

Revisão Didática de Metodologias Voltadas à Caracterização Fotofísica e aos Estudos de Interações entre Biomoléculas e Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica

Didactic Review of Methodologies Focused on Photophysical Characterization and Studies of Interactions Between Photosensitizers and Biomolecules in Photodynamic Therapy

Mayara M. Caetano,^a Naiara Cristina Bessas,^b Maria Vitória P. Vaz,^b Evelyn Christine de S. Arantes,^a Juliana Cristina Biazotto,^b Ieda V. da Cunha,^a Tayana M. Tsubone,^a Renata Galvão de Lima^{a,b}

^aUniversidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brasil

^bUniversidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, CEP 14040-900, Ribeirão Preto-SP, Brasil

*E-mail: renatagalvao@fcrp.usp.br

Submissão: 21 de Janeiro de 2026 – Aceite: 22 de Abril de 2026 – Publicado online: 11 de Maio de 2026

This review material addresses studies involving photosensitizing molecules, highlighting commonly applied methodologies or the evaluation of their photophysical and photobiological properties, as well as the relationship between photodynamic activity and the generation of reactive oxygen species (ROS). The topic is relevant and current, especially considering the growing application of these molecules in areas such as photodynamic therapy, photocatalysis, and biotechnology. The objective is to propose a critical discussion on the lack of standardization in methodologies used in the characterization of photosensitizers. Considered an interdisciplinary area, methodological discrepancies are observed among different research groups. The text highlights an important gap in the literature and consistently justifies the need for approaches more closely aligned with the principles of molecular spectroscopy. This approach gives the work a methodological and didactic character, with a potential positive impact on the reproducibility and reliability of experimental results reported in the field.

Keywords: Photosensitizer; PDT; photophysical experimental methodologies; HSA and DNA interaction.

1. Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia clínica alternativa e singular, amplamente utilizada nas áreas da medicina para o tratamento de lesões oncológicas e não oncológicas.¹ A TFD consiste na destruição de células cancerosas e na indução de alterações inflamatórias por meio da utilização de molécula fotossensibilizadora (FS), luz que varia da região do visível ao infravermelho próximo (600 – 950 nm), e a presença do oxigênio molecular (O_2).² A molécula fotossensibilizadora absorve energia luminosa no comprimento de onda adequado, levando a estados eletronicamente excitados. Ao absorverem energia, as moléculas de FS têm seus elétrons excitados do estado fundamental (S_0) para estados singleto excitados (S_1 , S_2), conforme ilustrado na Figura 1.

A partir do estado singleto excitado S_1 ou S_2 , o FS tende a voltar ao estado fundamental através da desativação radiativa (emissão de fluorescência) e não-radiativa (contribuição da conversão interna (CI) ou decaimento térmico (dissipação de

calor). De forma alternativa, pode transitar para um estado tripleto de menor energia e maior tempo de vida (T_1), via cruzamento intersistema (CIS) (decaimento não-radiativo). Nessa etapa, a energia do estado tripleto pode ser transferida para a molécula de oxigênio tripleto ($^3O_2$) ou emissão de fosforescência (decaimento radiativo). O primeiro evento leva a produção de oxigênio singleto ($^1O_2$) (denominado de mecanismo do tipo II). No mecanismo denominado como tipo I, são geradas espécies ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxidos (H_2O_2) por meio de transferência de elétrons.^{3,4}

Dentre as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas na TFD pelos fotossensibilizadores, o $^1O_2$ é considerado o agente citotóxico chave na morte celular.⁵ A efetividade do oxigênio singleto no ataque a moléculas biológicas e posterior destruição celular se deve a sua alta reatividade.⁶

O oxigênio molecular no estado fundamental é representado pela multiplicidade de spin como estado tripleto ($^3\Sigma_g$). A configuração eletrônica em acordo aos orbitais moleculares de mais alta energia antiligante

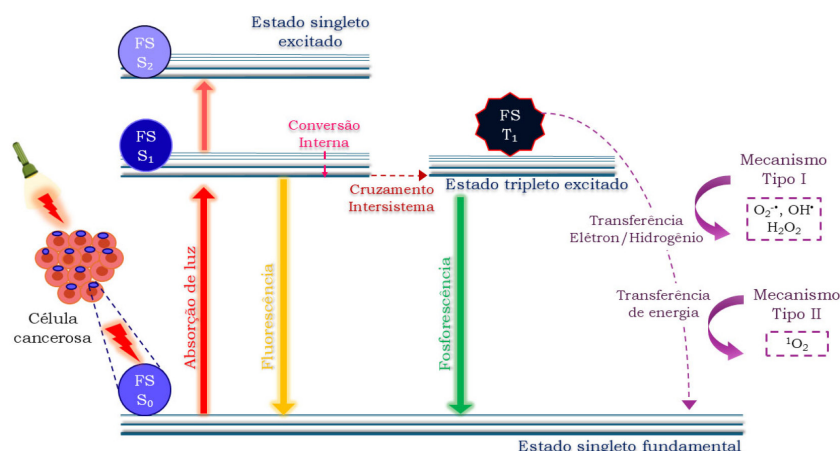
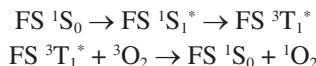


Figura 1. Representação do diagrama de Jablonski no contexto da TFD

$[\uparrow] \pi^*_x [\uparrow] \pi^*_y$. Os estados singletos para a molécula de oxigênio no estado excitado podem ser descritos com configuração eletrônica ${}^1\Delta_x ([\uparrow] \pi^*_x [\downarrow] \pi^*_y)$ e ${}^1\Delta_y ([\downarrow] \pi^*_x [\uparrow] \pi^*_y)$ e apresentam 92 kJ mol^{-1} . Sendo o estado singlete de maior energia 160 kJ mol^{-1} com configuração eletrônica ${}^1\Sigma_g ([\uparrow] \pi^*_x [\downarrow] \pi^*_y)$.⁷

A produção de ${}^1\text{O}_2$ depende da transferência de energia tripleto-tripletto (TETT) entre o oxigênio no estado fundamental (estado tripleto) e o FS (T_1) formado pelo cruzamento intersistema (CIS) (Esquema 1).⁵

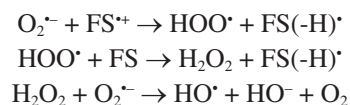


Esquema 1. Transferência de energia (mecanismo do tipo II) do fotossensibilizador no estado tripleto, com a geração de oxigênio singlete. * representa o estado excitado

O CIS é um processo de desativação não-radiativo, que permite a conversão entre estados eletrônicos de diferentes multiplicidades de spin, sendo fundamental para a geração de ${}^1\text{O}_2$. Normalmente, o CIS ocorre entre níveis isoenergéticos, como $\text{S}_1 \rightarrow \text{T}_n$ ou $\text{T}_1 \rightarrow \text{S}_0$, que se trata de transições eletrônicas proibidas por spin (diferentes multiplicidades de spin).⁸ O CIS é favorecido em sistemas com acoplamento spin-órbita (acoplamento entre o spin e os movimentos orbitais do elétron excitado), o que pode levar ao aumento da população do estado T_1 e, consequentemente, à observação de fosforescência ou à redução da intensidade de fluorescência. Em compostos, como moléculas orgânicas, nos quais o acoplamento spin-órbita não é negligenciável, aumenta a probabilidade de formação do estado tripleto. A principal consequência do acoplamento spin-órbita é a diminuição da distinção entre dois estados caracterizados por diferentes multiplicidades de spin (singlete S_1 e tripleto T_n). Os estados que deveriam estar separados tornam-se parcialmente misturados: o estado tripleto assume algum caráter de estado singlete e vice-versa.⁸

Quando o fotossensibilizador encontra-se no estado tripleto excitado ($\text{FS } {}^3\text{T}_1^*$), pode haver a transferência de elétron do supressor Q (o substrato orgânico a ser oxidado) para o FS^* , que atua como receptor de elétrons, produzindo um par de radicais: $\text{FS } {}^3\text{T}_1^* + \text{Q} \rightarrow \text{FS}^{\bullet-} + \text{Q}^{+\bullet}$.⁸

Partindo-se desse par de radicais, uma reação em cascata de transferência de elétrons pode ocorrer (Esquema 2). O ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode então ser formado por transferência de elétrons entre o ânion radical do FS e o oxigênio ($\text{FS}^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FS } {}^1\text{S}_0 + \text{O}_2^{\bullet-}$). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é principal EROs formada por transferência de elétrons, a partir da qual outras espécies reativas podem ser formadas: radicais hidroperoxila ($\text{HOO}^{\bullet}$), hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).⁷



Esquema 2. Transferência de elétron (mecanismo tipo I) do fotossensibilizador no estado tripleto, com a geração de hidroperoxila ($\text{HOO}^{\bullet}$), hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Algumas características que tornam uma molécula FS ideal são: i) elevada absortividade molar na região de 600 – 800 nm, devido à maior penetração tecidual da luz; ii) estabilidade química no escuro e iii) estado tripleto excitado para promover a produção de EROs por mecanismos tipo II ou I.^{9,10}

Esta revisão apresenta uma visão geral de três importantes classes de fotossensibilizadores: porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas. As porfirinas e as ftalocianinas possuem um sistema tetrapirrólico conjugado característico, enquanto as fenotiazinas consistem em pequenas moléculas orgânicas conjugadas, sendo, portanto, uma classe de compostos não macrocíclicos (Figura 2).^{4,11,12}

A caracterização fotofísica de moléculas fotossensibilizadoras é fundamental para a compreensão de seus comportamentos fotoquímicos e para a correta

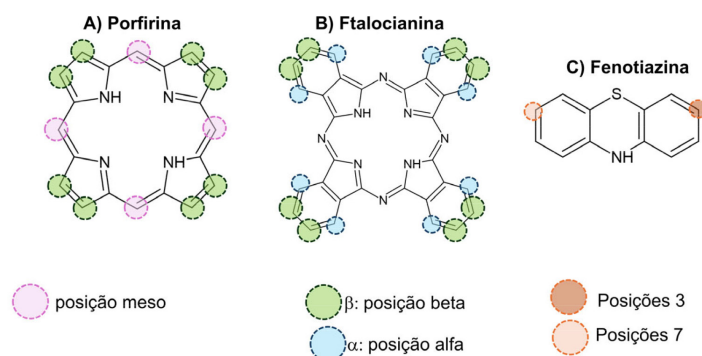


Figura 2. Estruturas químicas básicas para as três classes de fotossensibilizadores em TFD, sendo: A) porfirinas, B) ftalocianina e C) fenotiazina

interpretação dos resultados biológicos associados à terapia fotodinâmica. Nesse contexto, os próximos tópicos apresentam um roteiro das principais metodologias utilizadas na caracterização fotofísica de fotossensibilizadores, bem como uma discussão crítica sobre a aplicação e as limitações dessas abordagens na literatura. Essa proposta confere ao texto um caráter didático e prático, com potencial para contribuir para a melhoria da reprodutibilidade e da qualidade dos estudos na área.

Dessa forma, esta revisão busca não apenas reunir e discutir conceitos fundamentais, mas também fornecer subsídios metodológicos que auxiliem pesquisadores na condução e interpretação de experimentos envolvendo fotossensibilizadores.

2. Caracterização Fotofísica

2.1. Perfil de absorção eletrônica e coeficiente de absorvidade molar para FS

Uma das técnicas fundamentais para a caracterização de moléculas de fotossensibilizadores (FS) é a espectroscopia na região do UV-Visível. A técnica permite a identificação de bandas de absorção, oferecendo informações sobre as transições eletrônicas que governam a interação da luz com a molécula.¹⁰ Além disso, a espectroscopia UV-Visível desempenha um papel crucial na avaliação da agregação e da fotoestabilidade dos FS.¹³

Na terapia fotodinâmica (TFD), os FS devem apresentar elevado coeficiente de absorvidade molar na faixa do visível, preferencialmente entre (600 – 900 nm), denominada intervalo da janela terapêutica.^{2,14} Especificamente, apresentar uma alta absorvidade molar ($\epsilon \sim 1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nas faixas espectrais do vermelho e do infravermelho próximo (600 – 850 nm) é essencial para a absorção eficiente da luz, aumentando assim as capacidades de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).^{2,13}

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) quantifica a capacidade de um FS absorver luz em um comprimento

de onda específico em solução.¹⁴ Ele pode ser determinado usando a lei de Beer-Lambert (Equação 1):

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (1)$$

onde 'A' representa a absorbância em um comprimento de onda específico, ' ϵ ' é o coeficiente de absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ' c ' é a concentração molar (mol L^{-1}) e ' l ' é o comprimento do caminho óptico da cubeta (cm).¹⁵ Para calcular ϵ a partir do experimento de UV-Visível, preparam-se soluções de concentrações conhecidas em um solvente adequado (ou seja, escolhe-se um solvente no qual a amostra seja completamente solúvel) e mede-se sua absorbância em comprimentos de onda selecionados. Em seguida, constrói-se um gráfico da absorbância (A) em função da concentração (c). De acordo com a Lei de Beer-Lambert, a inclinação da reta obtida corresponde ao produto entre o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e o caminho óptico da cubeta (l). Assim, o valor de ϵ pode ser determinado dividindo-se a inclinação da reta pelo comprimento do caminho óptico da cubeta, obtendo-se a absorvidade molar do composto no comprimento de onda analisado.

Com base nas regras de seleção, a magnitude do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) pode ser relacionada ao tipo de transição eletrônica envolvida. Algumas transições eletrônicas são classificadas como permitidas ou proibidas de acordo com as regras de seleção de spin e de simetria.¹⁶ Transições eletrônicas que apresentam valores de ϵ entre 1×10^3 e $1 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ são tipicamente permitidas tanto por spin quanto por simetria, como as transições singleto-singleto ($S_0 \rightarrow S_1$).¹⁵ Por outro lado, quando os valores de ϵ estão na faixa de 1 a $1 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, as bandas de absorção geralmente estão associadas a transições eletrônicas proibidas por simetria, embora ainda permitidas pela regra de spin. As transições do tipo singleto-triplete ($S_0 \rightarrow T_1$) são formalmente proibidas pela regra de seleção de spin, pois envolvem mudança na multiplicidade do estado eletrônico. Entretanto, em alguns fotossensibilizadores (FS) coordenados a íons metálicos das séries de transição 4d e

5d, o acoplamento spin-órbita pode tornar essa transição parcialmente permitida. A forte interação spin-órbita promovida por esses metais mistura estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. Como consequência, o estado fundamental predominantemente singleto ($S = 0$) passa a adquirir uma pequena contribuição de caráter tripleto ($T = 1$). Dessa forma, a função de onda do estado fundamental pode ser descrita como predominantemente singleto, contendo uma pequena mistura de caráter tripleto, o que relaxa a regra de seleção de spin e permite, ainda que fracamente, a ocorrência da transição $S_0 \rightarrow T_1$.¹⁵

Além disso, a estrutura molecular e o ambiente (solvente ou sistema de liberação de fármacos), incluindo a polaridade do solvente e as interações intermoleculares, influenciam significativamente no coeficiente de absorvidade molar devido à modulação da deslocalização eletrônica.^{17,18}

Na Tabela 1 estão relatadas as propriedades fotofísicas de diferentes classes de fotossensibilizadores (porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas) juntamente com seus respectivos derivados.

Em geral, as porfirinas exibem uma banda de absorção intensa na região do visível entre 400 e 420 nm, denominada banda Soret. Essa banda está associada a transições eletrônicas fortemente permitidas, atribuídas à transição $S_0 \rightarrow S_2$. Adicionalmente, porfirinas de base livre apresentam quatro bandas Q menos intensas em comprimentos de onda mais longos (500–650 nm), atribuídas à transição $S_0 \rightarrow S_1$. Essas bandas apresentam menor intensidade devido ao cancelamento parcial do momento de transição descrito pelo modelo de Gouterman,¹⁹ resultando em coeficientes de absorvidade molar tipicamente na faixa de 10^3 – 10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹.^{20–22}

Os derivados de porfirina relatados na literatura podem ser sintetizados por meio de modificações estruturais em diferentes posições do anel tetrapirrólico.²³ As substituições podem ocorrer nos carbonos β dos anéis pirrólicos ou nos quatro carbonos meso da estrutura macrocíclica, permitindo a introdução de vários grupos substituintes.^{23,24} Além disso, a estrutura da porfirina possui um sítio de coordenação livre onde um íon metálico pode ser incorporado, formando metaloporfirinas. Essas metaloporfirinas exibem propriedades fotofísicas e químicas distintas devido à interação entre o centro metálico e o sistema de anéis conjugados.^{25,26}

Em metaloporfirinas, o deslocamento para o vermelho nas bandas de absorção induzido pela coordenação do íon metálico depende da configuração eletrônica do íon metálico, particularmente da ocupação de seus orbitais d.²³ Essa modificação também pode aumentar os coeficientes de absorvidade molar.²⁷ A inserção de um íon metálico no centro da porfirina modifica a estrutura eletrônica e a simetria do macrociclo, resultando em alterações nas propriedades fotofísicas do sistema. A coordenação do

metal aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico aumenta a simetria da molécula e pode alterar os níveis de energia dos orbitais eletrônicos envolvidos nas transições ópticas. Além disso, dependendo da natureza do íon metálico, especialmente de seu caráter diamagnético ou paramagnético, podem ocorrer mudanças significativas nos processos de relaxação eletrônica, influenciando propriedades como intensidade de absorção, fluorescência e formação de estados tripleto. Metais paramagnéticos, que possuem elétrons desemparelhados, tendem a favorecer processos de desativação não radiativa, pois esses elétrons podem interagir com os estados excitados da porfirina, facilitando a dissipação da energia eletrônica na forma de vibrações moleculares em vez de emissão de luz.^{28,29}

Os substituintes nas posições β e meso das porfirinas têm efeitos distintos em sua estrutura eletrônica e propriedades de absorção.^{26,27,30} Os substituintes β podem impactar significativamente a estrutura eletrônica do macrociclo, dependendo de sua natureza. Por exemplo, grupos retiradores de elétrons nessas posições podem induzir distorções estruturais, reduzir o gap HOMO-LUMO e causar deslocamentos batocrômicos nas bandas de absorção. Em contraste, os substituintes meso influenciam principalmente a planaridade da estrutura da porfirina.²³ Grupos volumosos nessas posições introduzem impedimento estérico, levando à não planaridade e afetando a intensidade da banda de absorção sem deslocar significativamente suas posições.^{23,31,32}

As moléculas de ftalocianina exibem uma estrutura plana mais rígida do que as porfirinas devido à adição de grupos isoindol, formando um macrociclo tetrabenzoporfirínico. Essa modificação estrutural desloca a banda Q para comprimentos de onda acima de 650 nm e aumenta os coeficientes de absorvidade molar para aproximadamente 1×10^5 L mol⁻¹ cm⁻¹, expandindo assim a janela terapêutica em comparação com as porfirinas não modificadas.^{24,33}

A modificação estrutural das ftalocianinas também pode ocorrer por meio da introdução de ligantes axiais no metal central e/ou pela inserção de substituintes nas posições α e β do anel benzênico ligado aos grupos piróis.³⁴ As modificações periféricas influenciam a carga e a hidrofobicidade, permitindo a síntese de FS com propriedades fotofísicas aprimoradas e atividades biológicas distintas.^{35–37}

O íon metálico central desempenha um papel crucial na determinação das propriedades fotofísicas tanto das metaloftalocianinas quanto das metaloporfirinas.³⁸ Além disso, as ftalocianinas são geralmente hidrofóbicas, com baixa solubilidade em água e em vários solventes orgânicos, o que leva a problemas de agregação durante os estudos. Para mitigar essa limitação, os pesquisadores introduziram grupos catiônicos ou aniônicos na estrutura da ftalocianina para reduzir a agregação.³⁹

Tabela 1. Propriedades fotofísicas para as três classes de fotossensibilizadores em TFD

Fotossensibilizador	Banda Soret (nm) / ϵ ($M^{-1}cm^{-1} \times 10^3$)	Banda Q(nm) / ϵ ($M^{-1}cm^{-1} \times 10^3$)	λ_{em} (nm)	Φ_f	τ_f (ns)	Ref
Protoporfirina IX	352 ^a 402 ^b	(532; 557; 589;641) ^a (503; 537; 575;629) ^b	(620; 680) ^a (630; 660) ^b	<0,01 ^a 0,08 ^b	2,5 ^a (9,6; 10,8) ^b	47
Protoporfirina IX conjugada piperazina (PpIX-Morp)	401 ^b /108	502 ^b /108.537 ^b (574; 628) ^b	(632; 698) ^b	0,07 ^b	(11,7; 1,46) ^b	48
Protoporfirina IX conjugada morfolina (PpIX-Pip)	401 ^b /128	503 ^b /108.538 ^b 576 ^b ; 629 ^b	(631; 697) ^b	0,07 ^b	(12,17; 1,67) ^b	48
Tetrafenilporfirina (H ₂ TPP)	414 ⁱ /317.846	512 ⁱ /12.923; (545; 648) ⁱ 589 ⁱ	(652; 715) ⁱ	0,13 ⁱ	13,6 ⁱ	49
ZnTPP	423 ^d	(550;555; 594) ^g	646 ^d	0,030 ^d	2,1 ^d	50,51
	423 ^g 420 ^b /549.540	589 ^d (552; 587) ^b /39.810 ^b	603 ^b	0,0033 ^b	1,7 ^b	
CuTPP	414 ^b /457.088	538; 574 ^b /10.054	805 ^b	< 1 x 10 ^{-5h}	< 6 ^b	51
PdTPP	417 ^d	(524; 553) ^d	607 ^d	0,00018 ^d	~0,01 ^d	50
	418 ^g	(524; 553) ^g	-	-	-	
meso-tetrakis-(4-sulfanofenil)porfirina (TPPS ₄)	412 ^a	515 ^a /13 ^a (551; 579; 630) ^a	(640; 700) ^a	0,27 ^a	9,9 ^a	52–54
H ₂ Pc (ftalocianina)	-	713 ^c /4.450 ^c ; 689 ^c /4.610 ^c (712; 682) ^e	723 ^c 720 ^e	0,13 ^c 0,13 ^e	0,54 ^c 0,39 ^e	55,56
ZnPc	-	670 ^c /234.442 ^c 672 ^c /138.028 ^c	676 ^c 682 ^c	0,17 ^c 0,18 ^c	- -	57,58
AlPcCl	-	680 ^c /100	688 ^c	0,37 ^c	6,09 ^c	59
GaPcCl	-	680 ^c /141.253	691 ^c	0,30 ^c	3,71 ^c	60,61
[RuPc]	318 ^a	(632; 576) ^a	-	0,033 ^a	-	62,63
[RuPc(py) ₂]	375 ^b	(622; 567) ^b	-	-	-	64
[RuPc(4-Mepy) ₂]	375 ^b	(622; 560) ^b	-	-	-	65
[RuPcCl(DMSO)]	316 ^c	640 ^c	-	0,007 ^b	1,8; 3,2 ^b	66
[Ru(tBu) ₄ Pc](py) ₂	(376; 315) ^b	(627; 578) ^b	870 ^b	0,0003 ^b	-	67
[RuPc(NO)(NO ₂)]	354 ^a	608 ^a	696 ^a	0,29 ^a	-	68
[RuPc(NO)(ONO)]	350 ^a	(682; 616) ^a	690 ^a	0,040 ^a	-	63
[RuPc([Ru(bpy) ₂ (pz)NO] ³⁺)]	318 ^c	(634; 576) ^c	690 ^g	0,030 ^a	-	69
[Ru(TPP)(NO)(ONO)]	333 ^b ;410 ^b	(608; 564) ^b	-	-	-	70
[Ru(TPP)Cl(NO)]	414 ^b	(610; 564) ^b	-	-	-	71
Methylene blue (MB)	293 ^a	610 ^a 665 ^a /67.100 ^a	688 ^a	0,52 ^a	-	72,73
Toluidine blue (TB)	-	618 ^f /21.221 ^f	638 ^f	0,40 ^f	0,26 ^f	45,74

a: H₂O; b: MeOH; c: DMSO; d: Tolueno; e: DMF, f: solução tampão pH = 7.4; g: THF; h: diclorometano, i: EtOH

Nos corantes fenotiazínicos, o sistema tricíclico incorpora um átomo de enxofre e dois átomos de nitrogênio, com substituintes nas posições 3 e 7 desempenhando um papel crítico na modificação das propriedades fotofísicas e no aumento das capacidades fotossensibilizantes. As fenotiazinas normalmente exibem máximos de absorção fortes entre 600 e 660 nm ($\epsilon_{max} > 4,7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^{38,40}

Dentre as fenotiazinas mais estudadas em TFD são o azul de metileno e o azul de toluidina.^{41–43} O azul de metileno absorve a 664 nm em água ($\epsilon_{664 \text{ nm}} = 8,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),⁴⁴ enquanto o azul de toluidina tem uma ampla faixa de

absorção entre 610 e 660 nm, com absorbância máxima a 618 nm ($\epsilon_{618 \text{ nm}} = 39,515 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^{45,46}

2.2. Emissão de fluorescência: rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência

A espectroscopia de emissão de fluorescência permite a identificação e caracterização de moléculas, uma vez que os espectros de emissão de fluorescência refletem os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental da molécula excitada.^{75,76} Essa técnica é amplamente utilizada para avaliar potenciais fotossensibilizadores (FS) para terapia

fotodinâmica, fornecendo informações importantes, como o tempo de vida da fluorescência (τ_f) e o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f), que são essenciais para a compreensão do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ).^{77,78}

A emissão de fluorescência ocorre por meio de uma transição radiativa entre estados de mesma multiplicidade de spin ($S_1 \rightarrow S_0$). De acordo com as regras de seleção da mecânica quântica, essas transições são consideradas permitidas pelo spin. O estado excitado tem um tempo de vida de aproximadamente 1×10^{-9} s e, à medida que o elétron retorna ao estado fundamental sem alterar sua orientação de spin, observa-se a emissão de fluorescência.^{75,79}

O tempo de vida da fluorescência (τ_f) é definido como o tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado singlete antes de retornar ao estado fundamental. Este parâmetro determina por quanto tempo um fluoróforo, no estado excitado, pode interagir ou se difundir em seu ambiente.^{15,80} O tempo de vida da fluorescência, por sua vez, é a razão entre os fótons emitidos e os absorvidos e é geralmente expresso pela Equação (2):

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2)$$

onde k_r representa a taxa de emissão do fluoróforo e k_{nr} corresponde à sua taxa de decaimento não radiativo para o estado fundamental (S_0).

Geralmente, o tempo de vida de fluorescência pode ser medido usando técnicas de tempo de vida de fluorescência por Contagem de Fótons Únicos Correlacionados (TCSPC) ou Microscopia de Imagem de Tempo de Vida de Fluorescência (FLIM).

Experimentalmente, o τ_f é determinado excitando a população de moléculas com um pulso de excitação curto (de um laser, LED ou lâmpada de flash fotólise) e registrando o decaimento da intensidade de fluorescência. Para uma população de moléculas com um único tempo de vida τ , o decaimento da intensidade segue um modelo de decaimento

exponencial simples (Equação 3).¹⁵

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3)$$

onde t é o tempo desde a excitação e I_0 é a intensidade inicial. τ é o tempo necessário para que a intensidade diminua para $1/e$ ($= 0,368$ (36,8%)) do seu valor inicial.

Os decaimentos da intensidade de fluorescência podem ser descritos plotando-se em escala de intensidade ou logarítmica em função do tempo (t), como mostrado na Figura 3.

A qualidade do ajuste do decaimento de intensidade, utilizando um modelo de decaimento exponencial simples para a determinação do tempo de vida, é avaliada por meio do valor de mínimos quadrados (χ^2). Na prática, o melhor ajuste é obtido com valores de χ^2 entre 0,8 e 1,0.¹⁵ Alguns estudos apresentam decaimentos de fluorescência multiexponenciais, como decaimentos biexponenciais ou triexponenciais. No caso de decaimentos multi exponenciais, o valor de τ_{AVE} é fornecido pela Equação (4).

$$\tau_{AVE} = \frac{(A_1 \times \tau_1) + (A_2 \times \tau_2)}{(A_1 \times \tau_1 + A_2 \times \tau_2)} \quad (4)$$

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) é a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos por fluorescência¹⁵. O Φ_f pode indicar a probabilidade de o estado excitado ser desativado por fluorescência em vez de por outro mecanismo não radiativo.¹⁵ Dois métodos são comumente utilizados para determinar o rendimento quântico de fluorescência: o método do rendimento quântico absoluto (direto) e o método do rendimento quântico relativo (indireto).⁸¹ As medidas de rendimento quântico de fluorescência obtidas pelo método indireto são amplamente disponíveis para fotossensibilizadores e mais acessíveis do que o método absoluto.^{9,48,82} No método do rendimento quântico absoluto, os valores são obtidos a partir de uma esfera integradora que captura toda a luz emitida pela amostra, evitando a necessidade de um padrão de referência. A desvantagem é

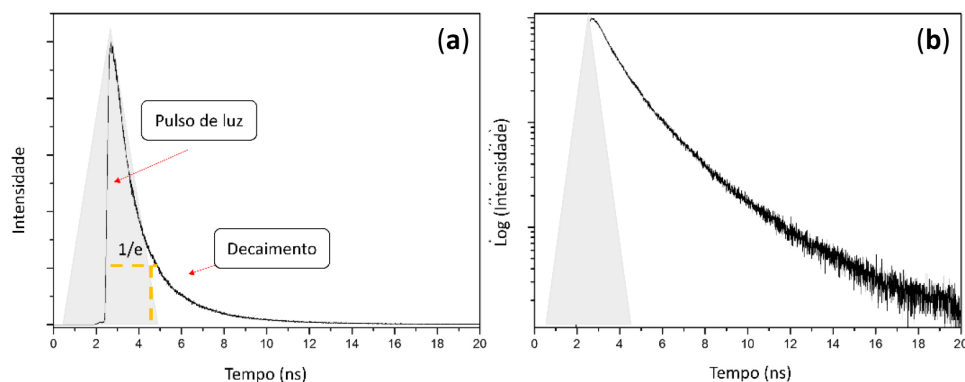


Figura 3. Decaimento da intensidade de fluorescência após um pulso de excitação (a) e escala logarítmica de intensidade (b)

que uma esfera integradora é necessária para a medição.⁸³

O método de rendimento quântico relativo é o mais amplamente aplicado pois compara a emissão de fluorescência do composto estudado com um padrão de propriedades ópticas semelhantes, na mesma região de emissão de fluorescência entre a amostra e o padrão de referência.⁸⁴ A absorvância do padrão de referência e da amostra no comprimento de onda de excitação foi definida entre 0,01 e 0,10. As janelas de excitação e emissão devem ser as mesmas para as soluções padrão e de amostra de FS. Na Tabela 2, o padrão de referência para rendimento quântico de fluorescência é descrito.⁸⁵

Os valores absolutos são calculados usando as amostras padrão que têm um valor de rendimento quântico de fluorescência fixo e conhecido (Φ_f), de acordo com a Equação (5):

$$\Phi_A = \Phi_R \left(\frac{\text{Grad}_A}{\text{Grad}_R} \right) \left(\frac{n_R^2}{n_A^2} \right) \quad (5)$$

onde o subscrito “R” se refere ao padrão de referência, “A” se refere à amostra, Φ é o rendimento quântico de fluorescência, Grad é a área dos espectros de emissão de fluorescência integrados e n é o índice de refração do solvente.^{15,48,86}

Após a coleta dos espectros de emissão de fluorescência de cada concentração de amostra e padrão de referência, a partir desses dois conjuntos de dados, foi criada uma curva de gradiente (Figura 4). No eixo x representa a absorvância no comprimento de onda de excitação e o eixo y representa a área sob o pico de fluorescência. A inclinação dessa reta é então utilizada na equação 5, obtendo-se o Φ_f .

Diversos fatores influenciam a intensidade de fluorescência, os perfis de emissão e excitação e os rendimentos quânticos de fluorescência dos FS, incluindo modificações estruturais, força iônica, polaridade do solvente, variações de pH e concentração de FS.^{87–89} A polaridade do solvente afeta fortemente a intensidade de fluorescência, com solventes mais polares geralmente reduzindo a emissão de fluorescência devido à diminuição da solubilidade do FS.⁴⁷

A combinação dos perfis de absorção na região UV-Visível e da emissão de fluorescência permite a

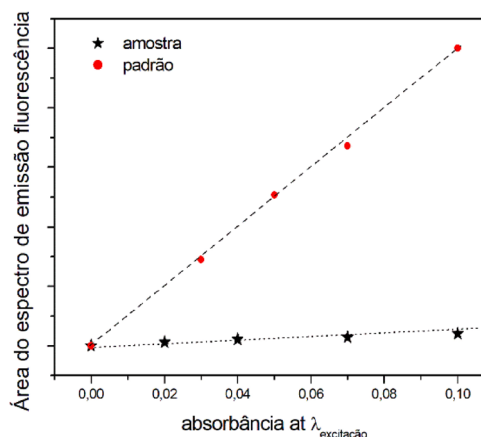


Figura 4. Tratamento matemático da integral da área do espectro de emissão de fluorescência em função da absorvância para padrões de referência e amostras

determinação do deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) (Equação 6).

$$\Delta\nu (\text{cm}^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_{\text{abs}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{em}}} \right) \times 10^7 \quad (6)$$

É importante destacar que os valores de λ_{abs} e λ_{em} utilizados para o cálculo do deslocamento de Stokes envolvem estados eletrônicos correlacionados.¹⁵ A análise do perfil espectral de emissão de fluorescência pode ser auxiliada pela avaliação do espectro de excitação de fluorescência (Figura 5), permitindo identificar a transição eletrônica envolvida no processo emissivo. No caso das porfirinas, a emissão de fluorescência está associada à transição $S_1 \rightarrow S_0$. Dessa forma, o valor do deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) é calculado entre λ_{abs} e λ_{em} considerando as bandas Q, correspondentes à transição $S_0 \rightarrow S_1$. A banda Soret, por sua vez, está relacionada à transição $S_0 \rightarrow S_2$ e, portanto, não é a mais adequada para essa análise.

Geralmente, um maior deslocamento de Stokes está correlacionado com um menor rendimento quântico de fluorescência, porque a energia é perdida durante o processo não radiativo.¹⁵ O tempo de vida da fluorescência e o rendimento quântico permitem calcular a constante radiativa (k_r) e a não radiativa (k_{nr}). O valor de k_{nr} mais alto está associado a um Φ_f menor e maior eficiência de cruzamento intersistema (k_{cis}) e maior produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

Tabela 2. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_f), faixas de absorção e emissão dos padrões de rendimento quântico recomendados

Padrão	Absorvância (nm)	λ_{ex} (nm)	Solvente	Φ_f
Sulfato de quinino	270 – 400	385 – 700	0.1 M H_2SO_4	0,58
Fluoresceína	400 – 550	490 – 690	0.1 M NaOH	0,89
Rodamina 6G	424 – 575	505 – 750	etanol	0,91
IR125	550 – 875	750 – 1.000	DMSO	0,23

Os dados apresentados nesta tabela foram extraídos da referência.⁸⁵

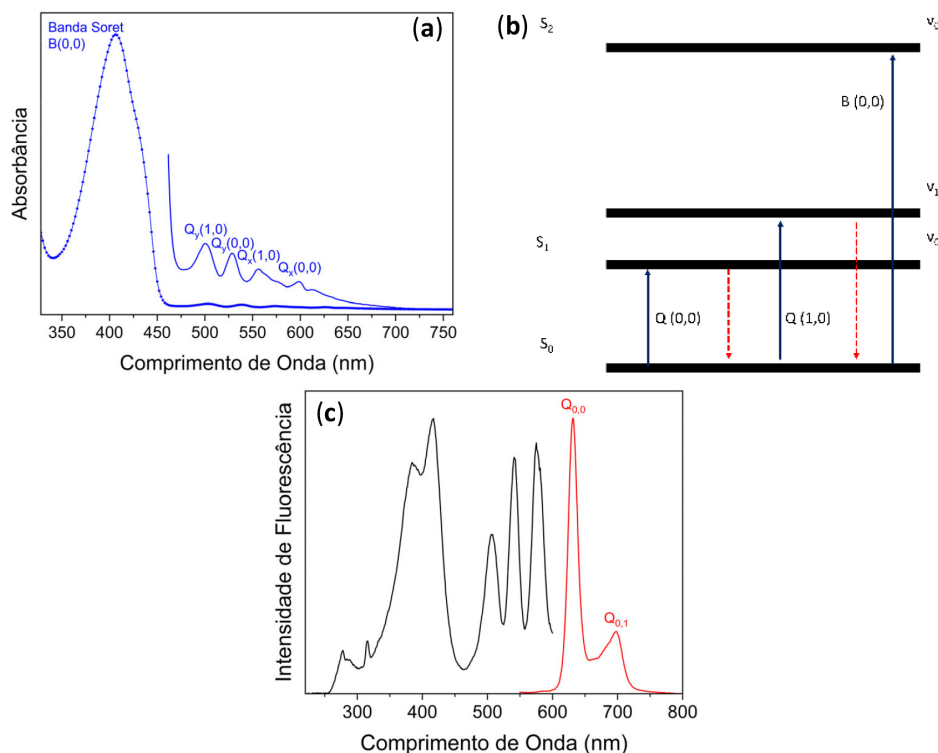


Figura 5. Espectros na região do UV-Visível para a Protoporfirina IX (PpIX) (a). Representação das transições eletrônicas S_0 , S_1 e S_2 (b). Espectros de excitação (linha preta) e de emissão de fluorescência (linha vermelha) da PpIX (c)

A constante radiativa (k_r) e a constante não radiativa (k_{nr})^{77,86} são calculadas de acordo com a Equação 7:

$$k_r = \frac{\Phi}{\langle \tau \rangle} \quad (7)$$

onde Φ é o rendimento quântico de fluorescência e $\langle \tau \rangle$ é o tempo de vida médio da fluorescência.

O k_{nr} , que é a soma das constantes de taxa de conversão interna e de cruzamento intersistema, é calculado utilizando a Equação 8:

$$k_{nr} = \frac{(1 - \Phi)}{\langle \tau \rangle} \quad (8)$$

2.3. Estado tripleto: perfil de absorção do espectro de transiente e tempo de vida do estado tripleto

A caracterização dos perfis de absorção do espectro de transiente, bem como o tempo de vida do estado tripleto, são importantes para a discussão do processo não radiativo CIS, uma vez que o estado tripleto necessita de tempo de vida suficientemente longo para permitir a transferência de energia para o estado tripleto $^3O_2$ e assim produzir $^1O_2$.¹⁵

A fotólise por pulso de laser foi desenvolvida por George Porter, sendo este agraciado com o prêmio Nobel em 1967 por sua contribuição. Esta técnica permitiu o estudo e

entendimento de processos fotoquímicos e fotofísicos em uma escala muito pequena de tempo, de nano segundos (1×10^{-9} s) até femton segundos (1×10^{-15} s). Durante a década de 90, após a elucidação desta técnica, foi possível o esclarecimento de muitas reações rápidas, como as reações que ocorrem em organismos fotossintéticos.^{90,91}

A fotólise por pulso de laser pode ser definida também como espectroscopia de absorção resolvida no tempo, uma vez que se diferencia de técnicas de fluorescência resolvida no tempo. Trata-se de uma técnica não trivial. O FS é irradiado por um pulso de luz de intensidade capaz de excitar as moléculas no estado fundamental S_0 , gerando espécies excitadas no estado singlete. Em seguida, pode ocorrer cruzamento intersistema, sendo gerados, portanto, os estados tripletos T_1 ou T_n . O FS é novamente irradiado, por uma luz de intensidade menor e com determinado tempo em relação ao pulso de luz, podendo assim ser registrada a diferença entre a absorção das espécies excitadas e das espécies no estado fundamental (ΔA). Com a alteração do tempo entre as irradiações é possível obter informações sobre o decaimento das espécies excitadas e/ou informações sobre reações que ocorrem nos estados excitados.⁹²

No espectro de absorção de transientes (Figura 6) se vê contribuições negativas e positivas.

As contribuições negativas referem-se à diferença entre as moléculas no estado excitado e fundamental, ou seja, quando se irradia a amostra por pulsos de luz,

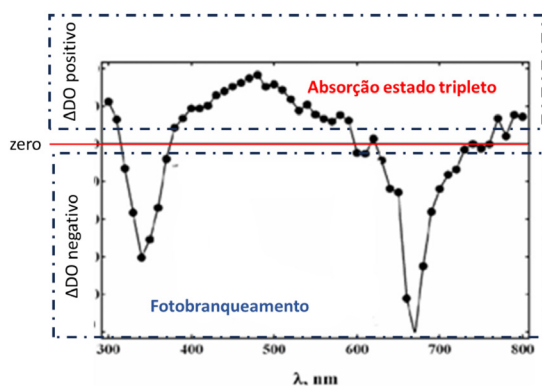


Figura 6. Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser da ZnPC ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) após excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção máxima do tripleto centrada no comprimento de onda de 480 nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 380 nm e 580 nm.

Fonte: Maranhão 2008⁹¹ com modificações

tem-se, consequentemente, a excitação das moléculas. Portanto, a fração de moléculas no estado fundamental na amostra excitada é menor do que na amostra não excitada. Isto se traduzirá em um sinal negativo que se denomina fotobranqueamento.⁹³ O sinal positivo no espectro está relacionado com o estado excitado.⁹² As espécies que se encontram no estado excitado após a absorção de luz de menor intensidade podem alcançar estados de maior energia - T_2 ou T_n , e assim, observar a absorção destes como um sinal positivo. Através da cinética de decaimento do estado excitado T_1 no comprimento de onda máximo da absorção do estado excitado tripleto, é possível obter os tempos de vida dos estados excitados tripleto (τ_T).⁹⁴

Um fotossensibilizador adequado deve apresentar no seu estado tripleto excitado um tempo de vida de longa duração ($\tau_T \geq 500 \text{ ns}$) podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas como com o oxigênio.⁹⁴

2.4. Metodologias para determinação e quantificação da produção de oxigênio singlete

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), gerado em reações de mecanismo Tipo II, exibe propriedades oxidativas e é reconhecido como um fator chave em diversos processos químicos e biológicos, como estresse oxidativo e sinalização celular.^{95,96} Quando um fotossensibilizador (FS) é ativado por luz de um comprimento de onda apropriado, ele transfere energia para o oxigênio molecular, gerando $^1\text{O}_2$, que subsequentemente reage com biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando à destruição das células-alvo.⁹⁷

Dado o papel significativo do $^1\text{O}_2$ no contexto da TFD, métodos precisos para sua detecção e quantificação são necessários. No entanto, a detecção de oxigênio singlete permanece um desafio devido à sua curta vida útil (Tabela 3).

Atualmente, métodos diretos e indiretos são empregados para esse fim, cada um com eficácia e aplicabilidade variáveis, conforme discutido abaixo.

2.4.1. Método direto de quantificação do $^1\text{O}_2$

O método direto para monitorar a formação de $^1\text{O}_2$ baseia-se na detecção da emissão de fosforescência na faixa de 1270 a 1280 nm, que corresponde à transição eletrônica de $^1\text{O}_2$ para o estado tripleto fundamental ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$).^{96,97} por luminescência infravermelha resolvida no tempo ou em estado estacionário.⁹⁸ Essa técnica é amplamente reconhecida como padrão para determinar rendimentos quânticos, tempos de vida e constantes de taxa de desativação de $^1\text{O}_2$ em vários meios. No entanto, a fosforescência do $^1\text{O}_2$ é muito fraca, com rendimentos quânticos variando de 10^{-5} a 10^{-7} dependendo do solvente, geralmente exigindo excitação a laser (por exemplo, lasers pulsados do tipo Nd:YAG), alta concentração de fotossensibilizadores e detectores de infravermelho próximo muito sensíveis (e um tanto caros) (por exemplo, diodo de Ge resfriado a 77 K).⁹⁹⁻¹⁰²

Para realizar a medição, utiliza-se uma solução fotossensibilizante com densidade óptica $\leq 0,3$ no comprimento de onda de excitação. Soluções padrão com valores de Φ_A bem estabelecidos, que absorvem na região espectral de interesse, servem como referência sob condições experimentais idênticas. Esses valores de referência podem ser encontrados em tabelas publicadas.^{103,104} Para solventes aquosos, Rosa de Bengala ($\Phi_A = 0,76$, $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$)¹⁰⁴ e azul de metileno ($\Phi_A = 0,52$, $\lambda_{\text{exc}} = 660 \text{ nm}$) são comumente usados.^{77,105} Em solventes orgânicos, fotossensibilizadores como a ftalocianina de zinco ($\Phi_A = 0,55$ em etanol, $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$)¹⁰⁵ e a meso-tetrafenilporfirina ($\Phi_A = 0,64$ em dimetilformamida, $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$)¹⁰⁶ são frequentemente empregados.

Após irradiação, a solução de FS emite um espectro de fosforescência com intensidade máxima na faixa de 1270 a 1280 nm, característico da emissão de fluorescência de $^1\text{O}_2$.¹⁰⁷ Para garantir uma quantificação precisa, a absorbância da amostra e da referência deve ser igualada no comprimento de onda de excitação, apresentando ambas o mesmo fator de absorção e tempo de vida de $^1\text{O}_2$.

Experimentalmente, o resultado de decaimento de emissão de fosforescência para $^1\text{O}_2$ é obtido semelhante a Figura 7a, sendo possível obter dados de intensidades máximas de emissão no infravermelho próximo (Figura 7b) e tempo de vida do oxigênio singlete.¹⁰⁸

Matematicamente, algumas literaturas consideram a determinação de rendimentos quânticos de oxigênio singlete (Φ_A) por meio de uma equação de proporcionalidade simples da intensidade de emissão de fosforescência de $^1\text{O}_2$ (Equação 9).^{8,104,110,111}

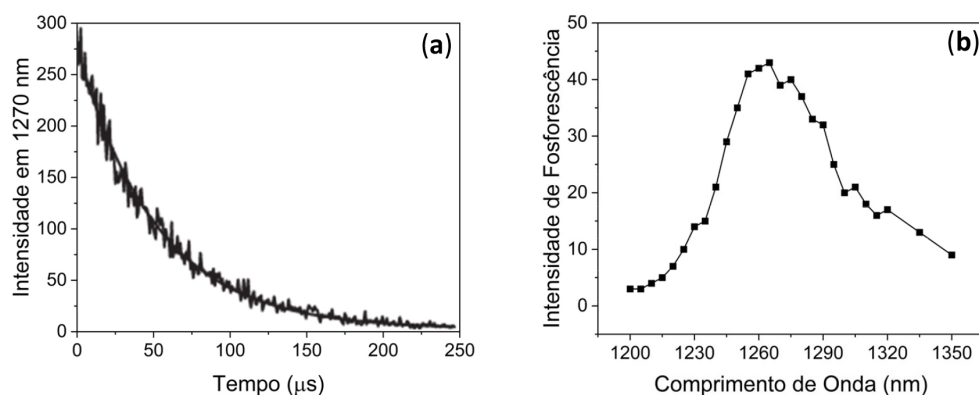


Figura 7. Perfil de decaimento cinético (a) e intensidade de emissão de fosforescência do oxigênio singleto (b) para PpIX.

Fonte: Baptista *et al.*, 2008¹⁰⁹ com modificações

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^R \times \frac{I}{I_R} \quad (9)$$

onde Φ_{Δ} é o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ para a amostra, Φ_{Δ}^R é o rendimento quântico do padrão e I e I_R são as intensidades de emissão de fosforescência de $^1\text{O}_2$ do padrão e da amostra, respectivamente.¹¹⁰

Em outras literaturas,^{109,111–113} a Equação 9 é modificada para incluir o fator relacionado ao tempo de vida do oxigênio singleto. A Equação 10 descreve o fator correspondente ao tempo de vida de $^1\text{O}_2$, enquanto a Equação 11 estabelece a relação entre as intensidades de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ e o seu tempo de vida.

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^R \times \frac{\tau_R}{\tau} \quad (10)$$

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{\tau_R}{\tau} \quad (11)$$

onde Φ_{Δ} é o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ para a amostra, Φ_{Δ}^R é o rendimento quântico do padrão e I_R e I são as intensidades de emissão de fosforescência de $^1\text{O}_2$ do padrão e da amostra, respectivamente e tempo de vida do $^1\text{O}_2$ τ_R e τ , padrão e amostra, respectivamente.

Como a vida útil de $^1\text{O}_2$ depende do meio (Tabela 3) e influencia diretamente as determinações de Φ_{Δ} , é essencial usar o mesmo solvente para a amostra e a referência ou selecionar solventes onde $^1\text{O}_2$ apresente vidas úteis semelhantes.¹⁰⁴

A produção de $^1\text{O}_2$ ocorre devido à transferência de energia de um fotossensibilizador no estado tripleto o oxigênio molecular no estado fundamental tripleto ($^3\text{O}_2$). Esse processo fotofísico é ativação por pulso curto (≤ 100 ns).¹¹⁵

Sendo assim, a detecção direta de $^1\text{O}_2$ oferece alta seletividade, pois se baseia exclusivamente em medições de fosforescência do oxigênio singleto na região do

Tabela 3. Tempo de vida para $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes¹¹⁴

Solvente	Tempo de Vida (μs)
H ₂ O	3,1
D ₂ O	68
Diclorometano	99
Acetonitrila	77,1
DMSO	5,5
Metanol	9,5

infravermelho. No entanto, o sinal de fosforescência fraco e o rendimento quântico inerentemente baixo da fosforescência de $^1\text{O}_2$ — especialmente em certos solventes — representam desafios significativos. Além disso, a técnica requer instrumentação avançada, que normalmente está disponível apenas em laboratórios especializados.¹¹⁶

2.4.2. Métodos indiretos de quantificação do $^1\text{O}_2$

Alternativamente ao método direto para monitorar a formação de $^1\text{O}_2$, métodos indiretos foram desenvolvidos com base em reações específicas de $^1\text{O}_2$ com algumas sondas químicas (Tabela 4). A detecção indireta de $^1\text{O}_2$ baseia-se no monitoramento da reação entre o oxigênio singleto e uma sonda química específica (como DPBF, ABDA ou SOSG), acompanhando-se a diminuição do sinal da sonda ou a formação de seus produtos de oxidação após a irradiação do fotossensibilizador.¹¹⁷ A variação na concentração da sonda ou de seus produtos de reação é então quantificada por espectroscopia de absorção ou fluorescência, sendo geralmente monitorada em função do tempo de irradiação.

A reação da sonda com $^1\text{O}_2$ (Figura 8), resulta em uma diminuição mensurável da absorbância por espectroscopia UV-Visível ou emissão de fluorescência. Essa alteração é proporcional à quantidade de $^1\text{O}_2$ produzida. Devido à sua simplicidade e versatilidade, esse método de detecção indireta é amplamente utilizado; no entanto, muitas sondas também apresentam reatividade com outras espécies reativas

Tabela 4. Sondas para detecção indireta de $^1\text{O}_2$

Sonda	Reação Química com $^1\text{O}_2$	Solvente	Técnica	Parâmetros Analíticos
DPBF	Formação do endoperóxido 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB)	DMF, DMSO, etanol; meio micelar	UV-Visível ($\lambda_{\text{abs}} = 410 \text{ nm}$); Emissão de fluorescência (458 - 480 nm)	Alta sensibilidade; baixa seletividade; foto instabilidade
ABDA	Formação do endoperóxido não fluorescente (ABDA- O_2)	$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	UV-Visível ($\lambda_{\text{abs}} = 375 \text{ nm}$); Emissão de fluorescência (430 nm)	Baixa sensibilidade
SOSG	Formação de derivado endoperóxido que restaura a fluorescência	H_2O	Emissão de fluorescência (395 e 496 nm)	Elevada sensibilidade e seletividade

de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), o que pode afetar a especificidade.

Dentre as sondas citadas da Tabela 4, o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) é um dos mais empregados para a detecção e quantificação de $^1\text{O}_2$.¹¹⁸⁻¹²⁰ O DPBF absorve luz em torno de 410 nm e apresenta bandas de emissão em 458 nm e 480 nm (DMF, $\lambda_{\text{exc}} = 415 \text{ nm}$).¹²¹ Sua detecção pode ser realizada por espectroscopia UV-Visível ou emissão de fluorescência. Embora a detecção baseada em fluorescência ofereça maior sensibilidade, ela também é mais suscetível a impurezas e variações microambientais.¹²¹ Ambos os métodos se baseiam na reação quantitativa do DPBF com $^1\text{O}_2$, levando à formação

de um intermediário endoperóxido,¹¹⁸ que se decompõe irreversivelmente em 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB) (Figura 8A). Essa reação interrompe o sistema π -conjugado do DPBF, causando a perda de suas propriedades de absorção e fluorescência. Consequentemente, uma diminuição na absorbância ou intensidade de fluorescência do DPBF está diretamente associada à quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada.¹²²

O procedimento experimental envolve a irradiação de uma amostra ou solução padrão com absorbância máxima de 0,3 no comprimento de onda de excitação. A reação entre DPBF e $^1\text{O}_2$ é monitorada pela medição da diminuição da absorbância ou da intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

O tratamento matemático da reação entre $^1\text{O}_2$ e a sonda pode ser realizado considerando-se uma cinética de pseudo-primeira ordem (Equação 12), sendo monitoradas as variações temporais da absorbância ou da intensidade de fluorescência.

$$\ln \frac{I_0}{I} = k_{\text{obs}} t \quad (12)$$

onde I_0 corresponde à intensidade de absorbância ou fluorescência no tempo inicial ($t = 0$), I à intensidade medida em diferentes tempos de irradiação, k_{obs} e k representam as constantes cinéticas da reação da sonda na presença do padrão e da amostra, respectivamente, e t corresponde ao tempo de irradiação.

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) é calculado utilizando-se a Equação 13,

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^R \frac{k}{k_R} \frac{I_R}{I} \frac{n^2}{n_R^2} \quad (13)$$

onde Φ_{Δ} é o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ da amostra, Φ_{Δ}^R é o rendimento quântico do padrão de referência, I_R e I correspondem às intensidades de absorção ou emissão do fotossensibilizador padrão de referência e da amostra, respectivamente. k_{obs} e k são as constantes cinéticas da reação da sonda na presença do padrão de referência e da amostra, respectivamente, enquanto n representa o índice de refração dos solventes.

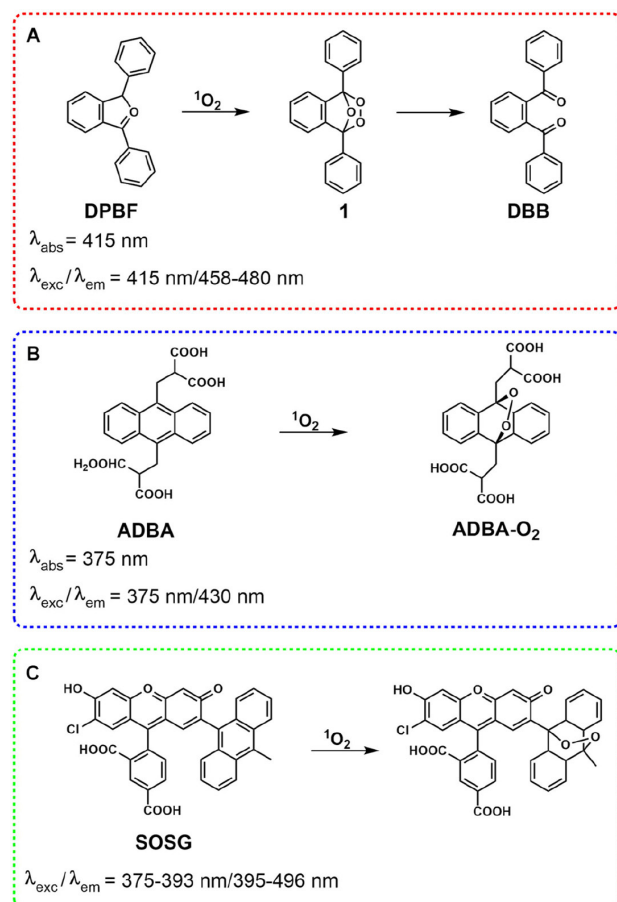


Figura 8. Reações químicas para detecção do $^1\text{O}_2$ utilizando as sondas A) DPBF, B) ABDA e C) SOSG

Apesar de seu uso generalizado, o DPBF tem especificidade limitada, pois também reage com outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNOs), incluindo hipoclorito, radicais hidroxila, ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e dióxido de nitrogênio.^{122–124} Estudos demonstraram que o DPBF reage com peroxinitrito, ânions superóxido, hipoclorito, nitrito e nitrato para formar DBB — o mesmo composto produzido em sua reação com $^1\text{O}_2$. No entanto, em reações com peróxido de hidrogênio, o principal produto é a 9-hidroxiantracen-10(9H)-ona.¹²⁴ Os limites de detecção e quantificação do peróxido de hidrogênio usando DPBF foram estabelecidos em concentrações tão baixas quanto $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, tornando-o uma sonda seletiva apenas para essa espécie entre outras EROs.

A fotoestabilidade e as propriedades de fluorescência do DPBF também foram analisadas em vários solventes.¹²² Os pesquisadores observaram uma diminuição significativa na absorbância do DPBF em soluções saturadas com ar após exposição à luz ambiente. Por exemplo, 65 mmol L^{-1} de DPBF em tetracloreto de carbono degradaram-se em 150s, enquanto 47 mmol L^{-1} de DPBF em clorofórmio necessitaram de 1500s para sofrer o mesmo grau de fotodegradação. Consequentemente, o DPBF não é adequado para uso nesses solventes devido à sua suscetibilidade à fotólise, mesmo sob fraca exposição à luz. Em contraste, soluções de DPBF em dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol não apresentaram alterações significativas na absorbância.¹²²

O DPBF é normalmente usado em solventes orgânicos devido à sua baixa solubilidade em água. No entanto, alguns estudos abordaram essa limitação empregando DPBF em soluções micelares^{125,126} ou misturas de álcool/água.¹²⁷

Semelhante ao DPBF, o método do ácido 9,10-antracenodil-bis(metileno)dimalônico (ABDA) baseia-se no desaparecimento de seu principal pico de absorção em 375 nm ou em sua emissão de fluorescência em 430 nm após a reação com $^1\text{O}_2$, formando um endoperóxido não fluorescente (ABDA- O_2) (Figura 8B).¹²⁸ Em meio aquoso, essa reação ocorre com uma constante de velocidade de $5,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em tampão fosfato/ D_2O .¹¹⁷

O ABDA oferece vantagens significativas, incluindo solubilidade em água e alta especificidade para $^1\text{O}_2$. Entretanto, em comparação com o DPBF, o ABDA apresenta reatividade muito menor, reagindo com apenas 2% do $^1\text{O}_2$ gerado em H_2O . Além disso, seu menor coeficiente de absorvidade resulta em uma resposta espectroscópica mais fraca.¹¹⁷ Estudos recentes sugerem que o ABDA também permite a detecção semiquantitativa de radicais hidroxila e sulfato, bem como de $^1\text{O}_2$, em sistemas de oxidação catalítica heterogênea baseados em persulfato, indicando seu potencial como sonda para outras espécies radicais.¹²⁹

Em 2004, a Invitrogen™ (Molecular Probes) lançou o

Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) como uma sonda fluorescente comercialmente disponível para a detecção de $^1\text{O}_2$. Ao contrário de outras sondas fluorescentes para $^1\text{O}_2$, o SOSG é altamente seletivo e apresenta a maior sensibilidade ao $^1\text{O}_2$.¹³⁰ Estruturalmente, o SOSG consiste em dois componentes principais: uma porção de captura derivada de antraceno e um fluoróforo à base de fluoresceína.¹³⁰ O SOSG é particularmente adequado para a detecção de $^1\text{O}_2$ em meio aquoso, onde inicialmente emite uma fraca fluorescência azul devido a supressão por transferência de elétrons fotoinduzida do doador de antraceno para o fluoróforo. Após a reação com $^1\text{O}_2$, forma-se um derivado endoperóxido¹³ (Figura 8C), que impede a supressão e resulta em um forte sinal de fluorescência verde em 395 e 496 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 375$ e 393 nm).¹³⁰

Como o SOSG exibe propriedades espectrais semelhantes à fluoresceína, ele é compatível com uma ampla gama de técnicas de microscopia de fluorescência e confocal.^{131,132} Lin *et al.* (2010) empregaram o SOSG para medir quantitativamente a geração de $^1\text{O}_2$ pelo HiPorfin. Observou-se uma correlação linear entre a concentração de HiPorfin e a taxa de reação inicial do SOSG, permitindo a determinação de um rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ de $0,124 \pm 0,001$, usando Rosa de Bengala como padrão de referência.¹³³ Essas descobertas destacam o SOSG como uma ferramenta valiosa para avaliar os rendimentos quânticos de $^1\text{O}_2$ em potenciais fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica (TFD).

Apesar de suas vantagens, é necessário cautela ao usar o SOSG, pois ele não é totalmente confiável sob certas condições.^{130,134,135} Golmer *et al.* relataram que, sob irradiação UV, o derivado endoperóxido do SOSG pode atuar como um fotossensibilizador (FS), gerando $^1\text{O}_2$ adicional e levando a resultados enganosos.¹³⁵ Embora o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ do próprio SOSG seja baixo ($\Phi_{\Delta} = 0,006 \pm 0,002$ sob irradiação de 355 nm em uma mistura de D_2O /metanol), ele permanece não desprezível.¹³² Além disso, o SOSG é propenso ao fotobranqueamento mesmo sob curta exposição à luz.^{130,134}

Em relação à seletividade, Nakamura *et al.* observaram um leve aumento na fluorescência do SOSG após exposição a superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila,¹³⁶ Além disso, a fluorescência do SOSG também aumenta sob irradiação de raios gama e raios X, mesmo em condições onde $^1\text{O}_2$ não é produzido.¹³⁷

2.4.2.1. Determinação de Φ_{Δ} utilizando fontes de luz policromáticas

A utilização de fontes de irradiação, como LEDs e outras fontes de luz não coerentes, associadas a sondas químicas para oxigênio singleto, representa uma alternativa mais acessível para a determinação do rendimento quântico

de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) de fotossensibilizadores, em comparação com o método direto baseado na detecção da emissão de fosforescência.

No entanto, quando são empregadas fontes de irradiação baseadas em LEDs, alguns fatores devem ser considerados devido ao caráter policromático da radiação emitida. Entre eles destacam-se o fluxo de fótons absorvido pelo fotossensibilizador, a constante de velocidade bimolecular da reação entre a sonda e o $^1\text{O}_2$, a concentração da sonda e o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ no meio.¹⁰⁹

A determinação do fluxo exato de fótons absorvido pelo fotossensibilizador não é trivial, uma vez que o LED apresenta uma banda espectral de emissão relativamente larga (Figura 9). Dessa forma, torna-se necessário calcular o número de fótons absorvidos por segundo (n_{abs}), que pode ser obtido pela Equação 14.¹³⁸

$$n_{\text{abs}} = \frac{1}{N_a h c} \int_{\lambda_2}^{\lambda_1} (1 - 10^{-A(\lambda)}) P(\lambda) d\lambda \quad (14)$$

onde N_a é o número de Avogadro, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, $P(\lambda)$ corresponde à potência espectral da luz incidente e $A(\lambda)$ representa a absorvância da amostra em função do comprimento de onda.

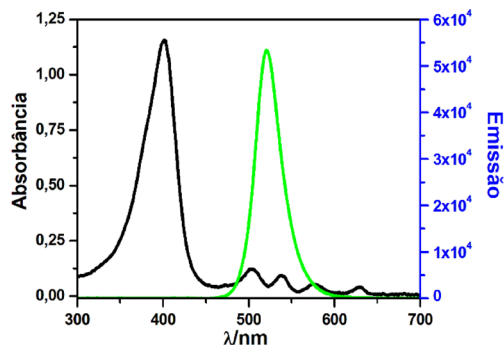


Figura 9. Espectro de absorção na região do UV-Visível da protoporfirina IX (linha preta) e perfil de emissão do LED verde (linha verde)

O rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) pode ser determinado a partir da eficiência de formação de $^1\text{O}_2$, conforme descrito na Equação 15.¹³⁸

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^R \frac{\gamma_{\Delta}}{\gamma_{\Delta}^{\text{std}}} \quad (15)$$

onde γ_{Δ} representa a eficiência de produção de $^1\text{O}_2$, definida pela Equação 16.¹³⁸

$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k}{n_{\text{abs}}} \quad (16)$$

em que k corresponde à constante cinética associada ao

consumo da sonda e n_{abs} ao número de fótons absorvidos por segundo.¹³⁸

3. Fotoestabilidade dos FS

Características como tempo de retenção adequado no organismo, excelente biocompatibilidade e fotoestabilidade são essenciais para aplicações em TFD.²²

A maioria dos fotossensibilizadores (FS) utilizados em TFD, como porfirinas, clorinas e ftalocianinas, apresenta fotoestabilidade limitada.¹³⁹ Tanto em solução quanto em ambientes biológicos, esses compostos podem sofrer modificações induzidas pela luz, levando à diminuição da absorvância inicial e da intensidade de fluorescência.^{139,140} Esse fenômeno, conhecido como fotobranqueamento, envolve a transformação química dos FS após a irradiação, resultando na formação de fotoproduto.^{139,140}

Em muitas literaturas que tratam da fotoestabilidade de fotossensibilizadores (FS), os termos fotobranqueamento e fotodegradação são frequentemente utilizados de forma sinônima.^{93,141} De acordo com o *Glossary of Terms Used in Photochemistry*, fotodegradação é definida como “a transformação fotoquímica de uma molécula em fragmentos de menor massa molecular, geralmente em um processo de oxidação”, enquanto o termo fotobranqueamento está normalmente associado ao desaparecimento de uma banda de absorção ou emissão dentro de um espectro mais amplo e não homogêneo.¹⁴² Em outras palavras, o fotobranqueamento ocorre quando um fluoróforo perde permanentemente a capacidade de emitir fluorescência devido a danos químicos induzidos por fótons, frequentemente envolvendo modificações covalentes. Durante a transição de um estado singleto excitado para um estado tripleto excitado, os fluoróforos podem interagir com outras moléculas, levando à formação de espécies quimicamente modificadas de forma irreversível.¹⁴¹

O método mais comum para avaliar a fotoestabilidade de fotossensibilizadores (FS) consiste em monitorar o decaimento dos espectros de absorvância ou fluorescência em diferentes intervalos de tempo durante a irradiação.^{139,140} De modo geral, reconhece-se que FS com maior fotoestabilidade tendem a apresentar melhor desempenho, pois podem suportar múltiplos ciclos de geração de $^1\text{O}_2$ através do mecanismo do tipo II.¹⁴³ No entanto, a alta taxa de fotobranqueamento não implica necessariamente em menor eficácia fotodinâmica. Pelo contrário, o fotobranqueamento e a fotodegradação podem favorecer mecanismos oxidativos e estar diretamente correlacionados com o efeito fotodinâmico global.^{139,140}

O fotobranqueamento ocorre predominantemente por meio de um mecanismo dependente de oxigênio, particularmente envolvendo o $^1\text{O}_2$. Nesse processo, após a

absorção de luz, o FS pode atingir o estado tripleto excitado e transferir energia ao oxigênio molecular, gerando $^1\text{O}_2$. Essa espécie altamente reativa pode então reagir com as ligações duplas do macrociclo tetrapirrólico ou com outros grupos conjugados da molécula, promovendo modificações oxidativas que levam à degradação fotoquímica do FS e, conseqüentemente, à perda de suas propriedades ópticas.¹⁴⁴ Alternativamente, alguns FS podem sofrer fotobranqueamento por mecanismos dependentes de contato, nos quais o estado excitado do FS reage diretamente com biomoléculas próximas por meio de processos de transferência de elétron ou hidrogênio, resultando na formação de espécies reativas e na subsequente degradação do fotossensibilizador.^{145,146}

Embora o fotobranqueamento seja frequentemente considerado uma limitação ao desempenho dos FS, evidências recentes sugerem que ele pode contribuir positivamente para a eficácia biológica da terapia fotodinâmica (PDT). Tasso e colaboradores (2019) observaram uma correlação positiva entre a eficiência de fotobranqueamento e a extensão do vazamento de membrana, indicando que reações localizadas mediadas por contato podem oferecer maior seletividade e precisão de dano em comparação com espécies difusíveis, como $^1\text{O}_2$ ou outras espécies reativas de oxigênio (EROs).¹⁴⁷

Assim, a compreensão dos mecanismos que governam a fotoestabilidade de diferentes FS, incluindo a taxa e a extensão da fotodegradação, é fundamental para otimizar a eficácia fotodinâmica.

4. Interação com Biomoléculas: HSA e DNA

O desenvolvimento de um fotossensibilizador (FS) “ideal” que combine geração eficiente de oxigênio singleto, fotobranqueamento mínimo e resultados terapêuticos eficazes na terapia fotodinâmica (TFD). No entanto, características fotofísicas favoráveis por si só não se traduzem necessariamente em maior eficácia na TFD.¹⁴⁸ É importante destacar que, apesar de sua alta reatividade, as

espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentam tempos de vida curtos em ambientes biológicos. Como resultado, sua capacidade de difusão através das estruturas celulares é significativamente restrita. Essa combinação de rápida reatividade e estabilidade limitada impõe restrições à distribuição espacial das EROs dentro das células.¹⁴⁰ Portanto, o FS deve se localizar nas biomoléculas-alvo ou próximo a elas dentro do ambiente celular. Essa proximidade garante que as EROs sejam geradas perto de seus alvos oxidativos pretendidos, ou que o estado tripleto excitado do FS (T_1) possa interagir diretamente com os substratos biológicos e danificá-los.

As interações entre a proteína transportadora de fármacos no plasma, albumina sérica humana (HSA) e FS – das classes de porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas – são comumente avaliadas inicialmente pela análise do perfil espectroscópico na região UV-Visível. O perfil UV-Visível de uma solução de concentração conhecida de HSA (com $\epsilon_{280\text{nm}} = 35.700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é titulado com quantidades incrementais da solução estoque de FS. Simultaneamente, as amostras preparadas para avaliação nos espectros UV-visíveis são usadas para estudar a supressão da emissão de fluorescência da HSA (sob $\lambda_{\text{exc}} = 280$ ou 295 nm) induzido pela presença dos FS.

A supressão de emissão de fluorescência pode ocorrer por meio de dois mecanismos: estático ou dinâmico (Figura 10).

No mecanismo estático, ocorre uma colisão entre o fluoróforo (HSA) e o supressor ($Q = \text{FS}$) no estado fundamental, levando à formação de um complexo não fluorescente. No mecanismo dinâmico, há uma colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado, causando a formação de um complexo não fluorescente, que então retorna ao estado fundamental, conseqüentemente sem fluorescência.¹⁵

Nos casos em que a interação entre as espécies ocorre no estado fundamental, podem ser observadas alterações nos perfis espectrais na região UV-Visível dos fotossensibilizadores (FS) na presença da HSA,

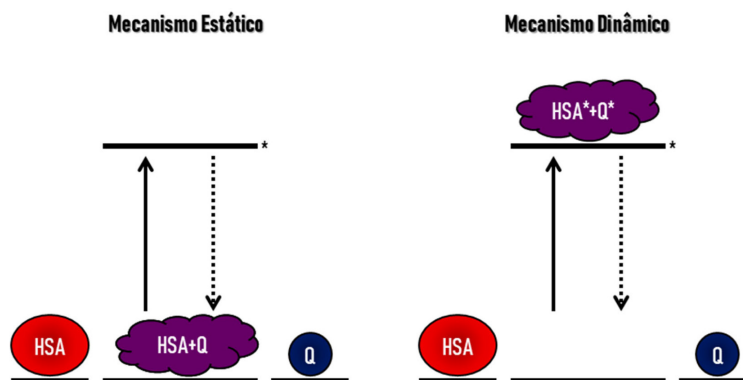


Figura 10. Mecanismos de supressão de emissão de fluorescência

quando comparados ao seu perfil original na ausência da biomolécula.¹⁴⁹ Além dos efeitos batocrômicos ou hipso-crômicos, pode haver também alargamento da banda de Soret e das bandas Q, indicando a formação de agregados ou dímeros, o que pode impactar não apenas a interação entre o FS e a proteína, mas também as características fotoquímicas e fotossensibilizantes intrínsecas dos FS.⁴⁸ Nos casos em que a interação entre as espécies ocorre exclusivamente no estado excitado, não são observadas alterações nos perfis espectrais na região UV-Visível do FS na presença de HSA.¹⁵⁰ Assim, estudos sobre a supressão da fluorescência da HSA, mais especificamente do resíduo de triptofano (Trp-214), são cruciais para a obtenção de informações importantes sobre o sistema HSA:FS. Esses estudos são geralmente realizados em diferentes temperaturas (298, 303 e 308 K) para avaliar a tendência de aumento ou diminuição das constantes calculadas posteriormente.

É importante ressaltar que, independentemente do mecanismo de interação entre as espécies – estático ou dinâmico – estudos utilizando espectroscopia na região UV-Visível e supressão de fluorescência devem ser realizados simultaneamente. Isso ocorre porque, considerando o Efeito de Filtro Interno (EFI), os valores de fluorescência observados (F_{Obs}) devem ser corrigidos e, para isso, são necessários os valores de absorvância das amostras nos comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) utilizados. Os valores de F_{Obs} podem ser corrigidos utilizando as Equações 17¹⁵ ou 18.⁴⁸

$$F_{\text{Cor}} = F_{\text{Obs}} \times 10^{\left[\frac{(A_{\lambda_{\text{exc}}} + A_{\lambda_{\text{em}}})}{2}\right]} \quad (17)$$

$$F_{\text{Cor}} = F_{\text{Obs}} \times \frac{2,3 dA_{\lambda_{\text{exc}}}}{1 - 10^{-dA_{\lambda_{\text{exc}}}}} \cdot 10^{gA_{\text{em}}} \frac{2,3 sA_{\lambda_{\text{em}}}}{1 - 10^{-sA_{\lambda_{\text{em}}}}} \quad (18)$$

onde F_{Cor} e F_{Obs} são as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente; A_{exc} e A_{em} são as absorvâncias nos comprimentos de onda de excitação e

emissão, respectivamente; d é o comprimento do caminho óptico da cubeta; g é a distância entre a borda do feixe de excitação e a borda da cubeta; e s é a espessura do feixe de excitação.

Cabe ressaltar que, devido ao EFI, os valores de F_{Obs} tendem a ser maiores que os valores corrigidos F_{Cor} . Isso ocorre porque parte da energia de excitação do fluoróforo (nesse exemplo a HSA) pode ser absorvida pela próprio FS, afetando a intensidade de fluorescência medida. Assim, a correção dos dados é necessária para representar de forma mais fiel o comportamento fluorescente do sistema. A Figura 11 apresenta a comparação entre os dados antes e após a correção pelo EFI.

Após a correção dos valores de F_{Obs} , os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) são obtidos a partir da Equação de Stern-Volmer (Equação 19),¹⁵

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}} [\text{FS}] = 1 + k_q \tau_0 [\text{FS}] \quad (19)$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência relativas da HSA na ausência e presença do FS, respectivamente; k_q é a constante de taxa de extinção bimolecular; τ_0 é o tempo de vida médio da fluorescência da HSA na ausência do FS (1×10^{-8} s); $[\text{FS}]$ é a concentração do FS; e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, resultante do produto de $k_q \tau_0$.

Em alguns casos, como relatado por Brancalion e Moseley¹⁵¹ e Franco e colaboradores,⁴⁸ o gráfico de F_0/F versus $[\text{FS}]$ pode mostrar um desvio da linearidade, indicando que no sistema HSA:FS, existem múltiplas populações de fluoróforos e apenas uma fração dessa população é acessível ao extintor (Figura 12).

Esse comportamento é observado principalmente no estudo de compostos hidrofóbicos com HSA devido ao efeito de agregação. Nestes casos, os valores de K_{SV} devem ser obtidos a partir da Equação de Stern-Volmer modificada (Equação 20),¹⁵

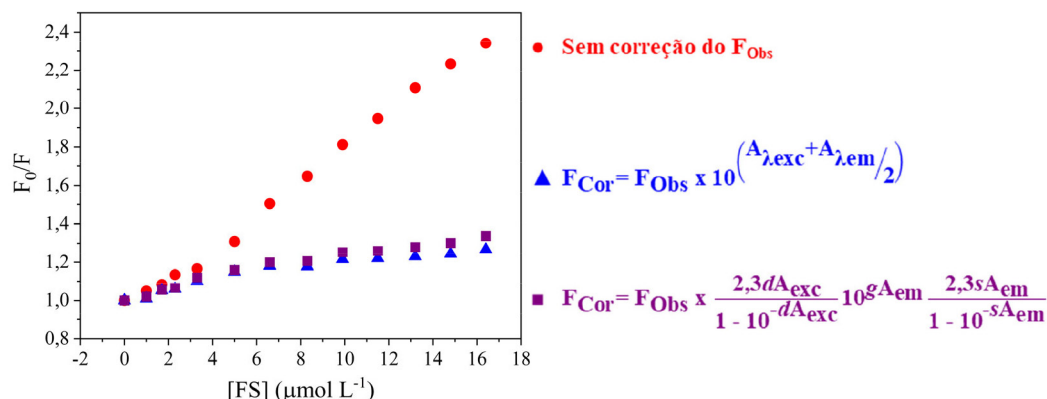


Figura 11. Gráficos de Stern-Volmer para ensaios de interações entre a HSA e FS, considerando-se diferentes tipos de correções para os valores de F_{Obs}

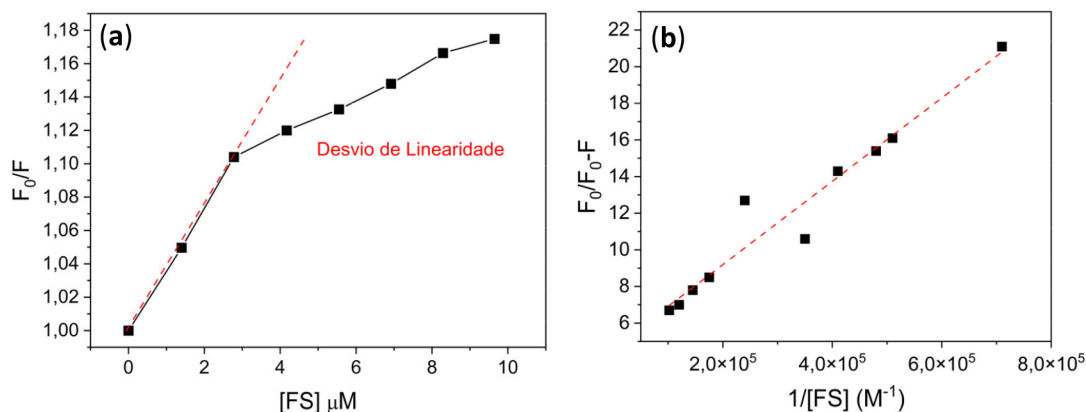


Figura 12. Gráficos de Stern–Volmer (a) e Stern–Volmer modificado (b) da HSA em presença do FS

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{[FS]f_a K_{SV}} + \frac{1}{f_a} \quad (20)$$

onde f_a é a fração de Trp-214 acessível ao FS. Os valores de f_a e K_{SV} são, respectivamente, os valores do intercepto e da inclinação do gráfico de Stern-Volmer modificado.

A tendência dos valores de K_{SV} obtidos em diferentes temperaturas indica se o mecanismo de interação entre as espécies é estático – se os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura – ou dinâmico – se esses valores aumentam. Outra maneira de distinguir os mecanismos de interação é através dos valores de k_q obtidos: se os valores forem maiores que a constante de taxa de difusão máxima da HSA, que é $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o mecanismo é estático; se forem menores, o mecanismo é dinâmico.¹⁵

No entanto, a distinção exata entre os mecanismos estáticos e dinâmicos é feita por meio da análise de fluorescência resolvida no tempo da HSA na ausência e presença de FS. Quando há interação entre duas espécies por meio do mecanismo estático, ocorre uma colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado fundamental. Nesse caso, a fração do fluoróforo que não interage com a proteína permanece inalterada e, portanto, os valores de tempo de vida da fluorescência da HSA no estado excitado, na ausência e presença do supressor, são equivalentes. Por outro lado, quando há interação entre duas espécies por meio do mecanismo dinâmico, ocorre uma colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado. Nesse caso, porém, a fração do fluoróforo que não está complexada é perturbada e, portanto, os valores de tempo de vida da fluorescência da HSA no estado excitado na presença do supressor são menores.^{151,152}

Após definir o mecanismo de interação entre as espécies, nos casos do mecanismo dinâmico, as constantes de associação (K_a) para o sistema HSA:FS são obtidas a partir do modelo de Hill (Equação 21):¹⁵

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log[FS] \quad (21)$$

onde n é a razão estequiométrica relacionada à cooperatividade entre diferentes sítios de interação.

Nos casos do mecanismo estático, as constantes de associação aparente (K_{app}) para o sistema HSA:FS são obtidas a partir do modelo de Benesi e Hildebrand (Equação 22):¹⁵³

$$\frac{1}{A_{Obs} - A_0} = \frac{1}{A_c - A_0} + \frac{1}{K_{app}(A_c - A_0)[FS]} \quad (22)$$

onde A_0 e A_{Obs} são as absorvâncias da HSA na ausência e presença de FS (a 280 nm). O coeficiente de correlação (K_{app}) é calculado dividindo-se os valores do intercepto e da inclinação do gráfico de Benesi e Hildebrand.

Os FS podem se associar ao DNA de fita dupla por meio de três mecanismos clássicos de ligação não covalente: (i) intercalação entre pares de bases GC, (ii) interação interna com o sulco menor em regiões ricas em AT, (iii) interação externa com o sulco maior em regiões ricas em AT e (iv) interação eletrostática externa (Figura 13).

Além disso, interações caracterizadas pela agregação de estruturas de FS autoempilhadas, orientadas aproximadamente perpendicularmente ao eixo helicoidal, também podem ocorrer.^{154–157}

As interações entre o DNA e as classes dependem de fatores estruturais, eletrônicos e estéricos, como a carga adotada pelos FS e seus substituintes periféricos, bem como a sequência de bases e o estado conformacional do DNA. Além disso, fatores como o centro metálico coordenado, a natureza do ligante axial, o comprimento das cadeias de carbono periféricas e a posição dos substituintes catiônicos no FS podem influenciar essas interações. As condições experimentais também podem afetar diretamente as interações observadas, incluindo a proporção FS/DNA, a força iônica e o pH do solvente.^{156,158,159}

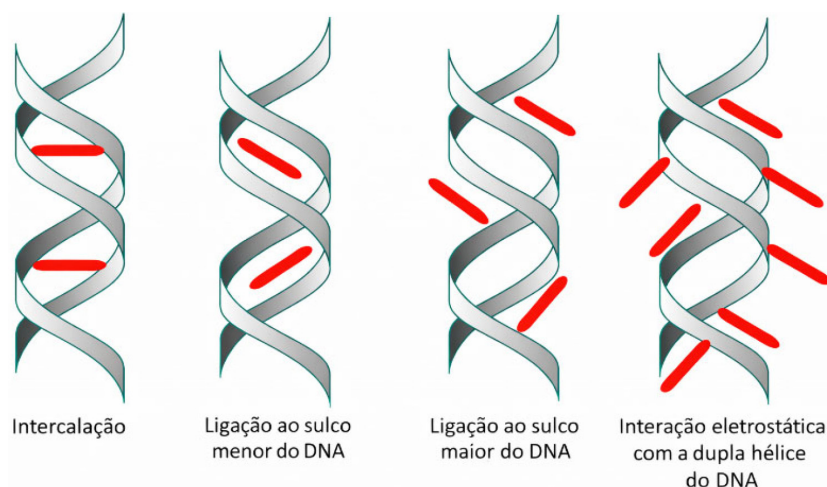


Figura 13. Representação esquemática dos diferentes modos de ligação de drogas ao DNA¹⁵¹

Os estudos iniciais sobre a interação entre FS e DNA podem ser investigados usando técnicas espectroscópicas, como UV-Visível, dicroísmo circular, temperatura de desnaturação e emissão de fluorescência de sonda de competição.^{82,159–161}

O espectro de absorção UV-Visível do DNA exibe uma banda com um máximo localizado em 260 nm. A transição eletrônica dos grupos cromóforos das porções de purina e pirimidina é responsável pela banda de absorção em 260 nm¹⁶². A literatura frequentemente emprega soluções de DNA de timo de bezerro (*ct*-DNA) ou DNA de esperma de peixe (*fs*-DNA). A absorvidade molar na banda de 260 nm, é aproximadamente 6.600 L mol⁻¹ cm⁻¹, sendo utilizada para determinar a concentração da solução de DNA.¹⁶² Além disso, a razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) é um parâmetro crucial para avaliar a qualidade do DNA, sendo que valores superiores a 1,8 indicam que o DNA mantém sua estrutura de dupla hélice e não há proteínas livres na solução. Portanto, recomenda-se o uso de soluções recém-preparadas para garantir a confiabilidade dos resultados.¹⁶³ O tampão Tris (pH 7,4) é preferencialmente utilizado no preparo dessas soluções para minimizar os efeitos de altas concentrações iônicas, comuns em tampões inorgânicos, e para facilitar a identificação de interações entre as espécies.¹⁶¹ Outra informação importante no preparo da solução tampão refere-se à força iônica da solução. A interação eletrostática deve ser afetada por condições externas, como a força iônica.¹⁶⁴ A presença de 5 mmol L⁻¹ de NaCl na solução tampão proporciona blindagem coulombiana e reduz as interações eletrostáticas entre os fármacos carregados e a estrutura polianiônica do DNA.¹⁶⁵

Considerando as propriedades espectroscópicas das classes de FS, as interações FS-DNA podem ser investigadas usando espectroscopia UV-Visível, comparando os espectros de FS na ausência e na presença de concentrações

crescentes de DNA. As interações intercalativas de FS do tipo porfirinas são caracterizadas por deslocamentos batocrômicos significativos ($\Delta\lambda \geq 15\text{ nm}$) e um efeito hipocrômico acentuado ($H = 30\text{--}50\%$) na banda de Soret. Essas alterações espectrais resultam da conjugação entre o momento dipolar das transições eletrônicas das bases do DNA e as transições $\pi\text{--}\pi^*$ de porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas. Em contraste, interações externas, como a ligação ao sulco ou interações eletrostáticas, são indicadas por deslocamentos batocrômicos menores ($\Delta\lambda \leq 8\text{ nm}$) e hipocromicidade mínima ($H \leq 10\%$), às vezes exibindo hipercromicidade.^{166–168}

Quando as estruturas dessas classes de FS são volumosas, elas tendem a se intercalar em regiões ricas em GC. No caso do *ct*-DNA, que contém aproximadamente 58% de AT e 42% de GC, uma interação bimodal é possível, onde o composto se intercala preferencialmente em regiões ricas em GC e interage externamente com regiões ricas em AT. Nesse caso, as mudanças espectrais resultarão da superposição das absorções eletrônicas das moléculas de FS intercaladas e daquelas localizadas nos sulcos do DNA.¹⁶⁹ A porcentagem de hipocromicidade pode ser determinada pela Equação 23:¹⁶⁹

$$H\% = [(\epsilon_f - \epsilon_b) / \Delta f] \times 100 \quad (23)$$

onde ϵ_f e ϵ_b são os coeficientes de absorvidade molar para as formas livre e ligada do FS, respectivamente. Além disso, a magnitude da interação entre FS e DNA pode ser interpretada com base no valor da constante de ligação (K_b), que é calculada de acordo com a Equação 23:

$$\frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_A - \epsilon_F} = \frac{[\text{DNA}]}{\epsilon_b - \epsilon_F} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_F)} \quad (24)$$

onde ϵ_A , ϵ_F e ϵ_B correspondem a $A_{\text{obs}}/[\text{FS}]$, ao coeficiente de

absortividade do FS livre e ao coeficiente de absorvidade do complexo FS:DNA. Um gráfico de $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ vs $[DNA]$ terá uma inclinação de $1/(\epsilon_B - \epsilon_F)$ e uma intersecção com o eixo y igual a $1/K_b$ ($\epsilon_B - \epsilon_F$). A constante de ligação K_b foi calculada a partir da razão entre a inclinação e a intersecção com o eixo y.¹⁶⁷ As constantes de ligação determinadas experimentalmente podem ser comparadas com valores típicos de K_b para intercaladores clássicos que exibem valores de K_b em torno de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.¹⁶³ Além disso, a comparação dos valores de K_b entre diferentes FS permite a avaliação da força de interação dentro da mesma classe de compostos.

Geralmente, a intercalação do DNA resulta em um aumento na intensidade de fluorescência do FS, enquanto interações externas podem levar a supressão da fluorescência. Isso ocorre porque a intercalação efetivamente transfere energia das bases do DNA para o FS no estado excitado (mecanismo dinâmico), o que é confirmado por uma diminuição no tempo de vida da fluorescência dos FS para 2-3 ns.¹⁷⁰ No caso de interações externas, o tempo de vida da fluorescência do composto aumenta para 11-12 ns, pois não há contato com o agente supressor da fluorescência (bases do DNA) e, quando localizado no sulco do DNA, o FS fica parcialmente protegido de outro agente supressor, como moléculas de água.^{167,168,171}

Além dessa metodologia, ensaios de ligação competitiva usando sondas fluorescentes também são propostos para elucidar o modo de interação de porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas com o DNA (Tabela 5). Por exemplo, o brometo de etídio (EtBr) é um intercalador clássico de DNA de fita dupla, e sua fluorescência pode ser usada para monitorar o deslocamento competitivo por outras moléculas. O decaimento da fluorescência do EtBr intercalado no DNA na presença de classes de FS pode ocorrer por meio do deslocamento direto do EtBr pelo composto, decaimento dinâmico ou reabsorção da luz emitida pelo EtBr. No entanto, como a densidade óptica dessas classes de FS na faixa de 600 a 700 nm é inferior a 0,1, a hipótese de reabsorção pode ser descartada.^{168,169} O laranja de acridina (AO) é outro corante intercalador para DNA que apresenta emissão de fluorescência entre 550 e 700 nm e é menos tóxico que o brometo de etídio (EtBr).

O decaimento da fluorescência do EtBr ligado ao DNA

pode ser quantificado usando a Equação de Stern-Volmer (Equação 19), permitindo a avaliação da extensão da interação entre o FS e o DNA. Neste estudo, o aumento da concentração de FS pode levar a uma diminuição na fluorescência do EtBr e a um aumento concomitante na fluorescência do FS. O aparecimento de um ponto isoemissivo na presença de DNA sugere a formação de um complexo entre os FS e o EtBr.¹⁶⁶ Esse fenômeno pode ser atribuído ao autoempilhamento dos FS ao longo da hélice do DNA, combinado com fortes interações eletrostáticas entre os grupos N-substituintes carregados positivamente na periferia dos FS e os grupos fosfato carregados negativamente do DNA. Esse processo resulta no mascaramento da fluorescência do EtBr pelo FS e na ocorrência de transferência de energia entre ambas as moléculas.¹⁶⁶

Um grande número de fotossensibilizadores se intercala no DNA ou é reconhecido seletivamente por regiões específicas do DNA, especialmente o sulco menor.

Porfirinas, ftalocianinas e fenotiazinas, devido à ausência de centros quirais, não exibem sinais intrínsecos nos espectros de dicroísmo circular (DC). No entanto, após interagirem com o DNA, esses compostos podem exibir sinais de dicroísmo circular induzido (DCI) na região de suas respectivas bandas de Soret. Esse efeito é atribuído ao acoplamento dos momentos de dipolo de transição do fotossensibilizador com as transições eletrônicas das nucleobases, que estão dispostas de forma quiral, ou a interações excitônicas entre o DNA e a porfirimina. Comparando o espectro de DC dos fotossensibilizadores na presença de diferentes concentrações de DNA, o modo de interação entre as espécies pode ser inferido com base na forma e intensidade do sinal de DCI: um espectro de DCI negativo na região de Soret é característico de intercalação, enquanto um sinal positivo indica ligação externa ao DNA. Diversos estudos relatam que a intercalação dessas classes no DNA facilita a transferência de energia das bases nitrogenadas para o composto fotoexcitado, um fenômeno evidenciado por um sinal negativo na região de Soret do espectro de CD. Por outro lado, quando os FS se ligam externamente ao DNA, o espectro de CD exibe um sinal positivo na mesma região.^{168,169}

A compreensão da interação entre o fotossensibilizador

Tabela 5. Ensaios de ligação competitiva utilizando sondas fluorescentes

Sonda	Modo de Interação	Metodologia	Ref
Brometo de etídio (EtBr)	Intercalação	Emissão fluorescência (λ_{ex} = 526 nm e λ_{em} = 605 nm)	166
Alaranja de acridina (AO)	Intercalação	Emissão fluorescência (λ_{ex} = 420 nm e λ_{em} = 520)	158
Hoechst stain	Sulco menor	Emissão fluorescência (λ_{ex} = 360 nm e λ_{em} = 460 nm)	167

(FS) e o DNA vai além dos aspectos relacionados aos danos induzidos ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (EROs).¹⁷² Muitos FS apresentam estruturas químicas aromáticas e planas, o que favorece a agregação em soluções aquosas. Esse processo de agregação reduz a capacidade do FS de gerar EROs e também pode suprimir sua fluorescência. Quando o FS interage com o DNA, especialmente por intercalação entre os pares de bases, ocorre frequentemente a desagregação dessas espécies para a forma monomérica. Essa interação restringe o movimento molecular, reduz processos de decaimento não radiativo e pode restaurar a emissão de fluorescência, além de favorecer a geração de EROs.¹⁷³

5. Conclusão

A utilização de moléculas fotossensibilizadoras em modelos biológicos é fundamental para a compreensão de seus comportamentos fotofísicos e fotoquímicos, bem como para a adequada interpretação de seus efeitos em sistemas biológicos. Nesta revisão, foram reunidos e discutidos aspectos espectroscópicos e fotofísicos relevantes de diferentes classes de fotossensibilizadores, com ênfase nas principais metodologias empregadas em sua caracterização. Em muitos casos, tais abordagens envolvem medições indiretas, o que torna essencial a escolha criteriosa de padrões de referência, bem como o controle rigoroso das condições experimentais utilizadas.

Nesse contexto, a análise crítica das metodologias disponíveis e de suas limitações torna-se indispensável para garantir maior confiabilidade na obtenção e interpretação dos dados experimentais. Além disso, a adoção de práticas metodológicas bem estabelecidas pode contribuir significativamente para o aumento da reprodutibilidade e da comparabilidade entre estudos na literatura. Assim, espera-se que esta revisão não apenas sintetize conceitos fundamentais relacionados à caracterização fotofísica de fotossensibilizadores, mas também sirva como um guia metodológico para pesquisadores da área, incentivando abordagens experimentais mais padronizadas e robustas. Dessa forma, tais contribuições podem auxiliar no desenvolvimento e na avaliação mais criteriosa de novos fotossensibilizadores, favorecendo avanços futuros nas aplicações em terapia fotodinâmica e em outras áreas da fotoquímica aplicada.

Agradecimentos

Os autores agradecem os órgãos de fomento: FAPESP (2025/09760-5), CNPq (402618/2025-4), FAPEMIG (APQ-02393-24), CNPq (407282/2023-8) e PROEX (financeiro código 001). MMC, ECSA agradecem a CAPES (código de financiamento 001) e NCB (2025/06781-1) e MVPV

(2025/02222-8) agradecem a FAPESP pelas bolsas de pós graduação.

Contribuições dos Autores

Redação do rascunho original (Mayara Martins Caetano); Redação do rascunho original (Naiara Cristina Bessas); Redação do rascunho original (Maria Vitória Pereira Vaz); Redação do rascunho original (Evelyn Christine de Souza Arantes); Redação do rascunho original (Juliana Cristina Biazotto); Redação do rascunho original (Ieda Vieira da Cunha); Conceituação, Aquisição de financiamento para análise formal, Pesquisa, Administração de projetos, Recursos e Redação-revisão e edição (Tayana Mazin Tsubone e Renata Galvão de Lima).

Referências Bibliográficas

1. Bartusik-Aebischer, D.; Woźnicki, P.; Dynarowicz, K.; Aebischer, D.; Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Brain Cancers—A Review. *Brain Sciences* **2023**, *13*, 1299. [Crossref]
2. Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z.; Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1332. [Crossref]
3. Santos, K. L. M.; Barros, R. M.; da Silva Lima, D. P.; Nunes, A. M. A.; Sato, M. R.; Faccio, R.; de Lima Damasceno, B. P. G.; Oshiro-Junior, J. A.; Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, *31*, 102032. [Crossref]
4. Sobotta, L.; Skupin-Mrugalska, P.; Piskorz, J.; Mielcarek, J.; Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *175*, 72. [Crossref]
5. Wu, W.; Shao, X.; Zhao, J.; Wu, M.; Controllable Photodynamic Therapy Implemented by Regulating Singlet Oxygen Efficiency. *Advanced Science* **2017**, *4*, 1700113. [Crossref]
6. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J.; Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61*, 250. [Crossref]
7. Machado, A. E. da H.; Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova* **2000**, *23*, 237. [Crossref]
8. Burrows, H.; Principles of Molecular Photochemistry - An Introduction. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* **2010**, *Série II*, 19. [Crossref]
9. Vara, J.; Gualdesi, M. S.; Bertolotti, S. G.; Ortiz, C. S.; Two phenothiazine dyes as photosensitizers for the production of

- singlet oxygen. Photophysics, photochemistry and effects of aggregation. *Journal of Molecular Structure* **2019**, 1181, 422. [Crossref]
10. Lima, E.; Reis, L. V.; Photodynamic Therapy: From the Basics to the Current Progress of N-Heterocyclic-Bearing Dyes as Effective Photosensitizers. *Molecules* **2023**, 28, 5092. [Crossref]
 11. Bryden, F.; Boyle, R. W.; Em *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R.; Hubbard, C. D., eds.; Academic Press: London, 2016, ch. 4. [Crossref]
 12. Liu, T. W.; Huynh, E.; MacDonald, T. D.; Zheng, G.; Em *Cancer Theranostics*; Chen, X.; Wong, S., eds.; Academic Press: London, 2014, ch. 14. [Crossref]
 13. Bächle, F.; Siemens, N.; Ziegler, T.; Glycoconjugated Phthalocyanines as Photosensitizers for PDT – Overcoming Aggregation in Solution. *European Journal of Organic Chemistry* **2019**, 2019, 7089. [Crossref]
 14. Xiong, H.; Xu, Y.; Kim, B.; Rha, H.; Zhang, B.; Li, M.; Yang, G. F.; Kim, J. S.; Photo-controllable biochemistry: Exploiting the photocages in phototherapeutic window. *Chem* **2023**, 9, 29. [Crossref]
 15. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer: New York, 2006. [Crossref]
 16. Quina, F. H.; Silva, G. T. M.; The photophysics of photosensitization: A brief overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **2021**, 7, 100042. [Crossref]
 17. Berg, K.; Nordstrand, S.; Selbo, P. K.; Tran, D. T. T.; Angell-Petersen, E.; Høgset, A.; Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2011**, 10, 1637. [Crossref]
 18. Hemdan, S. S.; The Shift in the Behavior of Methylene Blue Toward the Sensitivity of Medium: Solvatochromism, Solvent Parameters, Regression Analysis and Investigation of Cosolvent on the Acidity Constants. *Journal of Fluorescence* **2023**, 33, 2489. [Crossref].
 19. Gouterman, M.; Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1961**, 6, 138. [Crossref]
 20. Ormond, A. B.; Freeman, H. S.; Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* **2013**, 6, 817. [Crossref]
 21. Kou, J.; Dou, D.; Yang, L.; Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget* **2017**, 8, 81591. [Crossref]
 22. Lan, M.; Zhao, S.; Liu, W.; Lee, C. S.; Zhang, W.; Wang, P.; Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Advanced Healthcare Materials* **2019**, 8, 1900132. [Crossref]
 23. Zhou, C.; Liu, Y.; Zhao, X.; Effect of substituted sites and coordinated metal atoms on the absorption properties of porphyrin and phthalocyanine derivatives. *Inorganica Chimica Acta* **2015**, 425, 11. [Crossref]
 24. Mondal, D.; Bera, S.; Porphyrins and phthalocyanines: Promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, 5, 033002. [Crossref]
 25. Paul-Roth, C. O.; Simonneaux, G.; Porphyrins with fluorenyl and fluorenone pendant arms as red-light-emitting devices. *Comptes Rendus Chimie* **2006**, 9, 1277. [Crossref]
 26. Singh, G.; Chandra, S.; Unravelling the structural-property relations of porphyrinoids with respect to photo- and electrochemical activities. *Electrochemical Science Advances* **2023**, 3, e2200182. [Crossref]
 27. Luciano, M.; Brückner, C.; Modifications of porphyrins and hydroporphyrins for their solubilization in aqueous media. *Molecules* **2017**, 22, 980. [Crossref]
 28. Ribeiro, C. P. S.; Lourenço, L. M. O.; Overview of cationic phthalocyanines for effective photoinactivation of pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2021**, 48, 100422. [Crossref]
 29. Harriman, A.; Luminescence of porphyrins and metalloporphyrins. Part 1. - Zinc(II), nickel(II) and manganese(II) porphyrins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* **1980**, 76, 1978. [Crossref]
 30. Jiang, Y. B.; Sun, Z.; Self-Assembled porphyrin and macrocycle derivatives: From synthesis to function. *MRS Bulletin* **2019**, 44, 167. [Crossref]
 31. Arnaut, L. G.; Em *Advances in Inorganic Chemistry*; van Eldik, R.; Stochel, G., eds; Academic Press: Amsterdam, 2011, ch. 5. [Crossref]
 32. Yin, W. H.; Li, P. Y.; Huang, H. H.; Feng, L.; Liu, S. H.; Liu, X.; Bai, F. Q.; Porphyrin photosensitizer molecules as effective medicine candidates for photodynamic therapy: electronic structure information aided design. *RSC Advances* **2024**, 14, 29368. [Crossref]
 33. Sanchez-Sanchez, A.; Izquierdo, M. T.; Mathieu, S.; Ghanbaja, J.; Celzard, A.; Fierro, V.; Structure and electrochemical properties of carbon nanostructures derived from nickel(II) and iron(II) phthalocyanines. *Journal of Advanced Research* **2020**, 22, 85. [Crossref]
 34. Channabasavana Hundi Puttaningaiah, K. P.; Hur, J.; Opportunities and challenges of metal phthalocyanines composites in photodynamic therapy as photosensitizers: A comprehensive review. *Inorganic Chemistry Communications* **2024**, 170, 113491. [Crossref]
 35. Dumoulin, F.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T.; Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, 254, 2792. [Crossref]
 36. Ben-Hur, E.; Chan, W. S.; Em *The Porphyrin Handbook: Multiporphyrins, Multiphthalocyanines and Arrays*; Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., eds; Academic Press: San Diego, 2003, ch. 117. [Crossref]
 37. Rawling, T.; McDonagh, A.; Ruthenium phthalocyanine and naphthalocyanine complexes: Synthesis, properties and applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2007**, 251, 1128. [Crossref]

38. de Siqueira, L. B. de O.; dos Santos Matos, A. P.; da Silva, M. R. M.; Pinto, S. R.; Santos-Oliveira, R.; Ricci-Júnior, E.; Pharmaceutical nanotechnology applied to phthalocyanines for the promotion of antimicrobial photodynamic therapy: A literature review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2022**, 39, 102896. [Crossref]
39. Bunin, D. A.; Martynov, A. G.; Gvozdev, D. A.; Gorbunova, Y. G.; Phthalocyanine aggregates in the photodynamic therapy: dogmas, controversies, and future prospects. *Biophysical Reviews* **2023**, 15, 983. [Crossref]
40. Vara, J.; Gualdesi, M. S.; Aiassa, V.; Ortiz, C. S.; Evaluation of physicochemical properties and bacterial photoinactivation of phenothiazine photosensitizers. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2020**, 18, 1576. [Crossref]
41. Shen, X.; Dong, L.; He, X.; Zhao, C.; Zhang, W.; Li, X.; Lu, Y.; Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: An effective and safe treatment method. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, 32, 102051. [Crossref]
42. Barbosa, A. F. S.; Santos, I. P.; Santos, G. M. P.; Bastos, T. M.; Rocha, V. P. C.; Meira, C. S.; Soares, M. B. P.; Pitta, I. R.; Pinheiro, A. L. B.; Anti-Trypanosoma cruzi effect of the photodynamic antiparasitic chemotherapy using phenothiazine derivatives as photosensitizers. *Lasers in Medical Science* **2020**, 35, 79. [Crossref]
43. Saha, B.; Chowdhury, S.; Sanyal, D.; Chattopadhyay, K.; Suresh Kumar, G.; Comparative Study of Toluidine Blue O and Methylene Blue Binding to Lysozyme and Their Inhibitory Effects on Protein Aggregation. *ACS Omega* **2018**, 3, 2588. [Crossref]
44. Wainwright, M.; Crossley, K. B.; Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? *Journal of Chemotherapy* **2002**, 14, 431. [Crossref]
45. Paul, P.; Suresh Kumar, G.; Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B to DNA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 107, 303. [Crossref]
46. Afkhami, F.; Karimi, M.; Bahador, A.; Ahmadi, P.; Pourhajbagher, M.; Chiniforush, N.; Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with toluidine blue against *Enterococcus faecalis*: Laser vs LED. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, 32, 102036. [Crossref]
47. Myrzakhmetov, B.; Arnoux, P.; Mordon, S.; Acherar, S.; Tsoy, I.; Frochot, C.; Photophysical properties of protoporphyrin IX, pyropheophorbide-a and photofrin® in different conditions. *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 138. [Crossref]
48. Duarte, M.; Franco, S.; Joseph, T.; Jacques, W.; Lapierre, D.; Clara, A.; Martinho, C.; Cristina, N.; Martins, M.; Teixeira, T.; Emílio, M.; Galv, R.; Protoporphyrin IX conjugated to piperazine or morpholine: Photophysical properties and photodynamic activity. *Dyes and Pigments* **2025**, 236, 112649. [Crossref]
49. Taniguchi, M.; Lindsey, J. S.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Comprehensive review of photophysical parameters (ϵ , Φ_f , τ_s) of tetraphenylporphyrin (H_2TPP) and zinc tetraphenylporphyrin ($ZnTPP$) – Critical benchmark molecules in photochemistry and photosynthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2021**, 46, 100401. [Crossref]
50. Kee, H. L.; Bhaumik, J.; Diers, J. R.; Mroz, P.; Hamblin, M. R.; Bocian, D. F.; Lindsey, J. S.; Holten, D.; Photophysical characterization of imidazolium-substituted Pd(II), In(III), and Zn(II) porphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2008**, 200, 346. [Crossref]
51. Li, Y.; Solvent effects on photophysical properties of copper and zinc porphyrins. *Chinese Science Bulletin* **2008**, 53, 3615. [Crossref]
52. Aggarwal, L. P. F.; Borissevitch, I. E.; On the dynamics of the $TPPS_4$ aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2006**, 63, 227. [Crossref]
53. Varchi, G.; Benfenati, V.; Pistone, A.; Ballestri, M.; Sotgiu, G.; Guerrini, A.; Dambrosio, P.; Liscio, A.; Ventura, B.; Core-shell poly-methylmethacrylate nanoparticles as effective carriers of electrostatically loaded anionic porphyrin. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2013**, 12, 760. [Crossref]
54. Tsolekile, N.; Ncapayi, V.; Obiye, G. K.; Matoetoe, M.; Songca, S.; Oluwafemi, O. S.; Synthesis of meso-tetra-(4-sulfonatophenyl) porphyrin ($TPPS_4$) - CuInS/ZnS quantum dots conjugate as an improved photosensitizer. *International Journal of Nanomedicine* **2019**, 14, 7065. [Crossref]
55. Çelenk Kaya, E.; Ersoy, S.; Durmuş, M.; Kantekin, H.; Synthesis of fluorine-containing phthalocyanines and investigation of the photophysical and photochemical properties of the metal-free and zinc phthalocyanines. *Heterocyclic Communications* **2018**, 24, 259. [Crossref]
56. Ribeiro, C. P. S.; Lourenço, L. M. O.; Overview of cationic phthalocyanines for effective photoinactivation of pathogenic microorganisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2021**, 48, 100422. [Crossref]
57. Ogunsipe, A.; Durmuş, M.; Atilla, D.; Gürek, A. G.; Ahsen, V.; Nyokong, T.; Synthesis, photophysical and photochemical studies on long chain zinc phthalocyanine derivatives. *Synthetic Metals* **2008**, 158, 839. [Crossref]
58. Gürol, I.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T.; Synthesis, photophysical and photochemical properties of substituted zinc phthalocyanines. *Dalton Transactions* **2007**, 3782. [Crossref]
59. Yanik, H.; Aydın, D.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Peripheral and non-peripheral tetrasubstituted aluminium, gallium and indium phthalocyanines: Synthesis, photophysics and photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, 206, 18. [Crossref]
60. Chauke, V.; Ogunsipe, A.; Durmuş, M.; Nyokong, T.; Novel gallium(III) phthalocyanine derivatives – Synthesis,

- photophysics and photochemistry. *Polyhedron* **2007**, *26*, 2663. [Crossref]
61. Yanik, H.; Aydin, D.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Peripheral and non-peripheral tetrasubstituted aluminium, gallium and indium phthalocyanines: Synthesis, photophysics and photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *206*, 18. [Crossref]
 62. Korde Choudhari, S.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadbail, A. R.; Joshi, V.; Nitric oxide and cancer: A review. *World Journal of Surgical Oncology* **2013**, *11*, 118. [Crossref]
 63. Knoll, J. D.; Albani, B. A.; Turro, C.; New Ru(II) Complexes for Dual Photoreactivity: Ligand Exchange and $^1\text{O}_2$ Generation. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48*, 2280. [Crossref]
 64. Zayat, L.; Filevich, O.; Baraldo, L. M.; Etchenique, R.; Ruthenium polypyridyl phototriggers: From beginnings to perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2013**, *371*, 20120330. [Crossref]
 65. Kim, H.-B.; Kitamura, N.; Kawanishi, Y.; Tazuke, S.; Photoinduced electron transfer reactions of ruthenium(II) complexes. 2. Oxidative quenching of excited tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) by neutral organic electron acceptors. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 5757. [Crossref]
 66. Creutz, C.; Sutin, N.; Electron-transfer reactions of excited states. Reductive quenching of the tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) luminescence. *Inorganic Chemistry* **1976**, *15*, 496. [Crossref]
 67. Sauaia, M. G.; Da Silva, R. S.; The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. *Transition Metal Chemistry* **2003**, *28*, 254. [Crossref]
 68. de Lima, R. G.; Sauaia, M. G.; Bonaventura, D.; Tedesco, A. C.; Bendhack, L. M.; da Silva, R. S.; Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}]^{3+}$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorganica Chimica Acta* **2006**, *359*, 2543. [Crossref]
 69. Knoll, J. D.; Albani, B. A.; Durr, C. B.; Turro, C.; Unusually efficient pyridine photodissociation from Ru(II) complexes with sterically bulky bidentate ancillary ligands. *Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118*, 10603. [Crossref]
 70. Miranda, K. M.; Bu, X.; Lorković, I.; Ford, P. C.; Synthesis and Structural Characterization of Several Ruthenium Porphyrin Nitrosyl Complexes. *Inorganic Chemistry* **1997**, *36*, 4838. [Crossref]
 71. Renaud, J.; Ouellet, S. G.; Novel synthesis of cyclic alkenylboronates via ring-closing metathesis. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 7995. [Crossref]
 72. Cwalinski, T.; Polom, W.; Marano, L.; Roviello, G.; D'angelo, A.; Cwalina, N.; Matuszewski, M.; Roviello, F.; Jaskiewicz, J.; Polom, K.; Methylene blue—current knowledge, fluorescent properties, and its future use. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9*, 3538. [Crossref]
 73. Pahang, F.; Parvin, P.; Ghafoori-Fard, H.; Bavali, A.; Moafi, A.; Fluorescence properties of methylene blue molecules coupled with metal oxide nanoparticles. *OSA Continuum* **2020**, *3*, 688. [Crossref]
 74. Robinson-Duggon, J.; Pizarro, N.; Gunther, G.; Zúñiga-Núñez, D.; Edwards, A. M.; Greer, A.; Fuentealba, D.; Fatty Acid Conjugates of Toluidine Blue O as Amphiphilic Photosensitizers: Synthesis, Solubility, Photophysics and Photochemical Properties†. *Photochemistry and Photobiology* **2021**, *97*, 71. [Crossref]
 75. Hotta, S.; Em *Mathematical Physical Chemistry*; Hotta, S., eds; Springer: Singapore, 2023, ch. 4. [Crossref]
 76. Georgakoudi, I.; Feld, M. S.; Müller, M. G.; In Handbook of Biomedical Fluorescence; Mycek, M.-A.; Pogue, B. W., eds.; CRC Press: EUA, 2003, ch. 4. [Crossref]
 77. Gorman, S. A.; Brown, S. B.; Griffiths, J.; An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* **2006**, *25*, 79. [Crossref]
 78. Aebisher, D.; Serafin, I.; Batóg-Szczęch, K.; Dynarowicz, K.; Chodurek, E.; Kawczyk-Krupka, A.; Bartusik-Aebisher, D.; Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer—The Selection of Synthetic Photosensitizers. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 932. [Crossref]
 79. Moreno, E.; Reyes, P.; de la Ros, J. M.; Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy with LabVIEW. In *Modeling, Programming and Simulations Using LabVIEW Software*; InTech: Rijeka, **2011**, cap. 8. [Crossref]
 80. Ma, J.; Luo, F.; Hsiung, C. H.; Dai, J.; Tan, Z.; Ye, S.; Ding, L.; Shen, B.; Zhang, X.; Chemical Control of Fluorescence Lifetime towards Multiplexing Imaging. *Angewandte Chemie - International Edition* **2024**, *63*, e202403029. [Crossref]
 81. Madirov, E.; Busko, D.; Cardona, F. A.; Hudry, D.; Kuznetsov, S. V.; Konyushkin, V. A.; Nakladov, A. N.; Alexandrov, A. A.; Howard, I. A.; Richards, B. S.; Turshatov, A.; Comparison of Quantum Yield of Upconversion Nanocrystals Determined by Absolute and Relative Methods. *Advanced Photonics Research* **2023**, *4*, 2200187. [Crossref]
 82. Wilson, B.; Fernández, M. J.; Lorente, A.; Grant, K. B.; Synthesis and DNA interactions of a bis-phenothiazinium photosensitizer. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 4026. [Crossref]
 83. Syahrizal, Y. A.; Budiman, S.; Beri, D.; A budget-friendly integrating sphere for reliable quantum yield characterization of fluorescent solutions. *Next Materials* **2025**, *9*, 101057. [Crossref]
 84. Pauli, J.; Güttler, A.; Schneider, T.; Würth, C.; Resch-Genger, U.; Fluorescence Quantum Yield Standards for the UV/Visible/NIR: Development, Traceable Characterization, and Certification. *Analytical Chemistry* **2023**, *95*, 5671. [Crossref]
 85. Eaton, D. F.; Reference Materials for Fluorescence Measurement. *Pure and Applied Chemistry* **1988**, *60*, 1107. [Crossref]
 86. Demas, J. N.; Crosby, G. A.; Measurement of photoluminescence quantum yields. *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75*, 991. [Crossref]

87. Djalil, A. D.; Susanti, Erlita, F. M.; Mustafa, A. F.; Hamad, A.; Suwandri; A Comparative Study of Photobiological and Photophysical Characteristic of Meso-Tetraphenylporphyrin and Meso-Tetraphenylchlorin as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Science and Technology Indonesia* **2022**, 7, 213. [Crossref]
88. Korobkov, S. M.; Birin, K. P.; Tsivadze, A. Y.; Stationary concentration of $^1\text{O}_2$ over $^1\text{O}_2$ quantum yield: Next level of photoactivity analysis. *Dyes and Pigments* **2023**, 220, 111749. [Crossref]
89. Scholz, M.; Dédic, R.; Breitenbach, T.; Hála, J.; Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2013**, 12, 1873. [Crossref]
90. Van Leeuwen, M.; Beeby, A.; Fernandes, I.; Ashworth, S. H.; The photochemistry and photophysics of a series of alpha octa(alkyl-substituted) silicon, zinc and palladium phthalocyanines. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2014**, 13, 62. [Crossref]
91. Lever, A. B. P.; Pickens, S. R.; Minor, P. C.; Licoccia, S.; Ramaswamy, B. S.; Magnell, K.; Charge-Transfer Spectra of Metallophthalocyanines: Correlation with Electrode Potentials. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103, 6800. [Crossref]
92. Ogunsipe, A.; Nyokong, T.; Effects of substituents and solvents on the photochemical properties of zinc phthalocyanine complexes and their protonated derivatives. *Journal of Molecular Structure* **2004**, 689, 89. [Crossref]
93. Atif, M.; Zellweger, M.; Wagnières, G.; Review of the role played by the photosensitizer's photobleaching during photodynamic therapy. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2016**, 18, 338. [Crossref]
94. Ochsner, M.; Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, 39, 1. [Crossref]
95. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P.; Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry* **2017**, 86, 715. [Crossref]
96. Fujii, J.; Soma, Y.; Matsuda, Y.; Biological Action of Singlet Molecular Oxygen from the Standpoint of Cell Signaling, Injury and Death. *Molecules* **2023**, 28, 4085. [Crossref]
97. Cui, S.; Guo, X.; Wang, S.; Wei, Z.; Huang, D.; Zhang, X.; Zhu, T. C.; Huang, Z.; Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals* **2024**, 17, 1274. [Crossref]
98. Ezquerro Riega, S. D.; Lantaño, B.; Rodríguez, H. B.; Determination of relative singlet oxygen quantum yields via real-time fluorescence emission detection. *Measurement* **2026**, 269, 120709. [Crossref]
99. Jarvi, M. T.; Niedre, M. J.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C.; Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry (SOLD) for Photodynamic Therapy: Current Status, Challenges and Future Prospects. *Photochemistry and Photobiology* **2006**, 82, 1198. [Crossref]
100. Lee, S.; Vu, D. H.; Hinds, M. F.; Davis, S. J.; Liang, A.; Hasan, T.; Pulsed diode laser-based singlet oxygen monitor for photodynamic therapy: *in vivo* studies of tumor-laden rats. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, 13, 064035. [Crossref]
101. Niedre, M.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C.; Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells *In Vitro* and Tissues *In Vivo*. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, 75, 382. [Crossref]
102. Chiang, L. Y.; Padmawar, P. A.; Rogers-Haley, J. E.; So, G.; Canteenwala, T.; Thota, S.; Tan, L. S.; Pritzker, K.; Huang, Y. Y.; Sharma, S. K.; Kurup, D. B.; Hamblin, M. R.; Wilson, B.; Urbas, A.; Synthesis and characterization of highly photoresponsive fullereryl dyads with a close chromophore antenna- C_{60} contact and effective photodynamic potential. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 20, 5280. [Crossref]
103. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N.; A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, 70, 391. [Crossref]
104. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B.; Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1993**, 22, 113. [Crossref]
105. Usui, Y.; Determination of quantum yield of singlet oxygen formation by photosensitization. *Chemistry Letters* **1973**, 2, 743. [Crossref]
106. Bhaumik, J.; Weissleder, R.; McCarthy, J. R.; Synthesis and photophysical properties of sulfonamidophenyl porphyrins as models for activatable photosensitizers. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 5894. [Crossref]
107. Mulazzani, Q. G.; Sun, H.; Hoffman, M. Z.; Ford, W. E.; Rodgers, M. A. J.; Quenching of the excited states of ruthenium(II)-diimine complexes by oxygen. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98, 1145. [Crossref]
108. Rossi, L. M.; Silva, P. R.; Vono, L. L. R.; Fernandes, A. U.; Tada, D. B.; Baptista, M. S.; Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: Preparation, optical properties and singlet oxygen generation. *Langmuir* **2008**, 24, 12534. [Crossref]
109. Bonacin, J. A.; Engelmann, F. M.; Severino, D.; Toma, H. E.; Baptista, M. S.; Singlet Oxygen Quantum Yields ($\phi\Delta$) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, 20, 31. [Crossref]
110. Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Gabrielli, D. S.; Toma, H. E.; Kowaltowski, A. J.; Araki, K.; Baptista, M. S.; Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **2007**, 39, 175. [Crossref]
111. Uchoa, A. F.; Knox, P. P.; Turchiello, R.; Seifullina, N. K.; Baptista, M. S.; Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *European Biophysics Journal* **2008**, 37, 843. [Crossref]
112. Rabello, B. R.; Gerola, A. P.; Pelloso, D. S.; Tessaro, A. L.; Aparício, J. L.; Caetano, W.; Hioka, N.; Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic

- evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, 238, 53. [Crossref]
113. Arbogast, J. W.; Darmanyan, A. P.; Foote, C. S.; Rubin, Y.; Diederich, F. N.; Alvarez, M. M.; Anz, S. J.; Whetten, R. L.; Photophysical properties of C60. *Journal of Physical Chemistry* **1991**, 95, 11. [Crossref]
 114. Bonacin, J. A.; Engelmann, F. M.; Severino, D.; Toma, H. E.; Baptista, M. S.; Singlet Oxygen Quantum Yields ($\phi\Delta$) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, 20, 31. [Crossref]
 115. Vikas, V.; Yang, W.; Wilson, B. C.; Zhu, T. C.; Hadfield, R. H.; Analysis of Singlet Oxygen Luminescence Generated By Protoporphyrin IX. *Antioxidants* **2025**, 14, 176. [Crossref]
 116. Joseph, S.; Ashok Kumar, S. K.; Recent advances in the photophysical detection and delivery of singlet oxygen. *Coordination Chemistry Reviews* **2023**, 496, 215408. [Crossref]
 117. Entradas, T.; Waldron, S.; Volk, M.; The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2020**, 204, 111787. [Crossref]
 118. Krieg, M.; Determination of singlet oxygen quantum yields with 1,3-diphenylisobenzofuran in model membrane systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1993**, 27, 143. [Crossref]
 119. Martins, T. J.; Negri, L. B.; Pernomian, L.; Faial, K. do C. F.; Xue, C.; Akhimie, R. N.; Hamblin, M. R.; Turro, C.; da Silva, R. S.; The Influence of Some Axial Ligands on Ruthenium–Phthalocyanine Complexes: Chemical, Photochemical, and Photobiological Properties. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, 7, 595830. [Crossref]
 120. Negri, L. B.; Martins, T. J.; da Silva Gobo, N. R.; de Oliveira, K. T.; Hamblin, M. R.; da Silva, R. S.; Design, synthesis and photobiological activity of novel ruthenium phthalocyanine complexes. *Inorganic Chemistry Communications* **2019**, 99, 60. [Crossref]
 121. Zhang, X. F.; Li, X.; The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence* **2011**, 131, 2263. [Crossref]
 122. Carloni, P.; Damiani, E.; Greci, L.; Stipa, P.; Tanfani, F.; Tartaglini, E.; Wozniak, M.; On the use of 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF). Reactions with carbon and oxygen centered radicals in model and natural systems. *Research on Chemical Intermediates* **1993**, 19, 395. [Crossref]
 123. Ohyashiki, T.; Nunomura, M.; Katoh, T.; Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1999**, 1421, 131. [Crossref]
 124. Żamojć, K.; Jacewicz, D.; Zdrowowicz, M.; Chmurzyński, L.; Kinetics of the reaction between 1,3-diphenylisobenzofuran and nitrogen dioxide studied by steady-state fluorescence. *Research on Chemical Intermediates* **2013**, 39, 3023. [Crossref]
 125. Gorman, A. A.; Lovering, G.; Rodgers, M. A. J.; The Photosensitized Formation and Reaction of Singlet Oxygen, $O_2^*(1\delta)$, in Aqueous Micellar Systems. *Photochemistry and Photobiology* **1976**, 23, 399. [Crossref]
 126. Usui, Y.; Tsukada, M.; Nakamura, H.; Kinetic Studies of Photosensitized Oxygenation by Singlet Oxygen in Aqueous Micellar Solutions. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1978**, 51, 379. [Crossref]
 127. Chadwick, S. J.; Salah, D.; Livesey, P. M.; Brust, M.; Volk, M.; Singlet oxygen generation by laser irradiation of gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, 120, 10647. [Crossref]
 128. Felip-León, C.; Puche, M.; Miravet, J. F.; Galindo, F.; Feliz, M.; A spectroscopic study to assess the photogeneration of singlet oxygen by graphene oxide. *Materials Letters* **2019**, 251, 45. [Crossref]
 129. Zhang, Y. J.; Chen, J. J.; Yu, H. Q.; Semi-quantitative probing of reactive oxygen species in persulfate-based heterogeneous catalytic oxidation systems for elucidating the reaction mechanism. *Chemical Engineering Journal* **2022**, 446, 137237. [Crossref]
 130. Kim, S.; Fujitsuka, M.; Majima, T.; Photochemistry of singlet oxygen sensor green. *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 117, 13985. [Crossref]
 131. Rehman, A. U.; Szabó, M.; Deák, Z.; Sass, L.; Larkum, A.; Ralph, P.; Vass, I.; Symbiodinium sp. cells produce light-induced intra- and extracellular singlet oxygen, which mediates photodamage of the photosynthetic apparatus and has the potential to interact with the animal host in coral symbiosis. *New Phytologist* **2016**, 212, 472. [Crossref]
 132. Prasad, A.; Sedlářová, M.; Pospíšil, P.; Singlet oxygen imaging using fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green in photosynthetic organisms. *Scientific Reports* **2018**, 8, 13685. [Crossref]
 133. Lin, H.; Shen, Y.; Chen, D.; Lin, L.; Li, B.; Xie, S.; *Resumos da Photonics Asia 2010*, Beijing, China, 2010. [Crossref]
 134. Ragàs, X.; Jiménez-Banzo, A.; Sánchez-García, D.; Batllori, X.; Nonell, S.; Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green®. *Chemical Communications* **2009**, 2009, 2920. [Crossref]
 135. Gollmer, A.; Arnbjerg, J.; Blaikie, F. H.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Daasbjerg, K.; Glasius, M.; Ogilby, P. R.; Singlet oxygen sensor green®: Photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochemistry and Photobiology* **2011**, 87, 671. [Crossref]
 136. Nakamura, K.; Ishiyama, K.; Ikai, H.; Kanno, T.; Sasaki, K.; Niwano, Y.; Kohno, M.; Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2011**, 49, 87. [Crossref]
 137. Liu, H.; Carter, P. J. H.; Laan, A. C.; Eelkema, R.; Denkova, A. G.; Singlet Oxygen Sensor Green is not a Suitable Probe for $^1O_2$ in the Presence of Ionizing Radiation. *Scientific Reports* **2019**, 9, 8393. [Crossref]

138. Lopes, J. M. S.; Costa, S. N.; Silveira-Alves, E.; Batista, A. A.; Dinelli, L. R.; Gonçalves, P. J.; Araújo, P. T.; Barbosa Neto, N. M.; Singlet Oxygen Generation and Spectroscopic Properties of Supramolecular Zinc *Meso*-tetra(4-pyridyl) Porphyrin Bearing Outlying Ruthenium Groups. *Brazilian Journal of Physics* **2022**, 52, 164. [Crossref]
139. Ferreira, J.; Menezes, P. F. C.; Sibata, C. H.; Allison, R. R.; Zucoloto, S.; Castro e Silva, O.; Bagnato, V. S.; Can efficiency of the photosensitizer be predicted by its photostability in solution? *Laser Physics* **2009**, 19, 1932. [Crossref]
140. Ferreira, J.; Menezes, P. F. C.; Kurachi, C.; Sibata, C.; Allison, R. R.; Bagnato, V. S.; Photostability of different chlorine photosensitizers. *Laser Physics Letters* **2008**, 5, 156. [Crossref]
141. Sánchez, V.; Garcia, M. R.; Requena, M. B.; Romano, R. A.; de Boni, L.; Guimarães, F. E. G.; Pratavieira, S.; Theoretical and Experimental Analysis of Protoporphyrin IX Photodegradation Using Multi-Wavelength Light Sources. *Photochemistry and Photobiology* **2020**, 96, 1208. [Crossref]
142. Braslavsky, S. E.; Glossary of terms used in photochemistry 3rd edition. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, 79, 293. [Crossref]
143. Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.; Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A. H.; Vignoni, M.; Yoshimura, T. M.; Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochemistry and Photobiology* **2017**, 93, 912. [Crossref]
144. Bonnett, R.; Martínez, G.; Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9513. [Crossref]
145. Song, L.; Varma, C. A. G. O.; Verhoeven, J. W.; Tanke, H. J.; Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophysical Journal* **1996**, 70, 2959. [Crossref]
146. Baptista, M. S.; Indig, G. L.; Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102, 4678. [Crossref]
147. Tasso, T. T.; Schlothauer, J. C.; Junqueira, H. C.; Matias, T. A.; Araki, K.; Liandra-Salvador, É.; Antonio, F. C. T.; Homem-De-Mello, P.; Baptista, M. S.; Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrine Photosensitizers. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, 141, 15547. [Crossref]
148. Tsubone, T. M.; Baptista, M. S.; Itri, R.; Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. *Biophysical Chemistry* **2019**, 254, 106263. [Crossref]
149. Chaves, O. A.; dos Santos Oliveira, C. H. C.; Cesarin-Sobrinho, D.; Costa, T.; da Hora Machado, A. E.; de Souza Dias Silva, T.; Velez, A. S. M. M.; Decote-Ricardo, D.; de Lima, M. E. F.; Serpa, C.; Netto-Ferreira, J. C.; Studies on the toxic effects of three regioisomeric methoxylated xanthenes against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and their binding with human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2025**, 323, 147020. [Crossref]
150. Costa-Tuna, A.; Chaves, O. A.; Loureiro, R. J. S.; Pinto, S.; Pina, J.; Serpa, C.; Interaction between a water-soluble anionic porphyrin and human serum albumin unexpectedly stimulates the aggregation of the photosensitizer at the surface of the albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2024**, 255, 128210. [Crossref]
151. Hu, J.; Hernandez Soraiz, E.; Johnson, C. N.; Demeler, B.; Brancalion, L.; Novel combinations of experimental and computational analysis tested on the binding of metalloprotoporphyrins to albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, 134, 445. [Crossref]
152. Sen, S.; Sett, R.; Paul, B. K.; Guchhait, N.; Interaction of phenazinium-based photosensitizers with the 'N' and 'B' isoforms of human serum albumin: Effect of methyl substitution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, 174, 217. [Crossref]
153. Exner, O.; Calculating equilibrium constants from spectral data: Reliability of the Benesi-Hildebrand method and its modifications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1997**, 39, 85. [Crossref]
154. Hirakawa, K.; Katayama, A.; Yamaoka, S.; Ikeue, T.; Okazaki, S.; Photosensitized protein damage by water-soluble phthalocyanine zinc(II) and gallium(III) complexes through electron transfer and singlet oxygen production. *Chemical Physics Letters* **2022**, 802, 139764. [Crossref]
155. Bağda, E.; Bağda, E.; The recent studies about the interaction of phthalocyanines with DNA. *Turkish Journal of Analytical Chemistry* **2021**, 3, 9. [Crossref]
156. Mathew, D.; Sujatha, S.; Interactions of porphyrins with DNA: A review focusing recent advances in chemical modifications on porphyrins as artificial nucleases. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2021**, 219, 111434. [Crossref]
157. de Mol, N. J.; Maanders, J. P. A. C. M.; Non-covalent binding of some phenothiazine drugs to DNA. *International Journal of Pharmaceutics* **1983**, 16, 153. [Crossref]
158. Pasternack, R. F.; Garrity, P.; Ehrlich, B.; Davis, C. B.; Gibbs, E. J.; Orloff, G.; Giartosio, A.; Turano, C.; The influence of ionic strength on the binding of a water soluble porphyrin to nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **1986**, 14, 5919. [Crossref]
159. Aleeshah, R.; Zabihollahzadeh Samakoosh, S.; Eslami, A.; Spectroscopic, thermodynamic and molecular docking studies on the interaction of two water-soluble asymmetric cationic porphyrins with calf thymus DNA. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2019**, 16, 1327. [Crossref]
160. Gangemi, C. M. A.; D'Agostino, B.; Randazzo, R.; Gaeta, M.; Fragalà, M. E.; Purrello, R.; D'Urso, A.; Interaction of spermine derivative porphyrin with DNA. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2018**, 22, 581. [Crossref]
161. González-Ruiz, V.; Olives, A. I.; Martín, M. A.; Ribelles, P.; Ramos, M. T.; Menéndez, J. C.; Em *Biomedical Engineering*,

- Trends, Research and Technologies*; Olsztynska, S.; Komorowska, M., eds; InTech: Rijeka, 2011, ch. 3. [Crossref]
162. Govoni, S.; Drug-DNA interaction protocols. *European Journal of Histochemistry* **2010**, *54*, 83. [Crossref]
 163. Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A.; Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2013**, *124*, 1. [Crossref]
 164. Amado, A. M.; Pazin, W. M.; Ito, A. S.; Kuzmin, V. A.; Borissevitch, I. E.; Acridine orange interaction with DNA: Effect of ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2017**, *1861*, 900. [Crossref]
 165. Da Silva, C. F. N.; Chrispim, P. B. H.; Possato, B.; Portapilla, G. B.; Rohrabough, T. N.; Ramos, L. C. B.; Santana Da Silva, R.; De Albuquerque, S.; Turro, C.; Nikolaou, S.; Anticancer and antitrypanosomal activities of trinuclear ruthenium compounds with orthometalated phenazine ligands. *Dalton Transactions* **2020**, *49*, 16440. [Crossref]
 166. Kang, J.; Wu, H.; Lu, X.; Wang, Y.; Zhou, L.; Study on the interaction of new water-soluble porphyrin with DNA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2005**, *61*, 2041. [Crossref]
 167. López Zeballos, N. C.; Gauna, G. A.; García Vior, M. C.; Awruch, J.; Dico, L. E.; Interaction of cationic phthalocyanines with DNA. Importance of the structure of the substituents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, *136*, 29. [Crossref]
 168. Kumar, M.; Kaushik, M.; Chaudhary, S.; Kukreti, S.; Spectroscopic Studies of the Binding Interactions of Phenothiazinium Dyes (Thionine Acetate, Azure A and Azure B) with Calf-thymus DNA. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology* **2016**, *7*, 1000214. [Crossref]
 169. Lebedeva, N. S.; Yurina, E. S.; Porphyrins as Polyfunctional Ligands for Binding to DNA. Prospects for Application (A Review). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2024**, *50*, 2567. [Crossref]
 170. Kolbeck, P. J.; Vanderlinden, W.; Nicolaus, T.; Gebhardt, C.; Cordes, T.; Lipfert, J.; Intercalative DNA binding governs fluorescence enhancement of SYBR Gold. *bioRxiv* **2020**. [Crossref]
 171. Lebedeva, N. S.; Yurina, E. S.; Gubarev, Y. A.; Syrbu, S. A.; Interactions of tetracationic porphyrins with DNA and their effects on DNA cleavage. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, *199*, 235. [Crossref]
 172. Martin, M. T.; Bessas, N. C.; Llonet, C. A. P.; Sgro, G. G.; da Silva, R. S.; Dual HSA and DNA affinity of a free-base porphyrin nitro-ruthenium(II) complex: Spectroscopic evaluation and photocleavage studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2026**, *278*, 113239. [Crossref]
 173. Fudickar, W.; Bauch, M.; Ihmels, H.; Linker, T.; DNA-Triggered Enhancement of Singlet Oxygen Production by Pyridinium Alkynylanthracenes. *Chemistry - A European Journal* **2021**, *27*, 13591. [Crossref]