterais mais brandos, possibilitando que a recuperação do paciente após o tratamento ocorra de forma mais rápida.

Esta terapia consiste na introdução de um composto fotossensível no organismo do paciente e na irradiação do local a ser tratado com luz com comprimento de onda na região visível, desencadeando assim reações fotoquímicas que levam a morte das células do tecido irradiado.(DUARTE I, BUENSE R, 2006) Além do tratamento contra o câncer a FQT apresenta elevada eficácia no tratamento de doenças não oncológicas, como psoríase, infecções bacterianas e micóticas. (HONIGSMANN, 2003)

Tais compostos fotossensíveis ou fotoativos são conhecidos como fotossensibilizadores (FS). Alguns FS, além de essenciais na destruição celular, podem emitir fluorescência, característica que pode ser detectada visualmente e instrumentalmente, podendo ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico não invasivo de tumores. Nesse caso a combinação do tratamento através de FQT e diagnóstico é uma base da técnica *teranóstica*.(CHEN et al., 2015)

Para utilização em FQT os FS devem possuir propriedades específicas:

- Alto rendimento quântico de formação de espécies reativas, tais como, oxigênio singleto, ânion superóxido, radical NO, etc.;
- Baixa toxicidade no escuro;

- Para o tratamento de tumores massivos é necessária absorção na janela foto-terapêutica (600-800 nm) onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes. Entretanto, essa condição não é essencial para tratamento de danos cutâneos, quando a penetração profunda da luz dentro do tecido não é necessária;
- Farmacocinética favorável e fácil eliminação pelo organismo, evitando fotossensibilidade prolongada;
- Formulação definida, permitindo estabelecer a relação entre a estrutura e a atividade;
- Solubilidade em meio fisiológico, facilitando a aplicação da droga;
- Facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutibilidade e custos reduzidos. (STERNBERG et al., 1998; BONNETT et al., 2001)

Além disso, é muito importante que reações de produção de radicais, que resultem em toxicidade para as células, ocorram apenas na presença de luz.

Para que a efetividade do tratamento e o contraste no diagnóstico sejam maiores é necessário que o FS se acumule principalmente no tecido a ser tratado. Isso significa que a afinidade do FS com esse tecido deve ser maior se comparado com o tecido saudável. Com o intuito de potencializar a ação do FS, a ideia do uso de sistemas carreadores vem sendo empregada. (STEHLE et al., 1999)

Os carreadores possuem um mecanismo para transporte da droga que depende das suas características e do alvo de ação liberando as moléculas do FS no local do alvo desejado. Das vantagens oferecidas estão que os carreadores aumentam a atividade terapêutica por liberarem a droga no local indicado, prolongam a atividade da droga no organismo por tornarem possível a sua liberação de forma controlada e reduzem a toxicidade por reduzirem o metabolismo da droga, evitando que atinja órgãos não desejados. (CIMA et al., 2014) Entre os carregadores as albuminas do soro atraem uma atenção especial, pois possuem alta

afinidade com tecidos tumorais, (WUNDER et al., 2003) possuem o papel de ligar compostos de vários tipos e transportá-los dentro do organismo, além de serem proteínas abundantes no plasma sanguíneo, cerca de 60% do total de proteínas. (PETERS, 1985) Entretanto, a interação do FS com um carreador, a albumina, por exemplo, pode mudar suas características fotofísicas, afetando sua atividade no tratamento por FQT e no diagnóstico por fluorescência (DF). (BORISSEVITCH; FERREIRA, 2016) Por isso os estudos da interação de FS com albumina e seus efeitos nas características do FS são de grande importância.

Neste trabalho estudamos a interação de Nitrofurantoína (NFT), Protoporfirina IX (PpIX) sintética e endógena, Biscianinas com ângulos de 90° (BCD-90) e 180° (BCD-180) entre os cromóforos e a Acridina Laranja (AL) como FS na sua interação com a Albumina de Soro Bovino (ASB) como modelo de carreador, por ser uma proteína já bem estudada, de baixo custo e de fácil obtenção.

Como métodos de investigação foram utilizadas as espectroscopias de absorção ótica, fluorescência estática e com resolução temporal e imagem de tempo de vida da fluorescência (FLIM).

2. Base Científica

2.1 - Natureza da Luz e sua interação com a matéria

Pela teoria quântica a luz é um fluxo de partículas chamadas fótons em que sua energia é definida por:

$$E = hf = hc/\lambda \quad (01)$$

e momento por:

$$p = hf/c = h/\lambda \quad (02)$$

sendo a constante de Plank, $h = 6,63 \times 10^{-34}$ J, f a frequência, λ o comprimento de onda da luz e c a velocidade da luz.

Desse modo a intensidade da luz é definida como a quantidade energia transportada através do fluxo de fótons que passa por uma unidade de área por uma unidade de tempo. (BORISSEVITCH, IOURI E. GONÇALVES, PABLO J. SCHABERLE, 2016)

2.2 – Absorção Ótica

A absorção de um fóton por um átomo ou uma molécula está associada a transições eletrônicas entre seus orbitais. A energia de transição é dada por:

$$hf = E_n - E_m \quad (03)$$

sendo que E_m (energia do orbital inicial) deve ser menor que E_n (energia do orbital final) para o fóton ser absorvido.

De acordo com a lei de Lambert-Beer, considerando um feixe de fótons com intensidade I_0 que incide numa amostra, temos para intensidade da luz transmitida:

$$I_{tr}(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-A} \quad (04)$$

em que A é um valor chamado absorvância.

A absorção pode ser escrita como:

$$A = \varepsilon(\lambda)Cl \quad (05)$$

sendo que $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar, cujo valor depende do comprimento de onda e é uma característica específica de cada composto, C é a concentração da espécie que absorve luz e l é a espessura da amostra ou caminho ótico, distância percorrida pela luz dentro da amostra. A dependência entre A e λ recebe o nome de espectro de absorção ótica da amostra.

Na presença de diferentes tipos de partículas absorvedoras a forma espectroscópica desta lei é:

$$I_{tr} = I_0 10^{-(\sum_{i=1}^n A_i)} = I_0 10^{-(\sum_{i=1}^n \varepsilon_i C_i)l} \quad (06)$$

Isso mostra que a absorvância de uma amostra contendo uma mistura de partículas pode ser calculada como soma de absorvâncias dos diferentes tipos de partículas. Esse resultado é a base da análise espectroscópica.

A luz que incide na amostra nas medidas experimentais pode ser refletida, espalhada ou absorvida. Entretanto só interessa medir a luz absorvida, para que não haja interferência dos outros efeitos. Por este motivo é feita uma medida da chamada linha base ou linha de referência apenas com o solvente utilizado na amostra (Figura 2.1).

Figura 2.1: Lei de Lambert-Beer.

O procedimento é feito seguindo a lei de Lambert-Beer:

$$I_{tr1}(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-A_1(\lambda)} \quad (07)$$

$$I_{tr2}(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-A_2(\lambda)} \quad (08)$$

onde $I_{tr}(\lambda)$ é a intensidade transmitida, $I_0(\lambda)$ é a intensidade da luz incidente e $A(\lambda)$ é a absorção e λ é o comprimento de onda. O índice 1 é relativo à referência e o índice 2 à amostra de interesse.

A razão entre as intensidades:

$$\frac{I_{tr1}(\lambda)}{I_{tr2}(\lambda)} = \frac{10^{-A_2(\lambda)}}{10^{-A_1(\lambda)}} = 10^{-(A_2(\lambda) - A_1(\lambda))} \quad (09)$$

resulta em:

$$I_{tr2}(\lambda) = I_{tr1}(\lambda) \cdot 10^{-(A_2(\lambda) - A_1(\lambda))} \quad (10)$$

Portanto a absorbância da amostra em relação à referência pode ser descrita como:

$$\Delta A(\lambda) = A_2(\lambda) - A_1(\lambda) \quad (11)$$

O perfil do espectro de absorção depende da estrutura da molécula estudada, portanto é um método muito utilizado para caracterizar sistemas moleculares. (BORISSEVITCH, IOURI E. GONÇALVES, PABLO J. SCHABERLE, 2016)

2.3 – Diagrama de Jablonski

A estrutura dos níveis de energia da molécula fica mais fácil de ser visualizada usando um diagrama que foi desenvolvido pelo pesquisador polonês Alexander Jablonski (Figura 2.2).

Figura 2.2 Diagrama de Jablonski, baseado em (CHASTEEN).

Neste diagrama vemos os níveis de energia do estado fundamental singlete indicado por S_{00} e dos estados excitados singletos, caracterizados por estado do spin 0 , indicados por S_{nv} , onde n são os números dos níveis eletrônicos de energia, e os estados excitados tripleto, indicados por T_{nv} e

caracterizados por estado do spin **1**. Os números **v** representam os níveis vibracionais no respectivo estado eletrônico. (LAKOWICZ, 2006)

Quando uma molécula absorve a energia de um fóton ela passa do estado não excitado (fundamental) S_{00} , caracterizado pela energia vibracional menor possível, para um estado excitado S_{nv} com a energia vibracional maior ($S_{00} \rightarrow S_{nv}$), onde não fica por muito tempo, pois a molécula perde essa energia para o meio pelo processo de *relaxação vibracional*, que é o decaimento da energia vibracional no mesmo estado eletrônico de energia ($S_{nv} \rightarrow S_{n0}$). Desse estado a molécula pode perder energia de outras formas, tais como os processos não radiativos, como *conversão interna*, que ocorre quando o elétron passa do estado S_{n0} para um estado eletrônico de menor energia de mesma multiplicidade de spin ($S_{n0} \rightarrow S_{(n-1)v}$). Nesse estado a molécula, pelo processo de *relaxação vibracional*, passa para o nível vibracional **0** ($S_{(n-1)0}$). Repetindo esse processo várias vezes a molécula chega finalmente ao primeiro estado singlete, com a mínima energia vibracional S_{10} . Desse estado a molécula pode voltar para estado eletrônico fundamental emitindo um fóton de fluorescência ou pela *conversão interna*, perdendo o excesso da energia vibracional para o ambiente.

Uma outra oportunidade para molécula no estado S_{10} é passar para um estado de mesma energia, mas com multiplicidade de spin oposta ($S_{10} \rightarrow T_{1v}$) pelo processo de *cruzamento intersistemas* e então, por *relaxação vibracional* passar para estado T_{10} . No estado T_{10} a molécula pode voltar para estado fundamental S_{00} emitindo um fóton de *fosforescência* ou via *cruzamento intersistemas*, com sequencial relaxação vibracional. (BORISSEVITCH, IOURI E. GONÇALVES, PABLO J. SCHABERLE, 2016)

É importante notar que devido às regras de seleção, a transição entre os estados com mesmo spin são muito mais prováveis do que entre os estados com spins diferentes. Por isso o estado S_{10} tem o tempo de

vida $\tau_{S1} \approx 10^{-9}\text{s}$, bem menor que do estado T_{10} , que em soluções líquidas varia entre 10^{-6}s e 10^{-3}s .

2.4 – Fluorescência

Da mesma forma que na absorção, a energia emitida por um átomo ou por uma molécula está associada a transições eletrônicas entre orbitais. Essa energia é dada por:

$$hf = E_n - E_m \quad (12)$$

Neste caso a energia E_m (energia do orbital inicial) deve ser maior que E_n (energia do orbital final) para o fóton ser emitido.

2.4.1 - Espectroscopia de fluorescência

A dependência da intensidade da fluorescência $I_f(\lambda)$ com o comprimento de onda λ é conhecida como espectro de emissão de fluorescência.

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f), por sua vez, é a contribuição do processo de fluorescência em comparação aos outros processos que competem para a desexcitação ou perda de energia da molécula. Esse rendimento é obtido pela equação:

$$\phi_f = \frac{n_{em}}{n_{abs}} \quad (13)$$

ou na forma diferencial

$$\phi_f = \frac{dn_{em}}{dn_{abs}} = \frac{dn_{em}}{dt} \cdot \frac{dt}{dn_{abs}} \quad (14)$$

em que n_{em} é o número de fótons emitidos e n_{abs} é número de fótons absorvidos; $\frac{dn_{em}}{dt} = I_{em}$ e $\frac{dn_{abs}}{dt} = I_{abs}$ são, respectivamente, as intensidades emitida e absorvida, relacionadas simplesmente pela razão:

$$\varphi_{fl} = \frac{I_{em}}{I_{abs}} \quad (15)$$

A variação no tempo do número de moléculas excitadas é:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dn_{abs}}{dt} - kn = I_{abs} - kn \quad (16)$$

em que $k = \frac{1}{\tau}$ é uma constante de velocidade da dissipação da energia do estado excitado e τ é o tempo de vida desse estado.

No caso estacionário $\frac{dn}{dt} = 0$ e $I_{abs} = kn$.

A molécula que emite luz apenas pelo processo de fluorescência é caracterizada pela constante radiativa:

$$k_{fl} = \frac{1}{\tau_0} \quad (17)$$

em que τ_0 é o tempo de vida radiativo do estado S_{10} .

Neste caso toda energia absorvida se transforma em emitida ou

$$I_{abs} = I_{em} = k_{fl}n \quad (18)$$

Entretanto, a molécula também perde sua energia de excitação por outros processos além do radiativo. Então, devemos usar:

$$\frac{dn}{dt} = I_{abs} - (k_{fl} + k_{ic} + k_{isc})n \quad (19)$$

em que k_{ic} e k_{isc} são as constantes de velocidade dos processos de conversão interna e de cruzamento intersistemas, respectivamente.

No caso de processo estacionário:

$$I_{abs} = (k_{fl} + k_{ic} + k_{isc})n = \frac{1}{\tau}n \quad (20)$$

em que τ_0 é o tempo de vida real do estado S_{10} .

Assim, combinando as equações (17) e (20) pode se determinar o rendimento quântico como:

$$\phi_{fl} = \frac{I_{em}}{I_{abs}} = \frac{k_{fl}n}{(k_{fl}+k_{ic}+k_{isc})n} = \frac{k_{fl}}{k_{fl}+k_{ic}+k_{isc}} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (21)$$

2.4.2 - Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal

Correlação temporal de fótons únicos (do inglês *time-correlated single photon counting* - TCSPC) é a técnica normalmente usada para medir o tempo de vida da fluorescência, onde a amostra é excitada por um pulso de luz com largura temporal menor que seu tempo de decaimento τ . O pulso de excitação é descrito como uma função δ e excita uma população inicial n_0 de fluoróforos. A taxa de variação dessa população é proporcional ao número de moléculas excitadas $n(t)$ em um tempo t depois da excitação:

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(k_{fl} + k_n)n(t) \quad (22)$$

em que k_{fl} é a taxa de decaimento por emissão de fluorescência e k_n a taxa de decaimento não radiativo.

Integrando a equação anterior obtemos a expressão para o decaimento exponencial da população no estado excitado:

$$n(t) = n(0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (23)$$

O tempo de vida τ é o inverso da soma de todas as taxas que contribuem para diminuir a população no estado excitado, ou seja, a taxa de decaimento total. $\tau = (k_{fl} + k_n)^{-1}$ (24)

A intensidade da fluorescência é proporcional a $n(t)$ de acordo com a equação (23):

$$I = I_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (25)$$

em que I_0 é a intensidade da fluorescência no tempo inicial $t = 0$. (ITO et al., 2016)

Para decaimentos de intensidade que apresentam mais de uma espécie fluorescente, os ajustes são feitos por multi-exponenciais:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\frac{-t}{\tau_i}} \quad (26)$$

em que A_i representa as amplitudes das componentes para $t = 0$, τ_i são os tempos de decaimento e n é o número de espécies fluorescentes.

O tempo τ_{s_1} pode ser medido, por exemplo, através do decaimento da intensidade da fluorescência da amostra em função do tempo e, portanto, é comum chamar τ_{s_1} de tempo de vida da fluorescência (τ_f). O tempo de vida da fluorescência de uma substância geralmente representa um valor médio do tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. A emissão da fluorescência é um processo aleatório e poucas moléculas emitem seus fótons precisamente em $t = \tau_f$. (SILVA, 2010)

2.5 - Supressão da Fluorescência

Um supressor de fluorescência é um composto que adicionado a um fluoróforo leva a diminuição do seu rendimento quântico e/ou tempo de vida da fluorescência. Quando um supressor é adicionado numa solução

ele induz a relaxação não radiativa (supressão do soluto) por contato molecular com o cromóforo. Neste caso, o termo da supressão $k_Q [Q]$ deve ser adicionado a equação do rendimento quântico de fluorescência (21):

$$\varphi_{fl} = \frac{\tau}{\tau_0} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ic} + k_{isc} + k_Q [Q]} \quad (27)$$

em que k_Q é a constante de supressão biomolecular e $[Q]$ a concentração do supressor.

A supressão de solutos é uma ferramenta muito valiosa para estudos de proteínas, membranas e outras montagens supra ou macromoleculares, fornecendo informações sobre a localização de grupos fluorescentes na estrutura molecular examinada. A supressão de um fluoróforo, que está localizado na superfície da estrutura macromolecular será maior que a de um fluoróforo que está inserido em seu interior por estar mais acessível ao soluto. A técnica de supressão pode ser utilizada para investigar as características topográficas da estrutura examinada e para detectar alterações estruturais que podem ser causadas pela adição de compostos externos ou condições físicas alteradas. (LAKOWICZ, 2006) A análise da dependência da intensidade de fluorescência I_f , rendimento quântico φ_f ou tempo de vida da fluorescência τ com a concentração do supressor proporciona informação quantitativa sobre a acessibilidade do cromóforo dentro da estrutura macro ou supramolecular.

Dependendo da natureza química tanto do agente de supressão como do cromóforo, é necessário diferenciar as duas formas de supressão: dinâmica e estática.

Supressão estática

Esse tipo de supressão resulta da formação de um complexo não fluorescente fluoróforo-supressor, formado no estado fundamental do

fluoróforo. A principal característica para este tipo de supressão é que o aumento da concentração do supressor diminui a intensidade de fluorescência ou rendimento quântico, mas não afeta o tempo de vida da fluorescência. Outra característica importante da supressão estática é a sua diminuição com o aumento da temperatura, uma vez que a estabilidade do complexo fluoróforo-supressor no estado fundamental geralmente diminui com o aumento da temperatura.

Representando o fluoróforo por **A** e o supressor por **Q** temos a equação de equilíbrio da formação do complexo:

em que **K** é a constante de equilíbrio, dada por:

$$K = \frac{[A \dots Q]}{[Q][A]} \quad (29)$$

em que **[A...Q]**, é a concentração do complexo, **[A]** é a concentração da molécula fluorescente (fluoróforo) e **[Q]** a concentração do supressor, ambos na formas livre (não ligada), respectivamente.

$$[A] = [A]_0 - [A \dots Q] \quad \text{e} \quad [AQ] = [AQ]_0 - [A \dots Q] \quad (30)$$

em que **[A]₀** e **[Q]₀** são as concentrações totais do fluoróforo e do supressor, respectivamente.

A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração do fluoróforo livre. Desta forma:

$$\frac{I_{fl}}{I_{flQ}} = \frac{[A]_0}{[A]} = \frac{[A] + [A \dots Q]}{[A]} = 1 + \frac{[A \dots Q]}{[A]} \quad (31)$$

$$[A \dots Q] = K[Q][A] \quad (32)$$

$$\frac{I_{fl}}{I_{flQ}} = 1 + \frac{K[Q][A]}{[A]} = 1 + K[Q] \quad (33)$$

Se $[Q]_0 \gg [A]_0$ e $[Q] \cong [Q]_0$, então:

$$\frac{I_{fl}}{I_{flQ}} = 1 + K[Q]_0 = 1 + K_{sv}[Q] \quad (34)$$

A constante K_{sv} é chamada constante de Stern-Volmer, que no caso da supressão estática é uma constante de equilíbrio da formação do complexo.

Supressão dinâmica ou colisional

A presença de outras moléculas na solução pode diminuir o tempo de vida da fluorescência dos fluoróforos excitados por processos de colisão e consequentemente diminuir o rendimento quântico de fluorescência.

Se a supressão compete com o processo de relaxação radiativa, a proporção do rendimento quântico na sua ausência, φ_0 e na sua presença, φ , deve ser igual à relação dos tempos de vida correspondentes, τ_0/τ . A dependência da intensidade da fluorescência com a concentração do supressor no caso da supressão dinâmica é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{\varphi_0}{\varphi} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_{sv}[Q] = 1 + k_Q\tau_0[Q] \quad (35)$$

onde a constante de Stern-Volmer $k_{sv} = k_Q\tau_0[Q]$, k_Q é uma constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida do estado S_1 do fluoróforo na ausência de supressor. (SILVA, DA et al., 2014)

Assim, a partir de um gráfico $\frac{\tau_0}{\tau}$ ou $\frac{I_0}{I}$ em função da concentração do supressor, pode-se determinar a constante de supressão bimolecular, k_Q . (HOF et al., 2005)

Resumindo, a diferença entre a supressão dinâmica e a supressão estática é que na supressão dinâmica o tempo de vida de fluorescência diminui e na supressão estática o que diminui é a amplitude da fluorescência. (BORISSEVITCH, IOURI E. GONÇALVES, PABLO J. SCHABERLE, 2016)

2.6 – Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica de identificação, quantificação e caracterização molecular e estrutural de amostras, com base na sua composição elementar. Ajuda no esclarecimento estrutural de compostos ativos para comparação em banco de dados assim como para complementar sua caracterização junto a outras técnicas. (LANÇAS, 2009)

Tem como princípio a ionização do composto para formação de íons livres. Esses íons são fragmentados e detectados com base na sua relação de massa/carga (m/z). O registro do número de íons forma o espectro de massas. (SILVA, 2015)

Neste experimento foi utilizada a espectrometria de massas por inserção direta, através de análises *full scan* com fonte de ionização de electrospray (ESI) para a determinação do perfil químico da PpIX endógena.

ESI é considerada uma técnica suave de ionização que tem como principal característica a produção da molécula protonada ou desprotonada sem que ocorra a fragmentação desta. Isto facilita a identificação dos compostos utilizando suas respectivas massas moleculares, uma vez que a detecção é dada a partir da razão massa/carga (m/z).

Espectrometria de massa é a apresentação de fragmentos carregados positivamente versus suas concentrações relativas. (SILVA, 2015)

2.7 – Fotossensibilizadores (FS)

Com base nas características desejadas para os FS neste trabalho estudamos os compostos detalhados a seguir.

2.7.1 – Protoporfirina IX (PpIX)

A PpIX é um fotossensibilizador intrínseco do corpo humano. A PpIX é precursor da síntese do grupo heme, que é responsável pelo transporte de oxigênio molecular no organismo. A PpIX emite forte fluorescência, produz eficientemente o oxigênio singlete e tem afinidade por tecidos doentes, o que a torna um FS eficiente. (LEE et al., 2007) A PpIX possui rendimento quântico da fluorescência de 0,011 em tampão PBS. (LOZOVAYA et al., 1990)

Figura 2.3: Representação estrutural da PpIX.

Neste trabalho usamos dois tipos de protoporfirina: PpIX de origem endógena e PpIX sintética.

PpIX sintética

A PpIX sintética foi adquirida da Sigma-Aldrich. Seu peso molecular (PM) é 562,66 g/mol e coeficiente de absorção molar $\epsilon = 1,48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

cm^{-1} em solução tampão PBS no comprimento de onda 380 nm. (PENA, 2013)

PpIX é pouco solúvel em água. Ela apresenta absorção ótica em duas regiões, uma entre os comprimentos de onda 300 e 450 nm região conhecida como banda de Soret, onde a absorção é mais intensa, e outra entre 550 e 700 nm onde possui vários picos de menor intensidade, chamada de bandas Q. Quando excitada emite fluorescência com o máximo em 628 nm, como mostra a figura 2.4.

Figura 2.4: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da PpIX sintética.

PpIX endógena

A PpIX endógena foi extraída da glândula Harderiana de ratos da linhagem Wistar e cedida pelo Dr. Edmyr Rosa dos Reis da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Foram utilizados entre 30 e 40 ratos da linhagem Wistar SPF (Specific Pathogen Free) da espécie *Rattus Novergicus Albinus* apenas do sexo masculino com idade de 20 semanas, pesando aproximadamente 380g. Os animais SPF foram mantidos em condições ambientais e alimentares normais, em caixas de polipropileno com 5 indivíduos por caixa, alimentados com ração para ratos comercial (Labina, da marca Purina) e água. Os procedimentos executados obedeceram à ética internacional sobre a gestão de animais de experimentação. Os ratos foram anestesiados com uma dose intravenosa de 0,3ml/100g com o

anestésico Sodium Thiopental 25g/ml e após a retirada da foram eutanasiados por aprofundamento do anestésico.

Para extração da PpIX foi utilizado o método executado por (LIM et al., 2000) com modificações. Após a extração, as glândulas foram lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio 0,99 M para a retirada de resíduos de sangue, depois fragmentadas e colocadas em um homogeneizador de vidro. O material foi centrifugado a 15000 rpm a 5°C por 5 minutos. Após o descarte do pélete, o sobrenadante foi colocado em frasco âmbar e estocado a 5°C. (REIS; NICOLA, ESTER MARIA DANIELLI NICOLA, 2005; REIS et al., 2013)

Semelhante a sintética, o espectro de absorção ótica da PpIX endógena possui absorção na banda de Soret entre os comprimentos de onda 350 e 450 nm. Quando excitada em 410 nm emite fluorescência, com máximo em 637 nm. Seu coeficiente de absorção molar (ϵ), em solução tampão PBS, é $1,48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ no comprimento de onda de 410 nm.

Figura 2.5: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da PpIX endógena.

2.7.2 – Corante ciânico com dois cromóforos (BCD)

Os corantes ciânicos (CC) ou cianinas pertencem à família de corantes sintéticos que possuem grupos de polimetina. São compostos por

grupos metina ($-\text{CH}=\text{}$) ligados de forma alternada por ligações simples e duplas (sistema de conjugação π), como mostra a figura 2.6.

Figura 2.6: Estrutura geral dos corantes cianicos.

As possibilidades sintéticas e a estabilidade química são influenciadas pelo comprimento da cadeia, e geralmente diminuem com o aumento do seu comprimento. Esta estrutura permite sintetizar CC com intervalo de absorção maior do que outras classes de corantes conhecidas, podendo absorver desde o UV até o infravermelho, variando-se o comprimento da cadeia. (KOSTYUKOVA et al., 2017).

Entre os CC, os corantes cianicos com dois cromóforos atraem um interesse especial, pois possuem potencial para uso como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica por apresentarem alta fotocitotoxicidade contra células de câncer, serem catiônicos e possuírem tendência a se acumular, de forma seletiva e preferencial, na mitocôndria de células neoplásicas do que em células normais. (DELAHEY et al., 2000; MURAKAMI et al., 2015)

A geometria dos cromóforos nestes compostos modifica seus espectros de absorção. Figura 2.7.

Figura 2.7: Fórmula estrutural geral dos BCDs.

Quando os cromóforos estão posicionados formando um ângulo de 0° entre as cadeias a absorção é maior em comprimentos de onda menores. Isso acontece por causa da incidência da onda eletromagnética que induz dipolos com o mesmo sentido dos cromóforos, que aumenta a repulsão eletrostática entre eles, aumentando a probabilidade de ocorrer transição em bandas de maior energia.

Agora se o ângulo entre eles for 180° a onda eletromagnética alinha os cromóforos de modo que os pólos com cargas diferentes fiquem lado a lado e a probabilidade maior é que ocorra transição em bandas de energia menor, conforme mostrado na figura 2.8.

Figura 2.8: Posição relativa dos dipolos induzidos pela luz: a) dipolos com 0° e b) dipolos com 180° entre os cromóforos.

Na situação intermediária, onde o ângulo entre os cromóforos é 90° a interação entre os dipolos é simétrica, fazendo com que haja probabilidade de ocorrer transição nas duas bandas.

Neste trabalho usamos os BCDs de duas configurações: 180° (BCD-180) e 90° (BCD-90) entre os cromóforos. Eles foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciência da Ucrânia. Possuem peso molecular (PM) de 653 g/mol e carga líquida +2. Como mostrado nas figuras 2.9 e 2.11.

Os BCDs são pouco solúveis em água. Por isso suas soluções estoque de alta concentração foram preparadas em etanol.

BCD-90

Em solução aquosa o corante BCD-90 possui coeficiente de absorção molar (ϵ) de $0,88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ no comprimento de onda $\lambda = 618 \text{ nm}$ e rendimento quântico da fluorescência $\phi_f = 0,2$ (SCHABERLE, 2007). Seu espectro de absorção tem dois máximos principais, um no comprimento de onda 502 nm e o outro em 618 nm. Quando excitado ele emite fluorescência com o máximo em 640 nm.

Figura 2.9: Fórmula estrutural do BCD-90.

Figura 2.10: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência do BCD-90.

BCD-180^o

Em solução aquosa o corante BCD-180 possui o coeficiente de absorção molar $1,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em comprimento de onda $\lambda = 633 \text{ nm}$ e rendimento quântico da fluorescência $\phi_f = 0,018$ (SCHABERLE, 2007).

Seu espectro de absorção tem o máximo no comprimento de onda de 633 nm e quando excitado emite fluorescência em 650 nm. (SCHABERLE et al., 2003)

Figura 2.11: Fórmula estrutural do BCD-180.

Figura 2.12: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência do BCD-180.

2.7.3 - Acridina Laranja (AL)

A acridina laranja (AL) é um corante, que em soluções aquosas é protonado em pH menor que 10 e por isso possui carga líquida +1 nas condições usadas neste trabalho.

Devido à suas propriedades, tais como afinidade por várias estruturas biológicas, rendimentos quânticos da fluorescência e estado tripleto elevados, a AL é aplicada como sonda fluorescente, detector de pH intracelular e fotossensibilizador na terapia fotodinâmica. A AL se liga a ácidos nucleicos (ADN e ARN), de modo do intercalante (KOSOWER et al., 1992; AMADO et al., 2016; CHATTERJEE; KUMAR, 2016).

As acridinas possuem um núcleo heteroaromático planar policondensado.(Fig. 2.11)

Figura 2.13: Fórmula estrutural da acridina laranja.

A AL tem coloração laranja intensa, como sugere o próprio nome. Seu o espectro de absorção tem pico em 489 nm e quando excitada emite fluorescência em 530 nm. O rendimento quântico da fluorescência da AL com concentração 2,0 μM é 0,25 (KUBOTA; STEINER, 1977); em concentrações maiores esse valor diminui principalmente por sua capacidade de autoagregação.

Figura 2.14: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da Acridina Laranja.

2.7.4 – Nitrofurantoína (NFT)

A nitrofurantoína (NFT) é um derivado de nitrofurano (DNF), compostos usados clinicamente como anti-inflamatórios, antissépticos e antibióticos. (KLEIN; CUNHA, 2001; HOF et al., 2005; ARYA et al., 2006; KASHANIAN et al., 2008) A NFT possui um amplo espectro de ação, sendo utilizada no combate a bactérias gram-positivas e gram-negativas,

atuando principalmente no tratamento de infecções urinárias. (GUAY, 2002) A citotoxicidade dos DNF está relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO.

Figura 2.15: Fórmula estrutural da NFT.

A NFT tem coloração amarela e possui intensa absorção de luz na região entre 320 e 420 nm. Sendo irradiada nessa região a NFT realiza várias reações secundárias (PARRA, 2010). Entre elas, a mais importante é a fotoliberação do radical NO, que determina sua fotocitotoxicidade contra células neoplásicas e não necessita da presença do oxigênio, abrindo um caminho alternativo de fotoquimioterapia (FERREIRA et al., 2017). A NFT possui os rendimentos quânticos de fluorescência e do estado tripleto extremamente baixos $\varphi_f \approx 0,03\%$ e $\varphi_T \approx 0,0001\%$ e o tempo de vida do estado tripleto extremamente curto ($\tau_T = 0,22 \mu s$), o que torna a produção de oxigênio singlete desprezível e exclui esse mecanismo de fotocitotoxicidade (PARRA et al., 2017).

Apesar do espectro de absorção da NFT estar localizado fora da região entre 600 e 800 nm ("janela fototerapêutica"), a NFT pode ser eficaz no fototratamento de doenças de pele. No entanto, foi demonstrado que a NFT possui alta efetividade de absorção de dois fótons, o que permite sua excitação com luz na faixa espectral $\lambda > 600$ nm. (SILVA et al., 2012; FERREIRA et al., 2017).

Devido a presença dos átomos de nitrogênio na sua estrutura, a NFT pode ser protonada, possuindo dois pontos de pK_a (GUAY, 2002; HUTTNER

et al., 2015) cuja posição depende da força iônica. A protonação afeta o processo de liberação do NO e, conseqüentemente, a fotoatividade da NFT.

Após ser introduzida no organismo a NFT encontra-se num ambiente onde ela pode interagir com diversas estruturas biológicas, tais como membranas celulares e biopolímeros. Essa interação pode afetar sua fotoatividade devido ao deslocamento dos pontos de protonação pela sua ligação com essas estruturas. (BURMICZ et al., 1976) O mesmo efeito pode ser esperado pela interação da NFT com a albumina, que exerce o papel de carreador da NFT no organismo.

Os espectros de absorção e de emissão da fluorescência se deslocam dependendo do pH do meio, e, portanto, a NFT pode estar na forma desprotonada, protonada e biprotonada. Os espectros da figura 2.14 mostram a NFT em pH neutro, protonada e desprotonada.

Figura 2.16: Espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da Nitrofurantoína em função do pH da solução.

2.8 – Albumina

A ASB é a proteína mais abundante no sangue bovino. Seu peso molecular é de 66.462 g/mol (HIRAYAMA, 1990; CARTER; HO, 1994). Devido sua estrutura ser muito semelhante àquela da albumina de soro humano (ASH) essa proteína é amplamente usada em estudos de cunho científico como um modelo de ASH. (STEINHARDT et al., 1971; GELAMO et al., 2002; WUNDER et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2015)

ASB é uma cadeia polipeptídica simples com 583 resíduos de aminoácidos e três domínios. A ASB também pode formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada (HIRAYAMA, 1990).

O ponto isoelétrico (PI) da ASB está em torno de 4,70 – 5,60 (EMERSON, 1989; CARTER; HO, 1994). O PI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A ASB está carregada negativamente no pH 7,0 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH entre 4 e 8 (HIRAYAMA, 1990; PENA, 2013). ASB não é carregada uniformemente na sua estrutura primária. Em pH neutro, ela possui uma rede de cargas de -10, -8 e 0 para os seus três domínios I, II, III. Cada domínio é constituído por um cilindro formado de 6 hélices, e cada um destes domínios é constituído por dois subdomínios formados por 2 α -hélices que estão covalentemente ligadas por pontes de dissulfeto. Como já foi dito, estruturalmente, a ASB é muito semelhante à ASH (GELAMO et al., 2002; NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013), mantendo cerca de 76% da identidade sequencial da ASH e, sob o ponto de vista espectroscópico, difere por ter dois resíduos de triptofano, o W₁₃₁ e o W₂₁₄, enquanto que a ASH possui apenas o W₂₁₄ (SCHVEITZER; BIANCA, 2006; MUKHERJEE et al., 2015).

Figura 2.17: Estrutura tridimensional da ASB modificada de (NAVEENRAJ; ANANDAN, 2013)

A ASB é o principal carreador de ácidos graxos que são insolúveis no plasma sanguíneo, ela elimina radicais livres de oxigênio e desativa vários metabólitos lipofílicos tóxicos, como a bilirrubina (EMERSON, 1989). A albumina tem uma alta afinidade por ácidos graxos, hematinas, bilirrubina, e uma grande afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Como uma proteína de transporte multifuncional, a albumina é o carreador o qual que tem implicado em vários processos fisiológicos importantes (GOLDBERG, 1952; FERREIRA, 2009).

O pico de absorção da albumina está entre 278-279 nm, e não exatamente no comprimento de onda 280 nm, normalmente usado nos trabalhos experimentais. O coeficiente de absorção molar (ϵ) da ASB correspondente a 279 nm seria de $44.720 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para a medição baseada em preparações de albumina supondo que ela contém não mais que 1,18% de material não peptídico.

A fluorescência da albumina é dominada pelos seus resíduos de triptofano. Quando excitada no comprimento de onda entre 295 e 305 nm, a energia é absorvida quase exclusivamente pelos triptofanos, os quais possuem picos de emissão em 343 nm. Se o comprimento de onda de excitação mudar para 280 nm, a emissão é ligeiramente deslocada para o azul por causa da transferência de energia de forma não radiativa das cadeias de tirosina que excita os triptofanos. (PETERS, 1985)

Figura 2.18: Espectros de absorção e de emissão de fluorescência da ASB.

3. Objetivos e Justificativa

3.1 - Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar a interação entre a albumina de soro bovino e diversos fotossensibilizadores com potencial para aplicação em fotomedicina. Utilizando técnicas espectroscópicas estáticas e com resolução temporal, pretende-se avaliar como esta interação interfere nas propriedades fotofísicas dos FS de modo a estabelecer os parâmetros desta interação, a fim de propor o uso de albuminas como carregadores destes FS.

3.2 – Justificativa

Um problema na fotoquimioterapia e no diagnóstico com uso de compostos fotoativos (FS) é aumentar a afinidade dos FS com tecidos doentes, a fim de aumentar sua seletividade. Para atingir esse resultado são usados carregadores específicos, que conduzem os FS até o tecido a ser tratado. As albuminas possuem características promissoras para serem usadas com carregadores. Entretanto, a ligação com carregadores pode afetar as características dos FS, afetando assim sua eficiência nas aplicações médicas. Desse ponto de vista é importante:

1. Determinar as características da interação dos FS com a albumina.
2. Estudar o efeito dessa interação nas características fotofísicas dos FS.

Esses estudos são os objetivos desse trabalho.

4. Materiais e Métodos

4.1 – Materiais usados e preparação das amostras.

Nitrofurantoína (NFT), acridina laranja (AL) e protoporfirina (PpIX) sintética foram adquiridas da Sigma-Aldrich; albumina de soro bovino foi obtida da Inlab Confiança. Os corantes cianicos com dois cromóforos foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciência da Ucrânia. A protoporfirina endógena foi extraída da glândula Harderiana de ratos e cedida pelo Dr Edmyr Rosa dos Reis da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Com exceção da AL, que é altamente solúvel em água, os demais compostos em estudo foram solubilizados previamente em solventes orgânicos e posteriormente diluídos em PBS (pH 7,3 e 7,5 mM) para a realização experimento. Ambas as porfirinas – PpIX sintética e endógena, foram solubilizadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) e Acetonitrila (ACN) na proporção ACN/DMSO 3:1. Os BCDs foram solubilizados em etanol, enquanto DMSO foi utilizado para solubilizar a NFT. Em todos os casos, o volume final dos solventes orgânicos na amostra em estudo foi menor que 5%.

A ASB foi dissolvida em solução tampão e as soluções estoque preparadas nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M, 1 mM e 5 mM.

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (24°C).

4.2 – Técnicas experimentais

4.2.1 – Espectroscopia de Absorção Ótica:

Os espectros de absorção foram monitorados no espectrofotômetro *Ultraspec 2100* da Biochrom. Nas medidas foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

4.2.2 – Espectroscopia de fluorescência:

Os espectros de emissão de fluorescência estática foram registrados pelo espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* em cubetas de quartzo de 1x1 cm. A correção dos espectros de fluorescência foi realizada de acordo com a equação:

$$I_i = \frac{F_i}{A_i} \quad (36)$$

onde I_i é a intensidade da fluorescência corrigida para concentração i , F_i a emissão da fluorescência e A_i a absorbância medida para concentração i .

Para excluir o efeito de filtro interno, a absorbância da amostra no comprimento de onda de excitação não ultrapassou 0,2.

4.2.3 – Tempo de vida da fluorescência

Para determinar as características temporais da fluorescência das amostras foi utilizada a técnica de contagem de fótons únicos.

Correlação temporal de fótons únicos do inglês *time-correlated single photon counting* (TCSPC) é uma técnica comumente utilizada para medir o tempo de vida da fluorescência. Ela consiste na detecção de eventos gerados por fótons únicos, cujo tempo de chegada está correlacionado com o pulso laser utilizado para excitar a amostra. Por usar um laser pulsado de alta taxa de repetição, este processo pode ser repetido várias vezes. Com esses vários eventos de contagem consegue-se construir um histograma da distribuição de fótons em função do tempo (Figura 4.1).

Figura 4.1: Princípio das medidas feitas pelo TCSPC, modificado de (*Handbook: PML-16C and PML-16 GaAsP 16-Channel TCSPC / FLIM Detectors; PML-SPEC and MW FLIM Multi-Wavelength Detectors.*, 2016).

Neste trabalho foi utilizado um laser pulsado *Tsunami 3950* de titânio-safira (*Ti:sapphire*) bombeado por um laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*), com potência máxima de saída de 10W em 532 nm. A frequência de pulsos gerada no *Tsunami* foi ajustada por um *Pulse Picker 3986* (*Spectra Physics*). A saída do laser é dada entre 850 e 930 nm. O comprimento de onda pode ser escolhido com o auxílio de geradores de harmônicos, como o *Flexible Harmonic Generator – FHG* (*Spectra Physics*), que podem dobrar ou triplicar a frequência. O pulso de excitação é direcionado para o espectrômetro *Edinburgh FL900*, com configuração em formato de L. O comprimento de onda de emissão é selecionado por um monocromador e os fótons emitidos são detectados por uma fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu/C4878/* e são correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio de um conversor tempo-amplitude. A largura à meia altura da função resposta do instrumento é tipicamente 0,2 a 0,5 ns. As medidas foram feitas com uma resolução temporal de 24 ps por canal. O *software F900*, fornecido pela *Edinburgh Instruments*, foi utilizado para análise inicial dos dados de decaimento. A inspeção do ajuste dado pelo *software* foi feita pela observação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (qui-quadrado) reduzido.

4.2.4 – Microscopia de imagens pelo tempo de vida de fluorescência (FLIM)

A técnica de microscopia de imagens pelo tempo de vida (FLIM) consiste no uso de um microscópio laser que registra o tempo de chegada do fóton numa determinada área da amostra bem como as coordenadas do feixe de laser no escaneamento dessa área. Essas informações são utilizadas para construir uma matriz tridimensional em que para cada pixel da imagem escaneada não apenas a intensidade de fluorescência é registrada como também a curva de decaimento da fluorescência é armazenada.

O módulo TCSPC recebe o pulso sincronizado, o número de canal da fotomultiplicadora e os sinais da área varrida pelo microscópio. O módulo TCSPC determina para cada fóton sua localização dentro da área de varredura (x, y) e o tempo do fóton na sequência do pulso laser (t). Esses valores são salvos em uma memória onde os eventos de detecção são acumulados. Assim, é feita a distribuição da densidade de fótons nas coordenadas x, y e t .

Figura 4.2: Configuração TCSPC para a obtenção de imagens de tempo de vida de fluorescência (FLIM), modificado de (Handbook: PML-16C and PML-16 GaAsP 16-Channel TCSPC / FLIM Detectors; PML-SPEC and MW FLIM Multi-Wavelength Detectors., 2016)

O equipamento de microscopia de fluorescência com resolução temporal *MicroTime 200* (PicoQuant) foi utilizado neste trabalho. Este

equipamento é composto por uma objetiva *Olympus UPlanSApo* de imersão em água com aumento de 60 vezes e abertura numérica de 1,2. Um volume de cerca de 20 μL da solução é colocado sobre uma lamínula de vidro, sendo as medidas feitas 20 μm acima da superfície da lamínula. Para cada um dos compostos em estudo, as amostras foram excitadas em combinações diferentes de comprimento de onda, frequência, potência de excitação na objetiva, dicróico, posição do tubo de lentes, focando o feixe de emissão no *pinhole* de 50 μm . Para a coleta da fluorescência emitida pela amostra foram utilizados filtros passa-alta com características que variaram conforme o composto utilizado. Antes de iniciar as medidas, o sistema foi realinhado para maximizar a coleta do feixe de emissão através do seu alinhamento no *pinhole* e na área do detector. (SILVA, 2010)

4.2.5 – Espectrometria de massas

Nesse estudo a análise por espectrometria de massas via inserção direta da amostra foi realizada usando um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado aos detectores de arranjo de diodos (do inglês, Diode Array Detector – DAD) e ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo de análise. As amostras foram preparadas em MeOH e subsequentemente, um volume de 3 μL de amostra foi injetada dentro da fonte de ionização por eletrospray em modo de análise Full-Scan (ESI-EM). Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = 3.2 kV, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte Z-spray de 150°C, temperatura de dessolvatação do gás N_2 de 250°C, fluxo do gás de dessolvatação = 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise Full-scan foi de 150 a 1200 unidades de massa (u). (BARBÃO et al., 2014; SILVA, 2015)

5. Resultados e Discussões

5.1 - Parte 1

Os resultados apresentados a seguir se referem ao estudo da interação entre diversos fotossensibilizadores (FS) e albumina de soro bovino (ASB) utilizando uma concentração fixa dos FS e variando a concentração de ASB na solução. Serão apresentadas as mudanças nas características fotofísicas dos FS como resultado desta interação, utilizando espectroscopia de absorção ótica, fluorescência estática e com resolução temporal.

5.1.1 - Protoporfirina IX (PpIX) endógena e sintética

Espectroscopia de absorção ótica

A Figura 5.1 mostra o espectro de absorção da PpIX endógena, caracterizado por bandas de absorção centradas em 410 nm (Região Soret) e quatro bandas na região Q, com máximos em 507, 542, 579 e 635 nm. A adição de albumina de soro bovino (ASB) nas concentrações entre 0,2 e 1,4 μM nesta solução não causa mudanças significativas na forma e na intensidade do espectro da porfirina.

Figura 5.1: Espectro de absorção da PpIX endógena (129 μM) na ausência e na presença de ASB em concentrações 0,2; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,4 μM .

A PpIX sintética por sua vez é caracterizada por bandas de absorção em 378 nm (Banda Soret) e 548, 596 e 645 nm (Bandas Q). A concentração de porfirina sintética utilizada foi 153 μM enquanto a concentração de ASB variou entre 0,01 e 301 μM (Fig. 5.2).

Verificou-se que em baixas concentrações de ASB (entre 0,01 e 0,5 μM) a absorção da Banda Soret diminuiu consideravelmente e o espectro começou a se deslocar para regiões de maiores comprimentos de onda (deslocamento batocrômico). Com um posterior aumento no conteúdo de ASB na solução, $[\text{ASB}] > 0,5 \mu\text{M}$, verificou-se um aumento na absorção ótica da porfirina, acompanhado do deslocamento do máximo de absorção. Este processo é estabilizado com concentrações de ASB em torno de 300 μM , e Banda Soret centrada em 407 nm.

Figura 5.2: Mudanças no espectro de absorção da PpIX sintética (153 μM) devido à adição de ASB (0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 51; 201 e 301 μM).

A redução da absorbância da PpIX sintética logo no início da adição de ASB está associada à redução da forma monomérica da porfirina em solução, possivelmente devido à formação de agregados da PpIX estimulada pela interação com ASB.

Com o aumento no conteúdo de ASB, a partir da concentração de 0,5 μM , os agregados da porfirina começam a se separar entre os sítios de ligação de diferentes moléculas de ASB, surgindo então a forma monomérica da porfirina ligada à albumina. Um aumento ainda maior na

concentração de albumina aumenta o conteúdo da espécie monomérica da PpIX ligada à ASB.

Espectros de emissão de fluorescência

O espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena é caracterizado por uma banda com máximo em 637 nm. A adição de ASB na solução não altera a intensidade nem o perfil da banda de emissão da porfirina (Fig. 5.3).

Figura 5.3: *Espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena em função da concentração de ASB: 0,2; 0,4; 0,7; 1,0 e 1,4 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$.*

O espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética apresenta um máximo de emissão em 628 nm com um ombro em 663 nm. Inicialmente, a adição de ASB em baixas concentrações (0,1 μM) leva a uma redução da intensidade de emissão da porfirina. Um posterior aumento no conteúdo de albumina induz ao forte aumento da intensidade de emissão acompanhado pelo deslocamento batocrômico do espectro, com banda centrada em 630 nm e um ombro em 672 nm (Fig. 5.4).

Figura 5.4: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em função da concentração de ASB. $\lambda_{\text{exc}} = 407 \text{ nm}$.

De modo similar aos resultados de absorção ótica, verifica-se que há um forte efeito da interação entre PpIX sintética e a ASB, o que causa fortes mudanças nos espectros de emissão de fluorescência da porfirina. Entretanto, o mesmo comportamento não é observado com a PpIX endógena.

Tempo de vida de fluorescência

O perfil de decaimento de fluorescência da PpIX endógena apresenta comportamento mono-exponencial, com um tempo de vida de $\sim 16,8 \text{ ns}$ (Fig. 5.5, Tabela 5.1). A adição de ASB na solução praticamente não altera a curva cinética de decaimento da fluorescência.

Figura 5.5: Perfil do decaimento da fluorescência da PpIX endógena em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 637 \text{ nm}$.

Associamos esse tempo de vida à fluorescência dos monômeros da PpIX endógena.

Por outro lado, a PpIX sintética tem um perfil de decaimento bi-exponencial, com tempos $t_1 \approx 19,8 \text{ ns}$ e $t_2 \approx 6,0 \text{ ns}$. Após a adição de ASB na solução, foi observada uma diminuição da contribuição da componente α_1 com tempo de vida t_1 e um aumento da contribuição da componente α_2 com tempo t_2 , com o aumento da concentração de ASB. Associamos estes tempos de vida às duas formas da PpIX em solução e este aumento de α_2 à ligação da PpIX com a albumina (Tabela 5.1).

Figura 5.6: Perfis de decaimento de fluorescência da PpIX sintética em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 638 \text{ nm}$.

Tabela 5.1: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência da PpIX endógena e sintética em função da concentração de ASB.

FS	[ASB](μM)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2
PpIX endógena	0	$16,7 \pm 0,2$	1,0	---	---
	0,4	$16,9 \pm 0,2$	1,0	---	---
	1,4	$17,0 \pm 0,2$	1,0	---	---
PpIX sintética	0	$19,2 \pm 0,2$	0,88	$4,0 \pm 0,2$	0,12
	21	$20,3 \pm 0,2$	0,73	$5,9 \pm 0,2$	0,27
	200	$19,5 \pm 0,2$	0,58	$7,0 \pm 0,2$	0,42

5.1.2 - Corantes ciânicos com dois cromóforos

Espectroscopia de absorção ótica

O BCD-180 é caracterizado por uma banda de absorção mais intensa centrada em 633 nm e outras duas bandas com menor intensidade em 553 e 597 nm (Fig. 5.7a). O BCD-90 é caracterizado por duas bandas de absorção com intensidades similares, centradas em 502 e 618 nm e por duas bandas de menor intensidade em 477 e 581 nm (Fig. 5.7b).

A adição de ASB entre 6 e 665 μM em soluções induz as mudanças no espectro de absorção de ambos os corantes (Fig.5.7).

Figura 5.7: Mudanças nos espectros de absorção do BCD-180, 3,4 μM (a) e do BCD-90, 2,5 μM (b) em função da concentração de ASB.

Estas mudanças podem ser divididas em 2 etapas: *i*) redução da absorbância do máximo inicial de absorção em concentrações reduzidas de ASB; *ii*) posterior aumento da absorbância com deslocamento do pico de absorção para a região de maiores comprimentos de onda, até permanecer estável numa concentração de ASB em torno de 500 μM .

Estes resultados indicam que ambos os BCDs interagem com a ASB de forma similar. Na ausência da albumina as moléculas de BCD se encontram na forma monomérica livre na solução. Com a adição de pequenas quantidades de ASB ocorre a ligação do corante com os sítios de ligação da ASB e sua agregação nesses sítios, o que é refletido na redução da absorbância.

Com o aumento na concentração de ASB na solução, o corante começa a se desagregar em favor de sua ligação com outras moléculas de albumina, de modo que, ao final deste processo apenas monômeros de BCD ligados às moléculas de albumina estão presentes na solução. Esta espécie ligada apresenta uma maior absorbância comparada à forma monomérica livre, e é caracterizada por máximos de absorção em 643 nm para o BCD-180, e 514 e 633 nm para o BCD-90.

Espectros de emissão de fluorescência

O espectro de emissão do BCD-180 é caracterizado por uma banda com máximo em 650 nm, enquanto o BCD-90 apresenta um máximo de emissão em 640 nm. Ambos os BCDs possuem fraca emissão de fluorescência em solução aquosa, com rendimento quântico em torno de 0,018. (SCHABERLE et al., 2003)

A adição de ASB na solução induz a um aumento considerável na intensidade de emissão de ambos os corantes, até se aproximar do equilíbrio em concentrações de ASB em torno de 600 μM , para o BCD-180 (Fig. 5.8a) e em torno de 350 μM , para o BCD-90 (Fig. 5.8b).

Figura 5.8: Mudanças nos espectros de emissão de fluorescência do BCD-180 (a) e BCD-90 (b) em função da concentração de ASB. $\lambda_{exc} = 640$ nm.

Estes resultados confirmam a formação de monômeros de corante ligados à albumina, os quais apresentam uma intensa emissão de fluorescência.

Esta interação ocorre de forma mais pronunciada entre o BCD-90 e a ASB, uma vez que a condição de equilíbrio é estabelecida numa razão $[ABS]/[BCD]$ menor para este corante.

Tempo de vida de fluorescência

Os tempos de vida de fluorescência dos BCDs foram medidos no microscópio confocal no comprimento de onda de 640 nm e os fótons detectados passaram por um filtro passa alta de 650 nm.

O BCD-180 apresenta um perfil de decaimento bi-exponencial, com tempos de vida $t_1 = 0,15$ ns e $t_2 = 1,3$ ns (Fig. 5.9). Após a adição de ASB, verifica-se o aumento do tempo de vida t_1 para 0,4 ns enquanto t_2 permanece inalterado.

Figura 5.9: Perfis de decaimento de fluorescência do BCD-180 em função da concentração de ASB. $\lambda_{ex} = 640$ nm; $\lambda_{em} = 650$ nm.

Um comportamento similar no perfil de decaimento da fluorescência foi observado na interação do BCD-90 e a albumina. O BCD-90 apresenta um perfil bi-exponencial de decaimento do tempo de vida com $t_1 = 0,4$ ns e $t_2 = 2,0$ ns. Após a adição de ASB verificou-se um aumento do tempo de vida do corante, com $t_1 = 1,0$ ns e $t_2 = 3,4$ ns (Fig. 5.10).

Figura 5.10: Perfis de decaimento de fluorescência do BCD-90 em função da concentração de ASB na solução. $\lambda_{ex} = 640 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$.

Verificou-se que para ambos os corantes o aumento na concentração da albumina é acompanhado pela redução da contribuição do tempo de vida τ_1 paralelamente ao aumento da contribuição da componente de maior tempo de vida na amostra (α_2) (Tabela 5.2). Associamos este fato à ligação do BCD com a albumina.

Tabela 5.2: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência de BCD-180 e BCD-90 na ausência e na presença de ASB.

FS	[ASB](μM)	τ_1 (ns)	α_1	τ_2 (ns)	α_2
BCD-180	0	$0,12 \pm 0,02$	0,98	$1,4 \pm 0,1$	0,02
	11	$0,13 \pm 0,02$	0,86	$1,15 \pm 0,1$	0,14
	33	$0,20 \pm 0,02$	0,72	$1,3 \pm 0,1$	0,28
	413	$0,36 \pm 0,02$	0,68	$1,3 \pm 0,1$	0,32
BCD-90	0	$0,4 \pm 0,1$	0,95	$2,0 \pm 0,1$	0,05
	6	$1,1 \pm 0,1$	0,91	$7,7 \pm 0,1$	0,09
	20	$1,0 \pm 0,1$	0,81	$3,5 \pm 0,1$	0,19
	500	$1,1 \pm 0,1$	0,72	$3,4 \pm 0,1$	0,28

5.1.3 - Nitrofurantoína (NFT)

Espectroscopia de absorção ótica

A NFT é caracterizada por bandas de absorção centradas em 378 nm no pH 7,3 e 384 nm no pH 8,5 e 366 nm no pH 5,0. Neste estudo foi avaliado o efeito do pH na interação entre NFT e ASB. Foram utilizadas concentrações de NFT de 34 μM em pH 7,3 e 27 μM em pH 8,5 e 5,0.

A adição de ASB em concentrações entre 11 e 391 μM induz a poucas modificações nos espectros de absorção da NFT, independentemente do pH da solução (Fig. 5.11). Foi observado apenas um deslocamento batocrômico acompanhado de uma fraca redução na intensidade da banda de absorção da NFT.

Figura 5.11: Mudanças nos espectros de absorção da NFT em função da concentração de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c).

Baseando-se apenas nestes resultados, não é possível indicar se há ou não interação entre a ASB e a NFT. Em busca de maiores informações, medidas de fluorescência foram necessárias para avaliar esta interação.

Espectros de emissão de fluorescência

A NFT é caracterizada por bandas de emissão de fluorescência centradas em 554 nm no pH 7,3 e 536 nm nos pHs 8,5 e 5,0. Em solução aquosa, a NFT possui um baixo rendimento quântico de fluorescência, $\Phi_{fluor} \approx 0,0003$, independente de seu estado de protonação. (PARRA et al., 2017)

A adição de ASB na solução contendo NFT leva a um forte aumento na intensidade de emissão da NFT, acompanhado de um deslocamento do máximo de emissão para região de menores comprimentos de onda em pH 7,3 (Fig. 5.12a). Este deslocamento é mais pronunciado em pHs 8,5 (Fig. 5.12b) e 5,0 (Fig. 5.12c).

Figura 5.12: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da NFT com adição de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c), $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$.

Estas significativas mudanças espectrais no estado excitado da nitrofurantoína indicam uma acentuada interação entre NFT e ASB, que resulta no aumento do seu rendimento quântico de emissão de fluorescência.

Tempo de vida de fluorescência

A NFT em pH 7,3 apresenta curva de decaimento de fluorescência com perfil bi-exponencial, caracterizado pelos tempos $t_1 = 0,03$ ns e $t_2 = 1,6$ ns. O valor de pH 7,3 é próximo ao ponto de protonação da NFT ($pK_a \approx 7,2$ (BURMICZ et al., 1976)). Por isso associamos esses dois tempos à existência de duas formas de NFT de diferentes estados de protonação em equilíbrio na solução. Entretanto, o primeiro tempo é muito próximo daquele do pulso de excitação. Por isso não podemos considerar seu valor confiável. Após a adição de ASB ocorre um aumento significativo nos tempos de vida de fluorescência, $t_1 = 0,36$ ns e $t_2 = 3,8$ ns (Fig.5.13a), indicando a ligação da NFT à albumina. Além disso, observamos aumento da contribuição do tempo curto α_1 (Tabela 5.3), que pode ser associado com o deslocamento do equilíbrio das formas de NFT em favor da forma com tempo mais curto. Em pH 8,5 e pH 5,0 as curvas de decaimento tem caráter complexo (Fig. 5.13 b, c). Devido à baixa intensidade e tempo curto da fluorescência não conseguimos uma análise confiável das curvas de decaimento nesses pHs. Podemos constatar somente o aumento do tempo médio de decaimento com o aumento da concentração do ASB, confirmando a ligação da NFT com a ASB.

Figura 5.13: Perfil de curvas de decaimento de fluorescência da NFT em função da concentração de ASB em pH 7,3 (a); pH 8,5 (b) e pH 5,0 (c), $\lambda_{\text{ex}} = 423\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 560\text{nm}$.

Tabela 5.3: Tempos de vida (τ) e contribuições das componentes (α) de fluorescência da NFT em pH 7,3 na ausência e na presença de ASB.

FS	[ASB](μM)	$\tau_1(\text{ns})$	α_1	$\tau_2(\text{ns})$	α_2
NFT	0	$0,03 \pm 0,01$	0,60	$1,6 \pm 0,1$	0,40
(pH7,3)	32	$0,30 \pm 0,01$	0,88	$3,8 \pm 0,1$	0,12
	105	$0,36 \pm 0,01$	0,83	$3,8 \pm 0,1$	0,17

5.1.4 - Acridina Laranja (AL)

Espectroscopia de absorção ótica

A Acridina Laranja é caracterizada por uma banda de absorção centrada em 489 nm na região espectral entre 400 e 700 nm. A adição de ASB em concentrações até 72 μM leva a uma fraca redução da absorção da AL (Fig. 5.14). Essa etapa inicial pode ser associada à agregação da AL nos sítios de ligação da ASB. Com um posterior aumento na concentração de albumina, a absorção da AL começa a aumentar e ocorre um pequeno deslocamento do máximo de absorção para 493 nm. Estas mudanças espectrais podem indicar a ligação dos monômeros da AL com a albumina.

Figura 5.14: Mudanças nos espectros de absorção da AL (9,6 μM) em função da concentração de ASB (de 6 μM a 733 μM).

Espectros de emissão de fluorescência

O espectro de emissão de fluorescência da AL é caracterizado por uma banda centrada em 530 nm. A adição de ASB induz ao aumento na intensidade de fluorescência da AL (Fig. 5.15), indicando sua ligação à albumina.

Figura 5.15 : Mudanças nos espectros de emissão de fluorescência da AL em função da concentração de ASB. $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$.

Tempo de vida de fluorescência

As medidas foram realizadas no microscópio onde usamos a excitação em $\lambda = 470 \text{ nm}$ e um filtro passa alta de 488 nm.

A AL apresenta decaimento mono-exponencial, com tempo $t_1 \approx 1,9 \text{ ns}$. Após adição de ASB o decaimento torna-se bi-exponencial, com tempo t_1 próximo àquele na ausência da ASB e $t_2 = 9,0 \text{ ns}$ (Fig. 5.16). A contribuição desse tempo aumenta com o aumento da concentração da ASB. Associamos o primeiro tempo aos monômeros livres da AL e o segundo àqueles ligados com ASB.

Figura 5.16: Perfil de decaimento de fluorescência da AL em função da concentração de ASB. $\lambda_{ex} = 470\text{nm}$; $\lambda_{em} = 488\text{nm}$.

Tabela 5.4: Contribuição das componentes α_1 e α_2 com tempos $t_1 = 1,8\text{ ns}$ e $t_2 = 3,6\text{ ns}$ no decaimento da fluorescência da AL na ausência e na presença de ASB.

[ASB] (μM)	0	6	11	32	72	144	282	482	733
α_1	1	0,93	0,73	0,78	0,69	0,66	0,56	0,61	0,51
α_2	0	0,07	0,27	0,22	0,31	0,34	0,44	0,39	0,49

5.2 - Parte 2

A seguir é apresentado o estudo da interação da ASB com os FS mantendo a concentração da albumina fixa em $8,5\text{ }\mu\text{M}$ e variando a concentração dos fotossensibilizadores na solução. Nesta etapa foram analisadas as características espectroscópicas e cinéticas da ASB em função da concentração dos FS.

5.2.1 – Espectroscopia de Absorção Ótica

A Figura 5.17 mostra o espectro de absorção ótica da ASB, cujo máximo está centrado em 280 nm . A adição dos FS na solução não

modifica a forma do espectro, apenas aumenta a sua intensidade. Entretanto, este aumento da absorbância pode ocorrer devido ao espalhamento pelo aumento da concentração do FS adicionado.

Resultados similares foram obtidos com todos os FS e dois exemplos dos efeitos desta interação nas características de absorção da ASB são apresentados na Figura 5.17.

Figura 5.17: Espectros de absorção da na presença de PpIX sintética (a) e NFT (b) em várias concentrações.

A única exceção foi observada na presença de AL, onde o máximo de absorção da ASB foi deslocado para à esquerda (Figura 5.18). Isto se deve à sobreposição da absorção da acridina laranja na região de absorção da albumina.

Figura 5.18: Mudanças no espectro de absorção da ASB em função da concentração de AL.

5.2.2 - Espectros de emissão de Fluorescência

Os espectros de emissão da albumina foram obtidos pela excitação do triptofano em 280 nm (SILVA, DA et al., 2014) e apresentam uma intensidade máxima de emissão em 350 nm.

A interação entre a ASB em uma concentração pré-fixada e os diversos FS estudados apresentaram resultados similares, sendo observada em todos os casos uma redução significativa da intensidade de emissão da ASB provocada pelo aumento da concentração dos FS, sem alteração na forma do espectro de emissão de fluorescência da ASB (Fig. 5.19 a 5.22).

Figura 5.19: Mudanças no espectro de fluorescência da ASB em função da concentração de PpIX endógena (a) e sintética (b).

Figura 5.20: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da ASB em função da concentração de BCD-180 (a) e BCD-90 (b).

Figura 5.21: Mudanças no espectro de emissão de fluorescência da ASB em função da concentração de NFT.

Figura: 5.22: Mudanças no espectro de emissão da fluorescência da ASB em função da concentração de AL.

5.2.3 – Constante de Supressão da fluorescência

Para analisar a supressão da fluorescência calculamos a constante de supressão de Stern-Volmer de acordo com a equação (34). Na execução do gráfico de $\frac{I_0}{I} - 1$ em função da concentração do supressor foi utilizado o programa Origin 8.5. A Figura 5.23 mostra como exemplo a obtenção da constante de supressão para a PpIX sintética. As constantes de supressão para todos os compostos estão listadas na Tabela 5.4.

Figura 5.23: Determinação da constante de supressão de Stern-Volmer da fluorescência da ASB pela PpIX sintética.

Tabela 5.5: Constantes de supressão Stern-Volmer da fluorescência da ASB na presença dos diversos FS.

FS	Constante de supressão (K_{SV})
PpIX endógena	$(2,19 \pm 0,05) \times 10^4$
PpIX sintética	$(2,97 \pm 0,06) \times 10^3$
BCD-180	$(7,2 \pm 0,1) \times 10^4$
BCD-90	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^4$
NFT	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^3$
AL	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$

Quando comparamos todos os FS notamos que a constante de supressão K_{SV} segue a seguinte ordem: AL > BCD-180 > PpIX endógena > BCD-90 > NFT > PpIX sintética.

É importante notar que, independentemente da PpIX endógena não apresentar mudanças das suas características na presença de ASB, a supressão por ela da fluorescência da ASB mostra a existência de interação entre elas. Mais do que isso, comparando os valores das constantes confirmamos que na amostra com PpIX endógena a supressão é maior do que com a PpIX sintética, mostrando que a PpIX endógena possui maior afinidade com ASB.

5.2.4 - Tempos de vida da fluorescência

A ASB apresenta um perfil de decaimento bi-exponencial, com tempos de vida $t_1 = 5,9 \pm 0,2$ ns e $t_2 = 1,8 \pm 0,2$ ns, associados à presença de dois triptofanos na estrutura da molécula de ASB. Com exceção da PpIX endógena a adição dos FS não muda o perfil das curvas de decaimento da fluorescência da ASB. Como exemplos, são apresentados os perfis de decaimento da fluorescência da ASB na presença de BCD-180 e AL (Fig. 5.24 e 5.25, respectivamente).

Figura 5.24: Perfil de decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração de BCD-180. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$.

Figura 5.25: Perfil de decaimento de fluorescência da ASB em função da concentração de AL. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$.

Baseando-se nesse fato podemos concluir que a supressão da fluorescência da ASB por esses FS acontece pelo mecanismo estático e que as constantes K_{SV} obtidas são as constantes de ligação dos FS com a ASB.

O fato do perfil da curva de decaimento da fluorescência não mudar na presença desses FS, mostra que a acessibilidade de ambos os triptofanos aos FS é a mesma.

Diferente de outros FS, PpIX endógena muda o perfil de decaimento da ASB (Fig. 5.26).

Figura 5.26: Perfil de decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração de PpIX endógena. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$.

Entretanto, as mudanças nos tempos de vida das componentes não são significativas ($t_1 = 5,6 \pm 0,2 \text{ ns}$ e $t_2 = 1,5 \pm 0,2 \text{ ns}$, respectivamente). As mudanças do perfil das curvas estão associadas à mudança da contribuição das componentes em favor da componente com tempo mais curto (Tabela 5.5).

Tabela 5.6: Contribuição das componentes α_1 e α_2 com tempos $t_1 = 5,6 \text{ ns}$ e $t_2 = 1,5 \text{ ns}$ no decaimento da fluorescência da ASB em função da concentração da PpIX endógena

[PpIX] (μM)	0,8	1,6	4,9	8,1	14,2	20,2	25,9
α_1	0,99	0,98	0,95	0,91	0,82	0,74	0,66
α_2	0,01	0,02	0,05	0,09	0,18	0,26	0,34

Isso significa que no caso da PpIX endógena o mecanismo de supressão também é estático. Entretanto, diferente de outros FS a PpIX endógena se liga com a molécula de ASB no local onde o triptofano possui o tempo de vida mais longo e mais acessível do que o outro triptofano presente na molécula de ASB.

5.2.5 –Efeitos da estrutura dos FS no processo da sua ligação com a ASB

Como já foi anotado, as constantes de ligação dos FS com ASB estão na sequência $AL > BCD-180 > PpIX \text{ endógena} > BCD-90 > NFT > PpIX \text{ sintética}$. Excluindo dessa sequência a PpIX endógena podemos concluir que:

1. AL, BCD-180, BCD-90 e NFT, carregados positivamente, possuem as constantes de ligação maiores comparadas com a PpIX sintética, que é neutra.
2. AL, BCD-180 e BCD-90, que têm na sua estrutura o sistema de conjugação π desenvolvido, possuem as constantes de ligação maiores do que a NFT, onde esse sistema é menor.
3. A molécula de AL tem tamanho menor que as moléculas de BCD-180 e BCD-90 e possui a constante de ligação maior que as deles.
4. O BCD-180, que tem a mesma carga e o mesmo sistema de conjugação π que o BCD-90, mas tem um ângulo de 180° entre os cromóforos (estrutura linear), possui a constante de ligação maior que do BCD-90, que tem ângulo entre os cromóforos de 90° .

Em relação à PpIX sintética e endógena podemos concluir o seguinte: as moléculas de PpIX sintética e endógena deveriam ter a estrutura igual. Entretanto, a diferença de comportamento entre elas está na interação com a ASB: a ausência do efeito da interação com ASB nas características espectrais e cinéticas da PpIX endógena e sua maior constante de ligação com ASB, mostra uma diferença entre esses FS. Supomos que essa diferença esteja associada ao processo de extração da

PpIX endógena das glândulas Harderianas. Provavelmente após a extração a molécula da porfirina endógena continua ligada com algumas estruturas anfifílicas, que bloqueiam seu contato com o ambiente. Isso diminui o efeito do ambiente nas características da porfirina. Por outro lado, essas estruturas possuem alta afinidade por sítios de ligação da ASB, o que aumenta a constante da ligação da PpIX endógena se comparada com a da sintética.

Para confirmar essa hipótese realizamos experimentos utilizando a técnica de espectroscopia de massa.

5.2.6 – Espectrometria de massas da PpIX sintética e endógena

Como mencionado anteriormente, o peso molecular da PpIX sintética é ~ 563 Da. A Figura 5.27a apresenta o espectro de massa para a amostra padrão, que no caso é a PpIX sintética, onde pode-se ver que o pico principal tem o valor do peso molecular do corante. Na Figura 5.27b está o espectro da PpIX endógena que mostra um pico em 563,2 Da e outro em 695,2 Da que não aparecia na amostra padrão.

O conjunto de picos que aparece com intensidade alta estava representado no espectro da amostra padrão só que em intensidade bem menor. A diferença entre os valores do pico da PpIX e o pico da estrutura que surgiu no espectro é de ~ 132 Da, e representa o valor do peso molecular dessa estrutura desconhecida. A Figura 5.27c apresenta de forma mais clara esta região de interesse.

Figura 5.27: Espectros de massas para PpIX sintética (a) e PpIX endógena (b). Espectro de massa para a PpIX com destaque para a região de interesse (c).

Baseando-se nesses resultados podemos concluir que a PpIX endógena realmente existe na forma de um complexo com alguma estrutura de peso molecular aproximado de 132 Da. Porém, para definir a natureza dessa estrutura é necessário um estudo mais detalhado.

5.3 - Parte 3: Imagens do tempo de vida da fluorescência - FLIM

Para confirmar a interação entre os FS e a ASB usamos a técnica FLIM que se baseia na formação das imagens da distribuição dos pontos fluorescentes dos FS na presença da ASB na amostra, relacionadas com o tempo de vida da fluorescência.

As imagens mostram como se distribuem esses pontos com diferentes tempos de vida da fluorescência numa escala de cor, sendo azul utilizado para definir os tempos de vida mais curtos e vermelho os mais longos.

Outro parâmetro a ser destacado é a potência de excitação. Quando comparamos a imagem de duas amostras, se uma delas está mais clara não quer dizer necessariamente que essa amostra possui intensidade de fluorescência maior; isso só será verdadeiro se as duas amostras forem irradiadas com a mesma potência da luz de excitação.

Nas imagens encontramos algumas estruturas mais claras ou mais escuras. É possível estimar o tamanho dessas estruturas, que também podemos chamar de agregados, através do software *SymPhoTime* que processa as imagens de FLIM. Este software faz um corte na imagem mostrando o perfil de intensidade da fluorescência, demarcando a estrutura a ser analisada. Desta forma consegue-se obter o seu perfil através de um ajuste pela equação de Gauss:

$$y = y_0 + \frac{A}{w \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^2} \quad (37)$$

ou Lorentz

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x-x_0)^2 w^2} \quad (38)$$

onde w é largura a meia altura. Esse parâmetro é considerado o valor aproximado para o tamanho da estrutura que aparece na imagem.

Quando o software não consegue fazer uma boa aproximação, utiliza-se apenas os perfis que ele mede e os pontos são ajustados pelo programa Origin 8.5, utilizando as equações (37) ou (38), Figura 5.28.

Figura 5.28: Exemplo dos perfis dos pontos claros (a) e escuros (b) obtidos no programa Origin 8.5.

Em casos onde o ajuste não possa ser obtido, pode-se medir manualmente a largura a meia altura e estimar o tamanho da estrutura de interesse.

5.3.1 – PpIX

Uma gota (20 μl) da solução de PpIX com concentração de 157 μM foi colocada sobre a objetiva do microscópio confocal e excitada em 375 nm. O laser varre a amostra e os fótons emitidos após passarem por um filtro passa alta de 405 nm foram contados pelo detector. A PpIX endógena apresenta algumas estruturas fluorescentes mesmo sem adição de ASB (Fig. 5.29).

Figura 5.29: Imagem da PpIX endógena obtida pela análise do seu tempo de vida de fluorescência. Dimensões da imagem 80x80 μm (a) e 40x40 μm (b). Potência de excitação de 2059,6 au.

A seguir é apresentada a imagem obtida após a adição de 150 μM de ASB na solução de PpIX endógena (Fig. 5.30).

Figura 5.30: Imagens com dimensões de 80x80 μm (a) e 40x40 μm (b) da PpIX endógena na presença de ASB. Potência de excitação de 668,4 au.

De forma similar foram obtidos os tamanhos das estruturas observadas na solução contendo a PpIX sintética, 162 μM, na ausência (Fig. 5.31a) e na presença de ASB, 153 μM (Fig. 5.31b).

Figura 5.31: Imagens com dimensões de 40x40 µm com indicação das estruturas encontradas na solução de PpIX sintética na ausência (a), potência de excitação de 668,4 au e na presença de ASB (b), potência de excitação de 624,7 au)

Os tamanhos das estruturas presentes nas amostras são apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.7: Tamanho estimado dos agregados da PpIX endógena e sintética na ausência e na presença de ASB.

AGREGADO	w (μm)			
	[ASB] = 0		[ASB] = 153 μM	
	endógena	sintética	endógena	sintética
1	0,81 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,28 ± 0,05	~ 0,53*
2	0,74 ± 0,11		0,28 ± 0,03	0,64 ± 0,05
3	0,82 ± 0,03		0,32 ± 0,02	0,68 ± 0,04
4	0,76 ± 0,12			0,76 ± 0,04
5	0,71 ± 0,11			
6	0,86 ± 0,31			
7	0,77 ± 0,10			
8	0,63 ± 0,21			
9	1,30 ± 0,23			
10	0,88 ± 0,16			
11	0,81 ± 0,18			

*medido manualmente

O tamanho das partículas fluorescentes é definido pelo tamanho da própria molécula junto com as camadas de solvatação. A análise dos dados obtidos mostra que o tamanho das partículas da PpIX endógena é maior que da sintética. Este resultado está em acordo com a hipótese de que a porfirina endógena existe na forma de um complexo com algumas espécies anfifílicas que devido a sua afinidade com a água formam as camadas de solvatação maiores do que PpIX sintética. O aumento de tamanho da PpIX sintética na presença de ASB está, provavelmente, associado à sua ligação com ASB. Por outro lado continua claro a diminuição do tamanho das partículas de PpIX endógena por sua ligação com ASB. Esse efeito necessita de um estudo mais detalhado.

Os resultados obtidos com os outros FS podem ser considerados somente como preliminares. Esses FS necessitam ser estudados mais detalhadamente. Entretanto, decidimos mostrá-los para dar uma visão mais ampla de uso da técnica FLIM nesse estudo.

5.3.2 - BCD-180

Para a amostra de BCD-180 com concentração de 2,9 μM foi obtida uma imagem que apresenta uma distribuição homogênea do corante na solução (Figura 5.32).

Figura 5.32: Imagem com dimensões de $80 \times 80 \mu\text{m}$ do BCD-180 na ausência de ASB. Potência de excitação de 398,3 au.

Com a adição de ASB 2,3 μM é perceptível um forte aumento da intensidade da fluorescência do BCD-180 (Figura 5.33). Essa amostra também é homogênea, não apresentando a formação de agregados.

Figura 5.33: Imagem com dimensões de 80x80 μm do BCD-180 na presença de ASB. Potência de excitação de 398,3 au.

5.3.3 - BCD-90

Para o BCD-90, numa concentração de 2,7 μM , foi observada a presença de diversas estruturas do corante. (Fig. 5.34).

Figura 5.34: Imagem dos agregados presentes na solução de BCD-90. Dimensão da imagem: 40x40 μm . Potência de excitação de 398,3 au.

Estes agregados apareceram em duplas e a distância entre eles é praticamente a mesma para cada par, conforme mostrado na Tabela 5.7.

Ao adicionar 2,4 μM de ASB na amostra, com a mesma concentração de BCD-90, a imagem ficou muito clara e foi preciso modificar a escala de intensidade (Fig. 5.35). Uma vez que as potências utilizadas para excitar as amostras foram diferentes não podemos afirmar apenas pelas imagens que a intensidade da fluorescência aumentou com adição da ASB.

Figura 5.35: Imagem com dimensões de 80x80 μm do BCD-90 na presença de ASB. Potência de excitação de 407,4 au.

A imagem da amostra com albumina ficou bem nítida, portanto não foi necessário aumentar uma área específica para fazer o cálculo do tamanho do agregado. Os agregados 1 e 2 apresentam dois máximos de fluorescência, o que indica que são 2 agregados sobrepostos na imagem.

De acordo com a Tabela 5.7 pode-se observar que o tamanho dos agregados aumenta na presença de albumina.

Tabela 5.8: Tamanho estimado dos agregados do BCD-90 na presença e na ausência de ASB.

Agregado	w_1 (μm) [ASB] = 0	w_2 (μm) [ASB] = 0	Distância entre os agregados (μm)	w (μm) [ASB] = 2,4 μM
1	$0,45 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,12$	2,67	$2,95 \pm 0,26$ e $0,37 \pm 0,27$
2	$0,48 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,03$	2,57	$2,98 \pm 0,43$ e $0,99 \pm 0,13$
3	$0,60 \pm 0,11$	$0,83 \pm 0,03$	2,57	--
4	$0,36 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$	2,58	
5	$0,59 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,05$	2,58	
6	$\sim 0,59$ *	$\sim 0,68$ *	2,68	
7	$0,27 \pm 0,14$	$0,78 \pm 0,25$	2,72	
8	$0,36 \pm 0,08$	$0,42 \pm 0,12$	2,66	
9	$0,49 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,09$	2,58	
10-a	$0,43 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,08$	2,57	
10-b	$0,58 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,19$	2,27	
11	$0,62 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,04$	2,57	

*medido manualmente

5.3.4 - Nitrofurantoína

Imagens obtidas com a NFT numa concentração de 17 μM mostram a presença de algumas estruturas na solução e áreas com reduzida intensidade de fluorescência (Fig. 5.36).

A adição de 17,3 μM de ASB aumenta a intensidade de emissão da NFT (Fig. 5.37) e ainda verifica-se a presença de agregados na solução, cujo tamanho estimado é apresentado na Tabela 5.8.

Figura 5.36: Imagem com dimensões de 40x40 μm da solução de NFT na ausência de ASB. Potência de excitação de 1644,5 au.

Figura 5.37: Imagem com dimensões de 40x40 μm da solução de NFT na presença de ASB. Potência de excitação de 1759,4 au.

Tabela 5.9: Tamanho estimado dos agregados da NFT na ausência e na presença de ASB.

Agregado	w(μm)	w(μm)
	[ASB] = 0	[ASB] = 17,3 μM
1	0,56 $\pm$ 0,25	1,27 $\pm$ 0,22
2		0,67 $\pm$ 0,47

5.3.5 - Acridina laranja

A imagem da amostra de AL numa concentração de 8 μM é apresentada na Figura 5.38, onde pode ser observada a presença de algumas estruturas fluorescentes.

Figura 5.38: Imagem com dimensões de 40x40 μm com indicação das estruturas encontradas na solução de AL. Potência de excitação de 7,4 au.

A adição de 5,5 μM de ASB na solução não induz a modificações na imagem da AL, que continua a apresentar poucos agregados (Fig. 5.39).

Figura 5.39: Imagem com dimensões de 40x40 μm da AL na presença de ASB. Potência de excitação de 7,8 au.

Para poder visualizar os agregados foi preciso variar a escala de intensidade de fluorescência. Pelo ajuste do perfil medido, calculamos que agregado tem dimensão aproximada de $1,26 \pm 0,12 \mu\text{m}$. Comparando o tamanho dos agregados das duas amostras verifica-se que a que contém albumina possui agregados maiores.

Tabela 5.10: Tamanho estimado dos agregados encontrados na imagem da AL na ausência e na presença de ASB.

Agregado	w (μm)	w (μm)
	[ASB] = 0	[ASB] = 5,5 μM
1	$0,35 \pm 0,05$ e	$1,26 \pm 0,12$
	$0,82 \pm 0,03$	
2	$0,43 \pm 0,03$ e	
	$0,22 \pm 0,14$	

Analisando os dados obtidos podemos concluir que, com exceção das amostras de PpIX endógena, para todos os outros FS onde foi possível medir os agregados, verificou-se que o tamanho encontrado para as

estruturas presentes na solução após a adição de ASB foi maior quando comparado à solução dos FS na ausência da albumina. Isto ocorre devido à formação de uma grande camada de solvatação ao redor da albumina, que possui vários tipos de ligação com as moléculas de água. Esta interação entre ASB e água pode ser modulada por interações dipolo-dipolo e ligações tipo ponte de hidrogênio entre grupos de peptídeos da molécula de ASB e as moléculas de água. Os dipolos das moléculas de água se ligam a grupos iônicos e polares da ASB e ainda podem ligar entre si formando várias camadas de água ao redor da proteína.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. A ligação com ASB induz o deslocamento batocrômico dos espectros de absorção e de fluorescência e aumenta a intensidade da fluorescência dos fotossensibilizadores.

2. A sequência obtida $AL > BCD-180 > BCD-90 > NFT > PpIX$ sintética das constantes de ligação dos FS com ASB mostra que:

a. A carga positiva e um sistema de conjugação π desenvolvido na estrutura da molécula do fotossensibilizador aumentam a probabilidade de sua ligação com ASB.

b. A estrutura linear da molécula do fotossensibilizador favorece sua ligação com ASB.

c. Para as moléculas com as mesmas características físico-químicas aquela com menor tamanho possui maior probabilidade de ligação com a ASB.

3. Os resultados obtidos para PpIX sintética e endógena mostram que a PpIX endógena possui afinidade maior com ASB, que se reflete em uma maior constante de ligação com a ASB. Entretanto, diferente da PpIX endógena, cujas características fotofísicas não sofrem mudanças na interação com ASB, as características da PpIX sintética mudam dramaticamente após sua ligação com ASB. Isso acontece, pois diferente da PpIX sintética, a endógena existe na forma de um complexo com algumas estruturas anfifílicas, que continuam ligadas à molécula de PpIX após sua extração da glândula. Essas estruturas por um lado aumentam afinidade da PpIX com ASB e, por outro, diminuem o contato da PpIX endógena com o ambiente, diminuindo o efeito dele nas suas características fotofísicas, enquanto que para a PpIX sintética o efeito do ambiente (ligação com ASB) é muito mais pronunciado. Esta conclusão está em acordo com os dados de espectrometria de massas, que mostram a diferença de pesos moleculares entre a PpIX endógena e sintética.

7. Referências Bibliográficas

- AMADO, A. M.; RAMOS, A. P.; SILVA, E. R.; BORISSEVITCH, I. E. Quenching of acridine orange fluorescence by salts in aqueous solutions: Effects of aggregation and charge transfer. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 288–294, 2016.
- ARYA, S. C.; AGARWAL, N.; AGARWAL, S. Nitrofurantoin: an effective and ignored antimicrobial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 354–356, 2006.
- BARBÃO, G. A. A.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B. DE. Criação de uma biblioteca de espectro de ESI-MS/MS para acelerar o processo de identificação de classes químicas de produtos naturais. **22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP**, p. 4, 2014. Ribeirão Preto.
- BONNETT, R.; DJELAL, B. D.; NGUYEN, A. Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN (R)) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. **J Porphyrins Phthalocyanines**, v. 5, n. 8, p. 652–661, 2001.
- BORISSEVITCH, IOURI E. GONÇALVES, PABLO J. SCHABERLE, F. A. **Fundamentos da Espectroscopia de Absorção Ótica**. 1ª ed. Editora Livraria da Física, 2016.
- BORISSEVITCH, I. E.; FERREIRA, L. P. **A Luz na Medicina Moderna. Fotoquimioterapia**. 1ª ed. Editora Livraria da Física, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (RIO DE JANEIRO). INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oqueue>>. Acesso em: 15/2/2017.
- BURMICZ, J. S.; SMYTH, W. F.; PALMER, R. F. An ultraviolet spectral and polarographic study of nitrofurantoin, a urinary-tract antibiotic. **The Analyst**, v. 110, n. 1209, p. 986–991, 1976.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, n. C, p. 153–203, 1994.
- CHASTEEN, T. G. Jablonski Diagram. Disponível em: <http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap_I/jablonsk.htm>. Acesso em: 11/1/2017.

- CHATTERJEE, S.; KUMAR, G. S. Binding of fluorescent acridine dyes acridine orange and 9-aminoacridine to hemoglobin: Elucidation of their molecular recognition by spectroscopy, calorimetry and molecular modeling techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 169–178, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416301142>>. .
- CHEN, Q.; KE, H.; DAI, Z.; LIU, Z. Nanoscale theranostics for physical stimulus-responsive cancer therapies. **Biomaterials**, v. 73, p. 214–230, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215007632>>. .
- CIMA, M. J.; LEE, H.; DANIEL, K.; et al. Single compartment drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 157–171, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591400282X>>. .
- DELAEY, E.; LAAR, F. VAN; VOS, D. DE; et al. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 55, n. 1, p. 27–36, 2000.
- DUARTE I, BUENSE R, K. C. Phototherapy. **Anais Brasileiros de Dermatologi**, v. 81, n. 1, p. 74–82, 2006.
- EMERSON, T. E. Unique Features of Albumin - a Brief Review. **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 7, p. 690–694., 1989.
- FERREIRA, E. S. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**, 2009. Universidade de São Paulo - USP.
- FERREIRA, L. P.; PARRA, G. G.; CODOGNATO, D. C. K.; AMADO, A. M.; SANTANA DA SILVA, R. Light induced cytotoxicity of nitrofurantoin toward murine melanoma. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. In press, 2017.
- GELAMO, E. L.; SILVA, C. H. T. P.; IMASATO, H.; TABAK, M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1594, n. 1, p. 84–99, 2002.

GOLDBERG, R. J. A Theory of Antibody—Antigen Reactions. I. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody 2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 22, p. 5715–5725, 1952. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01142a045>>. .

GUAY, D. R. P. Cefdinir: An advanced-generation, broad-spectrum oral cephalosporin. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 473–489, 2002.

Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291802851256>>. .

Handbook: PML-16C and PML-16 GaAsP 16-Channel TCSPC / FLIM Detectors; PML-SPEC and MW FLIM Multi-Wavelength Detectors.

Becker & Hickl GmbH, 2016.

HIRAYAMA, K. Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 2, p. 639–646., 1990.

HOF, M.; HUTTERER, R.; FIDLER, V. **Fluorescence Spectroscopy in Biology Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and Cells**. 1ª ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

HONIGSMANN, H. Mechanisms of phototherapy and photochemotherapy for photodermatoses. **Dermatologic Therapy**, v. 16, n. 1, p. 23–27, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1529-8019.2003.01604.x>>. .

HUTTNER, A.; VERHAEGH, E. M.; HARBARTH, S.; et al. Nitrofurantoin revisited: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2456–2464, 2015.

ITO, A. S.; BERARDI, M.; PAZIN, W. M. **Fluorescência e Aplicações em Biofísica**. 1ª ed. Editora Livraria da Física, 2016.

KASHANIAN, J.; HAKIMIAN, P.; BLUTE, M.; et al. Nitrofurantoin: the return of an old friend in the wake of growing resistance. **BJU**

- International**, v. 102, n. 11, p. 1634–1637, 2008. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2008.07809.x>>. .
- KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. New uses of older antibiotics. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 1, p. 125–132, 2001.
- KOSOWER, N. S.; KATAYOSE, H.; YANAGIMACHI, R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. **Journal of andrology**, v. 13, n. 4, p. 342–8, 1992. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399837>>. .
- KOSTYUKOVA, A. A.; NEKIPELOVA, T. D.; RADCHENKOA, A. S.; et al. Triplet States of the Complexes of Biscarbocyanine Dye with Albumin. **High Energy Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 148–150, 2017.
- KUBOTA, Y.; STEINER, R. F. Fluorescence decay and quantum yield characteristics of acridine orange and proflavine bound to DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 279–289, 1977.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3^a ed. Boston, MA: Springer US, 2006.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009. Disponível em:
<www.scientiachromatographica.com>. .
- LEE, H.-S.; LEE, J.-B.; YUN, S. J.; et al. Spectrofluorometric Determination of Protoporphyrin IX in Cells Using Acridine as Internal Standard. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 27, n. 7, p. 1067–1070, 2007.
- LIM, C. K.; RAZZAQUE, M. A.; LUO, J.; FARMER, P. B. Isolation and characterization of protoporphyrin glycoconjugates from rat Harderian gland by HPLC, capillary electrophoresis and HPLC/electrospray ionization MS. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 757–761, 2000.
- LOZOVAYA, G. I.; MASINOVSKY, Z.; SIVASH, A. A. Protoporphyrin ix as a possible ancient photosensitizer: Spectral and photochemical studies. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 20, n. 3–4, p. 321–330, 1990.
- MUKHERJEE, S. K.; GAUTAM, S.; BISWAS, S.; KUNDU, J.; CHOWDHURY,

- P. K. Do Macromolecular Crowding Agents Exert Only an Excluded Volume Effect? A Protein Solvation Study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 44, p. 14145–14156, 2015.
- MURAKAMI, L. S.; FERREIRA, L. P.; SANTOS, J. S.; et al. Photocytotoxicity of a cyanine dye with two chromophores toward melanoma and normal cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 6, p. 1150–1157, 2015.
- NAVEENRAJ, S.; ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, 2013.
- PARRA, G. G. **Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua fototransformação**, 5. Nov. 2010. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo - USP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-01022011-113526/>>. .
- PARRA, G. G.; FERREIRA, L. P.; CODOGNATO, D. C. K.; CAVALHEIRO, C. S.; BORISSEVITCH, I. Characteristics of the excited states of Nitrofurantoin, an anti-inflammatory and photoactive nitrofuran derivative. **Journal of Luminescence**, v. 185, p. 10–16, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231316312662>>. .
- PENA, F. S. **Estudos comparativos do processo de fototransformação da Protoporfirina IX sintética e endógena em soluções homogêneas e na presença de estruturas biomiméticas naturais e sintéticas**, 2013. Universidade de São Paulo, USP.
- PETERS, T. Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**. v. 37, p.161–245, 1985. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323308600650>>. .
- REIS, E. D.; NICOLA, ESTER MARIA DANIELLI NICOLA, J. H. Harderian gland of Wistar rats revised as a protoporphyrin IX producer. **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 43–51, 2005.
- REIS, E. R.; METZE, K.; NICOLA, E. M. D.; NICOLA, J. H.; BORISSEVITCH,

- I. E. Photodynamic activity of protoporphyrin IX in Harderian glands of Wistar rats: Monitoring by gland fluorescence. **Journal of Luminescence**, v. 137, p. 32–36, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022231312006941>>. .
- SCHABERLE, F. A. **Efeitos do Meio e da Interação com DNA e Micelas nas Características Espectrais dos Corantes Ciânicos com Dois Cromóforos**, 2007. Universidade de São Paulo - USP.
- SCHABERLE, F. A.; KUZ'MIN, V. A.; BORISSEVITCH, I. E. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1621, n. 2, p. 183–191, 2003.
- SCHVEITZER; BIANCA. **Interação da Albumina do Soro Bovino (BSA) com sais biliares induzidas por Surfactantes Aniônicos**, 2006. Universidade Federal de Santa Catarina.
- SILVA, D. L.; BONI, L. DE; CORREA, D. S.; et al. Two-photon absorption in oxazole derivatives: An experimental and quantum chemical study. **Optical Materials**, v. 34, n. 7, p. 1013–1018, 2012.
- SILVA, É. R. **Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível**, 2010. Universidade de São Paulo - USP.
- SILVA, L. H. F. **Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga**, 2015. Universidade de São Paulo - USP.
- SILVA, R. E. DA; TOLEDO, K. C. F.; JORGE, H. B.; et al. Interação de complexo de rutênio com albumina de soro bovino para detecção amperométrica de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1633–1638, 2014.
- STEHLÉ, G.; WUNDER, A.; SCHRENK, HANS HERRMANN HARTUNG, G.; HEENE, D. L.; SINN, H. Albumin-based drug carriers: comparison between serum albumins of different species on pharmacokinetics and tumor uptake of the conjugate. **Anticancer Drugs**, 1999.

STEINHARDT, J.; KRIJN, J.; LEIDY, J. G. Differences between bovine and human serum albumins: binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. **Biochemistry**, 1971.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151–4202, 1998. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402098000155>>. .

WUNDER, A.; MÜLLER-LADNER, U.; STELZER, E. H. K.; et al. Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 9, p. 4793–801, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707361>>. .