

CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA ZnPP CONJUGADA COM CISTEAMINA

Diogo Monteiro Leite dos Santos, Maria Julia Galera Ribeiro, Vitor Luca Moura Marmo, Julia Genezini Lacerda, Leandro Raniero.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Nanossensores, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, diogo.monteiro.santos@gmail.com, majugalera@gmail.com, vitor.marmo@gmail.com, genzinijulia@gmail.com, lraniero@univap.br.

Resumo

A protoporfirina IX de zinco (II) (ZnPP) é um fotossensibilizador (FS) empregado na terapia fotodinâmica, devido à geração de espécies reativas de oxigênio que induzem morte celular. Entretanto, sua baixa solubilidade em meio aquoso limita a funcionalização com nanopartículas. Este trabalho teve como objetivo a caracterização óptica e conjugação da ZnPP em diferentes solventes com a cisteamina, através da reação de carbodiimida (Sulfo-EDC), alterando a solubilidade do composto formado. Foram realizadas análises de absorção UV-visível e fluorescência para caracterização óptica. Os resultados revelaram bandas de absorção entre 400–420 nm, típicas da ZnPP, e redução da intensidade de fluorescência da ZnPP modificada (linker de zinco). A lei de Lambert-Beer foi aplicada para determinação da absorvidade molar, obtendo-se $4,52 \times 10^4$, $5,47 \times 10^4$ e $3,02 \times 10^4$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ para Metanol/NaOH (50:50), DMSO e DMSO/NaOH (50:50), respectivamente. Entre os solventes, a solução com DMSO apresentou maior taxa de conversão (39%), evidenciando potencial promissor para aplicações em nanopartículas.

Palavras-chave: Nanotecnologia, protoporfirina de zinco (ZnPP), fluorescência, nanopartículas, carbodiimida.

Área do Conhecimento: ciências exatas e da terra, química

Introdução

A protoporfirina IX de zinco (II) (ZnPP) detém propriedades fotofísicas de absorção e emissão no espectro visível. A transferência desta energia permite a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo a apoptose, ou necrose em células de linhagens de tumores malignos, sendo uma excelente opção para funcionalização com nanomateriais para aplicações biomédicas [1-2].

Entretanto, a ZnPP possui baixa solubilidade em água. Essa propriedade é derivada de sua estrutura de macrocíclica tetrapirrólica, composta por um íon de Zn²⁺ central coordenados a quatro anéis pirrólicos e grupos carboxílicos em sua extremidade [3]. Para a conjugação da ZnPP em nanopartículas metálicas é necessário realizar a modificação estrutural dos grupos carboxílicos em suas extremidades, de modo a garantir a afinidade química com as nanopartículas metálicas como, as de ouro e prata [4-5].

O desenvolvimento e aprimoramento de metodologias para a síntese e biofuncionalização de nanopartículas têm sido foco de diversos campos de pesquisa, devido à sua ampla aplicabilidade [3]. As nanopartículas metálicas constituem nanocarreadores amplamente empregados em processos de funcionalização, devido à sua elevada afinidade por ligantes sulfurados, favorecendo a formação de ligações covalentes estáveis com fotossensibilizadores previamente modificados [6]. Nesse contexto, moléculas com extremidades tiol (-SH), como a cisteamina, podem ser ancoradas à ZnPP.

Este trabalho tem como objetivo promover a modificação estrutural da ZnPP via ativação por carbodiimida (Sulfo-EDC), para a formação de linker de zinco tiolados (-SH) oriundos da cisteamina. O estudo considera a diluição e comportamento físico-químico do fotossensibilizador (FS), em diferentes solventes (metanol/NaOH, DMSO e DMSO/NaOH na proporção 50:50), empregando técnicas de espectroscopia UV-Visível e fluorescência, além da determinação da absorvidade molar pela lei de Lambert-Beer, desmitificando e fornecendo compreensão sobre o comportamento óptico do FS e o potencial de funcionalização com nanomateriais.

Metodologia

Para a reação de acoplamento amida (EDC/sulfo-NHS), utilizaram-se soluções de ZnPP diluídas em metanol/NaOH, DMSO e DMSO/NaOH na proporção de 50:50, na concentração de $1,59 \text{ mmol.L}^{-1}$. Foram adicionados sulfo-NHS e EDC ambos a 10 mmol.L^{-1} para ativação dos grupos carboxílicos seguida de agitação orbital a 200 rpm por 2 horas. A cisteamina foi adicionada sob agitação contínua, visando a formação do linker de ZnPP, o qual apresenta grupos funcionais tiolados (-SH), capazes de atuar como nanocarreadores e, assim, viabilizar a posterior conjugação com as nanopartículas.

O composto teve sua purificação realizada por centrifugação a 15.000 rpm durante 2 minutos, havendo separação do sobrenadante (metanol/NaOH, DMSO e DMSO/NaOH) e precipitado contendo o linker de ZnPP.

As caracterizações na região do UV-visível foram realizadas na região espectral de 230-740 com resolução espectral de 1 nm, por meio do espectrofotômetro da marca Denovix, modelo DS 11. As medidas de fluorescência no equipamento VANTASTAR, da marca BMG Labtech.

Para entender o comportamento fotofísico da ZnPP em diferentes solventes, utilizou-se a Lei de Lambert-Beer expressa pela equação 1, onde Abs representa a Absorbância; “c” concentração (mol.L^{-1}), “b” o caminho óptico (cm), e “ ϵ ” a absorvidade molar ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

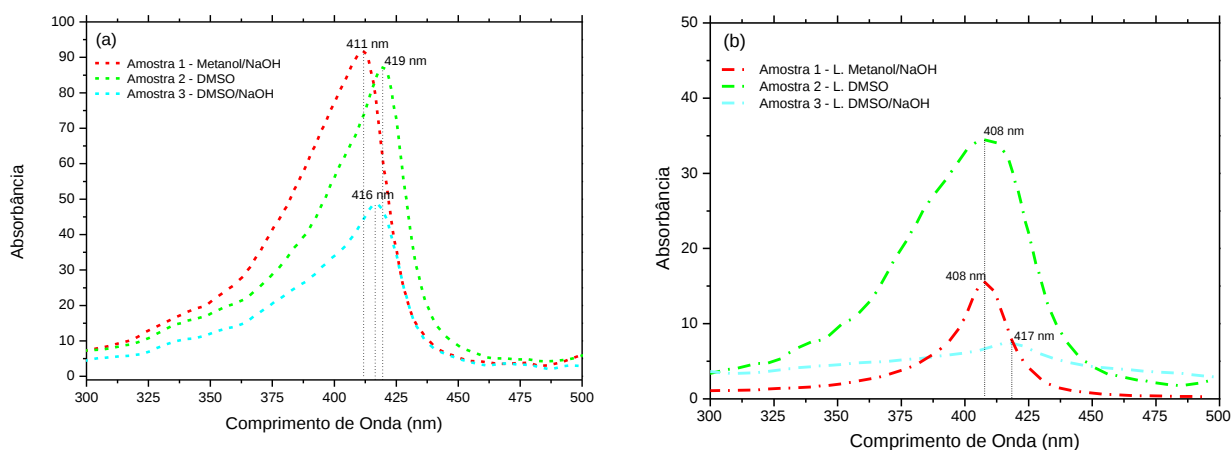
Equação 1 – Lei de Lambert-Beer

$$Abs = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Resultados

Os resultados das análises de espectroscopia UV-visível para cada amostra, antes e após a reação de acoplamento amida (EDC/sulfo-NHS) com cisteamina, estão dispostos na figura 1 na concentração de $1,59 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Figura 1 - Análises de UV-Vis da ZnPP (a) antes do acoplamento amida (-COOH), (b) após reação.



Fonte: o autor.

Os resultados obtidos nas análises de UV-visível foram dispostos na tabela 1 que correlaciona as informações de absorbância por solvente.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Tabela 1 – Absortividade molar por amostra.

Amostra	Figura 1a		Figura 1b	
	Abs	Comprimento de onda (nm)	Abs	Comprimento de onda (nm)
Metanol/NaOH	72	391	13	395
DMSO	87	416	34	408
DMSO/NaOH	48	419	8	417

Fonte: O autor.

Utilizou-se a equação 1 para se determinar os valores de absortividade molar para cada amostra, sendo de $4,52 \times 10^4$, $5,47 \times 10^4$ e $3,02 \times 10^4$ $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, para metanol/NaOH, DMSO e DMSO/NaOH respectivamente. Os valores estão de acordo com os referenciados em trabalhos com ZnPP [7].

A partir da absortividade molar das soluções é possível calcular o valor da concentração após a reação de modificação, por meio da lei de Lambert-Beer, e estimar uma taxa de rendimento para cada solvente. Os valores de concentração após a modificação estão listados na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração e taxa de conversão de ZnPP após reação de modificação.

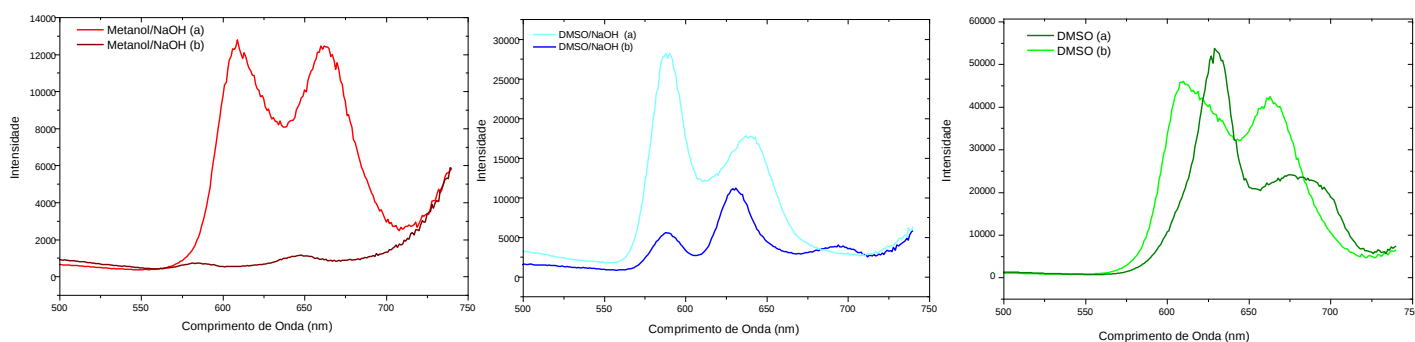
Amostra	Abs	Absortividade molar $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Concentração mol.L^{-1}
Metanol/NaOH	13	$4,52 \times 10^4$	$2,88 \times 10^{-4}$
DMSO	34	$5,47 \times 10^4$	$6,22 \times 10^{-4}$
DMSO/NaOH	8	$3,02 \times 10^4$	$2,65 \times 10^{-4}$

Fonte: O autor.

A taxa de conversão foi encontrada a partir da razão entre a concentração do composto formado pela concentração do ZnPP para cada solvente. Os valores de conversão seguem a ordem crescente de 16%, 18% e 39% para DMSO/NaOH > Metanol/NaOH > DMSO.

Os parâmetros utilizados para a realização das análises de fluorescência se basearam nos resultados das análises de UV-visível são descritos na figura 1. As amostras foram excitadas no intervalo espectral de 400-450 nm, com emissão em 600-700 nm, sendo análises de fluorescência dispostas na Figura 2.

Figura 2 – Análise de Fluorescência da ZnPP antes da reação carbodiimida (a), e (b) após a reação.



Fonte: o autor.

Discussão

O entendimento das metodologias de modificação de compostos químicos é de extrema importância para inúmeras finalidades, uma vez que a empregabilidade e funcionalização com nanopartículas permitem avanços tanto tecnológicos significativos em diferentes áreas do conhecimento [8]. Os fotossensibilizadores são classificados em clorinas, porfirinas, porfirinóides e corantes orgânicos. Suas aplicações atendem diferentes áreas, como na desinfecção de superfícies e tratamento de água [9], mas ganha destaque e importância na área da saúde, no desenvolvimento de tratamento de contra infecções, diagnósticos por imagem, liberação controlada de medicamentos, e terapia fotodinâmica (FTD) [10].

Dentre esses compostos, destaca-se a protoporfirina IX de zinco (II), um fotossensibilizador que, quando submetido à irradiação luminosa, apresenta transições eletrônicas do estado fundamental para estados excitados, culminando na emissão de fluorescência [11]. A análise dessa emissão possibilita compreender o comportamento físico relacionado à estrutura molecular e à eficiência de absorção de luz, constituindo uma assinatura espectral característica do composto [11].

Um desafio a se enfrentar na utilização da ZnPP é a baixa solubilidade em soluções aquosas. Essa condição é inerente à sua estrutura molecular extensa, composta por anéis aromáticos. Essa característica química facilita a agregação do composto na presença de solventes aquosos, formando estruturas supramoleculares estáveis como dímeros [12], o que reduz os espectros de absorção e fluorescência nas análises de caracterização.

O objetivo da modificação química de um composto está na finalidade pela qual ele será empregado, a reação de carbodiimida ($-COOH$) utiliza como reagentes: EDC, DCC, Sulfo-NHS, tem como mecanismo a ativação dos grupos carboxílicos presentes na protoporfirina, formando compostos intermediários reativos que podem reagir com grupos amina ($-NH_2$), formando ligações amida [13-14]. Essa modificação é utilizada para a formação de biocarreadores e biossensores, por melhorarem a solubilidade do composto, aumentam a afinidade facilitando posteriores reações de acoplamento garantindo ligações químicas estáveis (amidas/ésteres) [15]

Utilizou-se a reação de antes do acoplamento amida (EDC/sulfo-NHS) para a modificação do ZnPP, a escolha dessa rota química reduz a degradação de moléculas, facilita a reação em sistemas biológicos, podendo ser utilizada em processos de funcionalização de nanopartículas aumentando a solubilidade em água, evitando a utilização de solventes orgânicos [6,15,16]. Os grupos carboxilas presentes na ZnPP são ativadas pela presença do EDC, formando um complexo A (intermediário), que é estabilizado com a adição do sulfo-NHS, formando um complexo B [16-17]. A adição da cisteamina garante que o grupo Amina ($-NH_2$) acople com o ácido carboxílico do fotossensibilizador [18-19], possuindo pontas com grupo tiol livre ($-SH$), possibilitando a ligação com nanopartículas metálicas. [18,19,20].

Na Figura 1, os resultados das análises de UV-visível, das amostras antes e após a reação de carbodiimida, apresentam bandas entre 390-420 nm de absorção, para todas as amostras, caracterizando as bandas de Soret da ZnPP. Entretanto, os valores de intensidade da absorbância são descritos em ordem crescente: DMSO/NaOH > Metanol/NaOH > DMSO, esse padrão de absorbância se repete para o conjugado de ZnPP, apresentando valores de intensidade de absorbância menores (figura 1b). Tal comportamento pode ser atribuído ao efeito do solvente, uma vez que a polaridade e a capacidade de ionização dos meios interferem na solubilização e estabilização da ZnPP, influenciando diretamente sua eficiência de absorção óptica. Essa alteração sugere uma diminuição da concentração efetiva do fotossensibilizador no conjugado de ZnPP, em concordância com a lei de Lambert-Beer [22]. A taxa de conversão da ZnPP em seu

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

conjugado apresentou valores inferiores a 50%, evidenciando a relevância da escolha adequada do solvente para otimizar a solubilização e o rendimento da reação.

Na tabela 1, pode-se identificar a diminuição da absortividade molar e da absorbância conforme os solventes são alterados. A utilização de NaOH auxiliou a entender o processo de desprotonação dos grupos carboxílicos presentes na ZnPP. Sua utilização na proporção de 1:1 com outros solventes evidencia a diminuição da solubilidade da ZnPP e favorece a aglomeração, resultando em corpo de fundo (ZnPP não diluído) [1].

As análises de fluorescência na região do vermelho (600-700 nm) [22] e espectrofotometria do UV-visível revelaram bandas de absorção características na região de ~400 nm, indicando a presença do fotossensibilizador após a reação. Os resultados de fluorescências obtidos para o ZnPP modificado, por solvente foram menores para todas as amostras quando comparados (figura 2). Sendo os maiores valores de fluorescência para a amostra na qual se utilizou DMSO o de menor fluorescência aquela onde se utiliza Metanol/NaOH [3,4,16].

Conclusão

Compreender a afinidade química de qualquer composto para realização de experimentos e análises é a chave para se obter resultados promissores e satisfatórios. Entretanto, a aplicabilidade e o objetivo das modificações devem ser sempre um parâmetro a ser levado em consideração. Sabe-se que a utilização de solventes como DMSO e Metanol apresenta citotoxicidade para organismos vivos em concentrações acima de ~0,1 – 0,5% (v/v), devendo ser utilizados apenas como carreador para reações químicas, não devendo ser utilizado na íntegra para ensaios celulares, pois comprometem resultados biológicos. Os resultados das análises de UV-vis e fluorescência na região do vermelho indicam sucesso na modificação do composto, apresentando respostas promissoras para futuras funcionalizações com nanomateriais e aplicações biológicas. Esses resultados, mesmo que em baixas taxas de conversão, mostraram-se satisfatórios, comprovando que é possível modificar a estrutura de fotossensibilizador por meio da reação de carbodiimida com a cisteamina. Dessa forma, foi possível obter um fotossensibilizador com maior afinidade química para processos de funcionalização com nanopartículas metálicas.

REFERÊNCIAS

1. Li D, Zhang M, Huang Y, Hu X, Hu J. FeNC with atomically dispersed iron atoms as a photosensitizer for combined photodynamic and photothermal therapy. *FlatChem*. 2024;45:100663.
2. Yu EY, Chau JHC, Lee MMS. Recyclable and environmentally friendly magnetic nanoparticles with aggregation-induced emission photosensitizer for sustainable bacterial inactivation in water. *ACS Nano*. 2024;18(3):1907–1920.
3. Zhou Y, Jiang Y, Lin J, Aidarova S. A review on surface functionalization and characterization of silicon oxide nanoparticle. 2024;17(14):3429. 1. Zhou Y, Jiang Y, Lin J, Aidarova S. A review on surface functionalization and characterization of silicon oxide nanoparticle. 2024;17(14):3429.
4. Zeng, J., Yang, W., Shi, D., Li, X., Zhang, H., & Chen, M. (2018). Porphyrin Derivative Conjugated with Gold Nanoparticles for Dual-Modality Photodynamic and Photothermal Therapies In Vitro. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3), 963–972. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00886>
5. 2. Kim JH, Kim J, Kim BH, Song S, Park J. Multiphasic size-dependent growth dynamics of nanoparticle ensembles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2025;122(23).
6. Safak S, Ozalp RG. Evaluation of polysaccharide-based nanofibrous membranes as intra-

- abdominal adhesion barriers. Iran Polym J. 2024.
7. Cunha, I. (n.d.). Fotossensibilizadores de protoporfirina IX funcionalizados com inibidores de bomba de efluxo derivados de capsaicina para potencializar a terapia fotodinâmica contra as bactérias resistentes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. PPUFU - Portal de Periódicos da Universidade Federal de Uberlândia. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.111>
 8. Shahbazi, R., & Behbahani, F. K. (2024). Synthesis, modifications, and applications of iron-based nanoparticles. *Molecular Diversity*, 28(6), 4515–4552. <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10801-9>
 9. Wen, X., Li, Y., Hamblin, M.R. Photodynamic therapy in water disinfection and infectious diseases. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2021, 48: 100420. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2021.100420>
 10. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment"
 11. Asaduzzaman, M., Ohya, M., Kumura, H., Hayakawa, T., & Wakamatsu, J. (2020). Searching for high ZnPP-forming edible bacteria to improve the color of fermented meat products without nitrite/nitrate. *Meat Science*, 165, 108109. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108109>
 12. Zhang, D., Wang, J., et al. Aggregation behavior of porphyrins in aqueous solution: implications for photophysical properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 248: 119188. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119188>
 13. Bioconjugate Techniques. (2013). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-64240-9>
 14. Yang, W., Li, Y., et al. EDC/NHS-mediated coupling reaction for biomolecule functionalization of nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 194: 111202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111202>
 15. Li, J., Rao, J., et al. Functionalized porphyrin-based nanomaterials for biosensing and drug delivery. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 205: 114118. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114118>
 16. Zhang WY, Li GC, Wang B. Synthesis of asymmetric cationic zinc porphyrin photosensitizer containing thiophene group for photodynamic therapy in vitro and theoretical calculation of DFT. *J Mol Struct*. 2024;1302:137497.
 17. Yang PC, Tseng SJ. Nano-modified viruses prime the tumor microenvironment and promote the photodynamic virotherapy in liver cancer. *J Biomed Sci*. 2024;31(1).
 18. Olubowale, O. H., Do, Q., Arachchige, N. K., Hebert, D. G., & Garro, J. C. (2024). Multifunctional Nanoparticles of Porphyrins and Phthalocyanines: Review of Synthetic Strategies and Emerging Applications. *ACS Applied Nano Materials*, 7(11), 12214–12229. <https://doi.org/10.1021/acsanm.4c01209>
 19. Xue, X., Lindstrom, A., & Li, Y. (2019). Porphyrin-Based Nanomedicines for Cancer Treatment. *Bioconjugate Chemistry*, 30(6), 1585–1603. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00231>
 20. Patra R, Sarma D. Silver nanoparticle-functionalized postsynthetically modified thiol MOF UiO-66-NH-SH for efficient CO₂ fixation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024;16(8):10196–10210.
 21. Zevatskii, Yu. E., Lysova, S. S., Skripnikova, T. A., Vorona, S. V., & Myznikov, L. V. (2024). Bouguer–Lambert–Beer Law of Absorption: Spectrophotometry in Electrolyte Solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 98(2), 242–247. <https://doi.org/10.1134/s0036024424020237>
 22. Rózsa P, Krafcsik O, Czigány Z, Lenk S, Beke D, Gali A. Thiolation and PEGylation of silicon carbide nanoparticles. *Results Chem*. 2025;16:102337.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 302158/2022-7, CNPq