

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Gustavo Wander Streit

**PORFIRINAS E PORFIRAZINAS DE ZINCO HIDROSSOLÚVEIS: SÍNTESE E
ATIVIDADE FOTODINÂMICA**

Belo Horizonte
2021

UFMG/ICEx/DQ. 1.487

D. 808

Gustavo Wander Streit

**PORFIRINAS E PORFIRAZINAS DE ZINCO HIDROSSOLÚVEIS: SÍNTESE E
ATIVIDADE FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gilson de Freitas Silva

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Teixeira Tasso

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

S914p Streit, Gustavo Wander.
2022 Porfirinas e porfirazinas de zinco hidrossolúveis
D [manuscrito] : síntese e atividade fotodinâmica /
Gustavo Wander Streit. 2022.
[xiv], 86 f.: il., gráfs., tabs.

Orientador: Gilson de Freitas Silva.
Coorientador: Thiago Teixeira Tasso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses. 2. Câncer -
Fotoquimioterapia - Teses. 3. Porfirina e compostos de
porfirina - Teses. 4. Oxigênio - Teses. 5. Testes
biológicos - Teses. 6. Espectrometria de massa -
Teses. 7. Ressonância magnética nuclear - Teses. 8.
Espectroscopia de ultravioleta - Teses. 9.
Espectroscopia visível - Teses. 10. Compostos de zinco
- Teses. I. Silva, Gilson de Freitas, Orientador. II.
Tasso, Thiago Teixeira, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

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



"Porfirinas e Porfirazinas de Zinco Hidrossolúveis: Síntese e Atividade Fotodinâmica"

Gustavo Wander Streit

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Gilson de Freitas Silva - Orientador
UFMG

Prof. Thiago Teixeira Tasso - Coorientador
UFMG

Profa. Letícia Regina de Souza Teixeira
UFMG

Profa. Tayana Mazin Tsubone
UFU

Belo Horizonte, 08 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Gilson de Freitas Silva, Presidente de comissão**, em 08/03/2022, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Teixeira Tasso, Professor do Magistério Superior**, em 08/03/2022, às 20:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tayana Mazin Tsubone, Usuária Externa**, em 09/03/2022, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Letícia Regina de Souza Teixeira, Professora do Magistério Superior**, em 18/03/2022, às 20:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1289953** e o código CRC **7E3864F2**.



AGRADECIMENTOS

Mãe, sei que não foi fácil pra você ver o filho ir para tão longe, me ver apenas uma vez ao ano ao invés de todas as manhãs. Obrigado por todos os dias me dar bom dia e desejar um bom trabalho, por ter me dado todo suporte para chegar até aqui, sem você eu não conseguiria.

Pai, desde pequeno você ficou repetindo “estuda meu filho, estuda porque a caneta é mais leve que a enxada”. Acho que de tanto repetir isso deu certo, obrigado por ter me dado todo suporte para chegar até aqui.

Patrícia, eu tirei a sorte grande de encontrar você. Aconteceu tudo tão rápido, estávamos em Joinville namorando há pouco tempo, de repente estamos aqui em BH planejando nosso futuro e caminhada científica juntos. Obrigado por estar ao meu lado todos os dias me apoiando e sempre me mostrando que eu posso fazer cada vez mais.

Professores Gilson e Thiago, existe um termo carinhoso criado pelos alunos que é “Pai científico”, acho que ele define bem o que vocês foram para mim nesse mestrado. Obrigado por todos ensinamentos, risadas e suporte que me deram. Vocês são orientadores excepcionais e desejo que todos alunos de pós-graduação encontrem pessoas como vocês!

Professora Heveline, obrigado pela parceria nos estudos biológicos, por me tratar como um aluno seu na hora de fazer os experimentos, me ensinando cada detalhe, aprendi muita coisa com você nesse pouco tempo.

A todos do laboratório em que faço parte, a convivência sempre harmoniosa e feliz é fundamental para que o trabalho vá pra a frente e vocês sempre me proporcionaram isso. Além disso, posso dizer que a hora do cafezinho é sempre melhor quando além dos já citados Patrícia, Gilson e Thiago, estão presentes **Alexandre, Aline, Nathany, Keren** e **Profª Dayse**, que pra mim não são colegas de trabalho, e sim amigos para a vida toda!

Aos técnicos e funcionários do departamento de química, por sempre estarem dispostos a nos ajudar no que foi preciso.

À FAPEMIG por ter me proporcionado uma bolsa durante todo o mestrado e aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

À banca examinadora pelas sugestões e contribuições que dela virão.

Na ciência, nunca diga que deu errado, apenas não saiu como você esperava. Refita e ache um jeito de contornar a situação. Você é capaz de fazer tudo, desde que você acredite nisso!

RESUMO

A Terapia fotodinâmica é um procedimento terapêutico que vem ganhando bastante atenção nos últimos anos, devido ao grande potencial apresentado para o tratamento de diversos tipos de câncer, com baixo custo de operação e efeitos adversos mais brandos. Esse procedimento envolve um fotossensibilizador, que quando exposto a uma radiação eletromagnética, pode resultar em fenômenos que ocasionam a morte de células cancerosas. Algumas porfirinas e porfirazinas apresentam características desejadas para um fotossensibilizador, como por exemplo, alta absorção na região de 600 a 800 nm, caráter anfifílico, produção de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, entre outras. Assim, estudar as propriedades fotofísicas e biológicas desses compostos é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Dessa forma, sintetizou-se porfirinas e porfirazinas catiônicas de zinco(II) com o substituinte 3-etilpiridil, sendo os intermediários e compostos de interesse $(H_2T3EPyP)Cl_4$, $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$, caracterizados por espectroscopia de absorção na região ultravioleta e visível e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$, $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ e o intermediário $H_2(3Py)_8Pz$ são compostos inéditos. As porfirinas também foram caracterizadas por análise elementar, térmica e espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). Os estudos fotofísicos dos compostos de interesse envolveram a quantificação do rendimento quântico de fluorescência em água, sendo que todos apresentaram valores abaixo de 0,1. A quantificação do rendimento quântico de oxigênio singlete foi realizada por meio do desenvolvimento de um sistema de irradiação e uma metodologia para a aplicação nos compostos, que foi validada utilizando rosa de bengala e azul de metileno como padrões. As porfirinas apresentaram produção de oxigênio singlete em água de 0,16 para a $H_2T3EPyP)Cl_4$ e de 0,41 para a $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$, em acetonitrila de 0,85 para a $H_2T3EPyP)Cl_4$ e de 0,90 para a $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$. As porfirazinas apresentam valores <0,01 em água e em acetonitrila apresentou o valor de 0,16 para a $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e de 0,20 para a $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$. Portanto, verificou-se que as porfirinas tem uma produção de oxigênio singlete maior que as porfirazinas e que os compostos contendo zinco apresentam uma produção maior que a sua respectiva base livre. Os estudos biológicos mostraram que os compostos apresentam baixa incorporação celular nas células melanoma não-metastáticas (B16F1), não apresentam toxicidade no escuro, e apenas a $[Zn(3EPyP)]Cl_4$ apresentou fototoxicidade com IC_{50} de 7,8 μM quando irradiado na faixa de 620 a 630 nm.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Câncer, Porphirinas, Porfirazinas, Oxigênio singlete.

ABSTRACT

Photodynamic therapy is a therapeutic procedure that has gained a lot of attention in recent years, due to the great potential presented for the treatment of various types of cancer, with low operating costs and milder adverse effects. This procedure involves a photosensitizer, which when exposed to electromagnetic radiation, can result in phenomena that cause the death of cancer cells. Some porphyrins and porphyrazines have characteristics desired for a photosensitizer, such as high absorption in the region of 600 to 800 nm, amphiphilic character, production of reactive oxygen species, such as singlet oxygen, among others. Thus, studying the photophysical and biological properties of these compounds is essential for the development of new drugs. In this way, cationic zinc(II) porphyrins and porphyrazines with the 3-ethylpyridyl substituent were synthesized, with the intermediates and compounds of interest being $(\text{H}_2\text{T3EPyP})\text{Cl}_4$, $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$, $\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{PzCl}_8$ e $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$, characterized by absorption spectroscopy in the ultraviolet and visible region and by hydrogen nuclear magnetic resonance. $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$, $\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{PzCl}_8$, e $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ and the intermediate $\text{H}_2(\text{3Py})_8\text{Pz}$ are unpublished compounds. Porphyrins were also characterized by elemental, thermal and mass spectrometry analysis (MALDI-TOF MS). The photophysical studies of the compounds of interest involved the quantification of the quantum yield of fluorescence in water, all of which presented values below 0.1. The quantification of the singlet oxygen quantum yield was performed through the development of an irradiation system and a methodology for application in the compounds, which was validated using rose bengal and methylene blue as standards. Porphyrins presented singlet oxygen production in water of 0.16 for $\text{H}_2\text{T3EPyP}\text{Cl}_4$ and 0.41 for $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$, in acetonitrile of 0.85 for $\text{H}_2\text{T3EPyP}\text{Cl}_4$ and 0.90 for $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$. Porphyrazines present values <0.01 in water and in acetonitrile it presented values of 0.16 for $\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{PzCl}_8$ and 0.20 for $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$. Therefore, it was found that porphyrins have a higher production of singlet oxygen than porphyrazines and that compounds containing zinc have a higher production than their respective free base. Biological studies showed that the compounds show low cellular incorporation in non-metastatic melanoma cells (B16F1), do not show toxicity in the dark, and only $[\text{Zn}(\text{3EPyP})]\text{Cl}_4$ showed phototoxicity with an IC_{50} of 7.8 μM when irradiated in the range from 620 to 630 nm.

Keywords: Photodynamic therapy, Cancer, Porphyrins, Porphyrazines, Singlet oxygen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Princípios clínicos da TFD. A: Aplicação do FS; B: Distribuição do FS; C: Acúmulo do FS no tumor; D: Irradiação na região tumoral.	21
Figura 2 - Representação do Diagrama de Jablonski para a produção de oxigênio singlete. A: Excitação; B/F: Conversão interna; C: Fluorescência; D/H: Decaimento não-radiativo E: Cruzamento intersistema; G: Fosforescência. ^{15,25}	22
Figura 3 - Representação do diagrama simplificado de orbitais moleculares da molécula de oxigênio no estado fundamental (3O_2) e nos seus estados excitados (1O_2), segundo a Teoria dos Orbitais Moleculares. $^1\Sigma_g^+$: Configuração de mais alta energia do 1O_2 ; $^1\Delta_g$: configuração mais estável do 1O_2 ; $^3\Sigma_g^-$: configuração do oxigênio molecular. ²⁶	24
Figura 4 - Estrutura do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) e ácido 9,10-antracenediil-bismetilenodimalônico (ABDA).....	25
Figura 5 - Penetração da radiação eletromagnética no tecido de acordo com a região do visível. Adaptado de Agostinis (2011). ¹⁵	26
Figura 6 –Estrutura química de porfirina (A) e metaloporfirina (B).....	28
Figura 7 – Estrutura dos isômeros das porfirinas com o substituinte piridil.	29
Figura 8 - Estrutura química de porfirazina (A) e metaloporfirazina (B).	30
Figura 9 - Sistema usado para a obtenção da dinitrila.	39
Figura 10 - Sistema de irradiação para experimentos de Φ_{Δ} , 1: Caixa de madeira; 2: chapa de aquecimento; 3: aparato para bloqueio do laser; 4: laser de irradiação.	43
Figura 11 - Esquema da reação de obtenção da porfirina $H_2T3EPyPCL_4$. p-TSE: p-toluenossulfonato de etila; TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.	46
Figura 12 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para H_2T3PyP ($4,55 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em clorofórmio e para $H_2T3EPyPCL_4$ ($3,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em água.	47
Figura 13- Espectro de RMN 1H da $H_2T3EPyPCL_4$ obtido em D_2O a 25 °C. δ 9,89 (s, 4 H, H ₂ -piridil), δ 9,40 (s, 8 H, H ₄ -piridil e H ₆ -piridil), δ 9,19 e δ 9,00 (m, 8 H, β -pirrólico), δ 8,56 (s, 4 H, H ₅ -piridil), δ 4,98 (s, 8 H, CH ₂ etil), δ 1,86 (t, 12 H, J: 6,6 H, CH ₃ etil).	48

Figura 14 - Espectro de massas da $H_2T3EPyPCL_4$ obtido por meio da técnica de MALDI-TOF MS. Matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, preparada em MeCN/TFA (1%).	49
Figura 15 - Fragmentos da $H_2T3EPyPCL_4$ com massas semelhantes e suas respectivas simulações feitas no software ChemCalc (disponível em http://www.chemcalc.org/).	49
Figura 16 - Análise de decomposição termogravimétrica da $H_2TEPyPCL_4$ em cadinho de alumina, sob atmosfera de ar sintético e razão de aquecimento de 10 °C por minuto.....	50
Figura 17 - Esquema da reação de obtenção da metaloporfirina $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$. TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.....	50
Figura 18 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para a $H_2T3EPyPCL_4$ ($3,87 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}) e $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ ($3,48 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}) em água.....	51
Figura 19 - Espectro de RMN 1H da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ obtido em D_2O a 25 °C. δ 9,82 (s, 4 H, H_2 -piridil), δ 9,35 (s, 8 H, H_4 -piridil e H_6 -piridil), δ 9,03 (s, 8 H, β -pirrólico), δ 8,51 (s, 4 H, H_5 -piridil), δ 4,97 (s, 8 H, CH_2 etil), δ 1,88 (s, 12 H, CH_3 etil).....	52
Figura 20 - Espectro de massas da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ obtido por meio da técnica MALDI-TOF MS. Matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, preparada em MeCN/TFA (1%).	53
Figura 21 - Análise de decomposição termogravimétrica da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ em cadinho de alumina, sob atmosfera de ar sintético e razão de aquecimento de 10 ° C por minuto.....	53
Figura 22 - Esquema da reação de obtenção da dinitrila.	54
Figura 23 - Espectro de RMN 1H da 3-piridilacetonitrila em $(CD_3)_2SO$ a 25 °C. δ 7,50-7,47 (m, 2 H, H_2 -piridil e H_4 -piridil), δ 6,73 (d, 1 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 6,40 - 6,37 (m, 1 H, H_5 -piridil), δ 3,03 (s, 2 H, CH_2).....	55
Figura 24 - Espectro de RMN 1H da dinitrila em $(CD_3)_2SO$ a 25 °C. δ 9,05 (s, 2 H, H_2 -piridil), δ 8,82 (s, 2 H, H_6 -piridil), δ 8,28 (d, 2 H, J: 7,0 Hz, H_4 -piridil), δ 7,70 (s, 2 H, H_5 -piridil).....	55
Figura 25 - Esquema da reação de obtenção da porfirazina $H_2(3Py)_8Pz$. TFA: ácido trifluoroacético.	56
Figura 26 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para a $H_2(3Py)_8Pz$ em 4:1 $CHCl_3$:MeOH.	57

Figura 27- Espectro de RMN ^1H da $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ em 4:1 $\text{CDCl}_3:\text{MeOD}$ a 25 °C. δ 9,43 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 8,82 (d, 8 H, J: 4,8 Hz, H_6 -piridil), δ 8,71 (d, 8 H, J: 7,7 Hz, H_4 -piridil), δ 7,83-7,80 (m, 8 H, H_5 -piridil).	58
Figura 28 - Espectro de massas da $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ obtido por meio da técnica MALDI-TOF MS, sem o uso matriz.	58
Figura 29 - Esquema da reação de obtenção da porfirazina $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$. p-TSE: p-toluenossulfonato de etila; TBAC: cloreto de tetrabutylamônio.	59
Figura 30 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ em 4:1 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ e $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$ ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em água.	60
Figura 31 - Espectro de RMN ^1H da $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$ em D_2O a 25 °C. δ 9,67 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,9 Hz, H_4 -piridil), δ 8,45 (m, 8 H, H_5 -piridil), δ 4,72 (CH_2 etil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH_3 etil).	61
Figura 32 - Esquema da reação de obtenção da metaloporfirazina $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$. TBAC: cloreto de tetrabutylamônio.	61
Figura 33 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$ ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ ($9,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em água.	62
Figura 34 - Espectro de RMN ^1H da $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ em D_2O a 25 °C. δ 9,69 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,7 Hz, H_4 -piridil), δ 8,44 (t, 8 H, J: 6,9 Hz, H_5 -piridil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH_3 etil).	63
Figura 35 - Reação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) com $^1\text{O}_2$ formando o 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB).	65
Figura 36 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o decaimento do DPBF sob irradiação do laser verde. A: rosa bengala e B: azul de metileno.	66
Figura 37 - Reação entre o ácido 9,10-antracenediil-bismetilenodimalônico (ABDA) e $^1\text{O}_2$ formando um endoperóxido.	67
Figura 38 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ em água, ABDA e $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$	68
Figura 39 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ em água, ABDA e $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$	69

Figura 40 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do ABDA com A: $H_2T3EPyP\text{Cl}_4$; B: $[Zn(T3EPyP)]\text{Cl}_4$ em água, sob irradiação do laser verde (seta verde).....	70
Figura 41- Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com A: $H_2T3EPyP\text{Cl}_4$; B: $[Zn(T3EPyP)]\text{Cl}_4$ em acetonitrila, sob irradiação do laser verde (seta verde).	72
Figura 42 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com a A: $H_2(3EPy)_8Pz\text{Cl}_8$; B: $[Zn(3EPy)_8Pz]\text{Cl}_8$ em acetonitrila, sob irradiação do laser vermelho (seta vermelha).....	73
Figura 43 - Espectros de absorção na região do UV-Vis reproduzindo o experimento de Φ_Δ da $[Zn(3EPy)_8Pz]\text{Cl}_8$ em acetonitrila A: sem DPBF e com irradiação; B: com DPBF e irradiação.	74
Figura 44 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos compostos A: $H_2TE3PyP\text{Cl}_4$; B: $[Zn(E3PyP)]\text{Cl}_4$; C: $H_2(3EPy)_8Pz\text{Cl}_8$; D: $[Zn(3EPy)_8Pz]\text{Cl}_8$ após 24 horas solubilizados no meio celular suplementado com 10% de SFB.	77
Figura 45 - Viabilidade celular em células B16F1 dos compostos A: $H_2TE3PyP\text{Cl}_4$; B: $[Zn(TE3PyP)]\text{Cl}_4$; C: $H_2(3EPy)_8Pz\text{Cl}_8$; D: $[Zn(3EPy)_8Pz]\text{Cl}_8$ em concentrações na faixa de 0,01 à 10 μM , sob irradiação de LEDs $625 \pm 5 \text{ nm}$ por uma hora (23 J cm^{-2}).....	78
Figura 46 - Sistema de irradiação de fitas de LED RGB multicolorido.....	95
Figura 47 - Sistema de irradiação com 24 LEDs de 3 W de potência cada, com comprimento de onda na faixa de 620-630 nm. Possui ajuste de altura e potência, possibilitando 6 configurações diferentes de operação para a irradiação de placas celulares. A irradiância do arranjo de LEDs, foi medida em um potenciômetro FieldMate da marca Coherent, no comprimento de onda máximo de emissão.....	96
Figura 48 - Esquema da reação de obtenção do produto de ciclização intramolecular (intermediário) e maleimida.....	97
Figura 49 - Sistema de irradiação de LED para experimento de Φ_Δ	98
Figura 50 - Espectro de absorção na região do UV-Vis da $H_2T3EPyP\text{Cl}_4$ ($3,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em acetonitrila com a área correspondente da emissão do laser verde sendo integrada.....	99
Figura 51 - Correlação entre as constantes de decaimento e áreas dos espectros de absorção para o experimento de Φ_Δ para a $H_2T3EPyP\text{Cl}_4$ em acetonitrila.....	99

Figura 52- Gráfico entre as absorvâncias do DPBF em 410 nm em relação ao tempo de irradiação para o experimento A: rosa bengala; B: azul de metileno.....	101
Figura 53 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do ABDA com o rosa bengala em água, sob irradiação do laser verde (seta verde).....	102
Figura 54 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com A: rosa bengala em acetonitrila, sob irradiação do laser verde (seta verde); B: azul de metileno em acetonitrila, sob irradiação do laser vermelho (seta vermelha).....	102
Figura 55 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ reproduzindo o experimento de Φ_{Δ} em acetonitrila, A: sem DPBF e irradiação; B: com DPBF e sem irradiação.	103
Figura 56 - Gráfico entre absorvância e tempo de irradiação de A: $H_2(3EPy)_8PzCl_8$; B: $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$	103
Figura 57 - Gráfico entre a penetração celular de acordo com o tempo de incubação para a $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equipamentos utilizados com seu respectivo modelo e marca.....	34
Tabela 2 - Valores de CA e Φ_F para os compostos em água.	63
Tabela 3 - Dados de k^{-1} e Φ_{Δ} referente aos experimentos de validação da metodologia.....	66
Tabela 4 - Dados de k^{-1} e Φ_{Δ} referente a $H_2TE3PyPCl_4$, $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ e rosa bengala em água.	70
Tabela 5 - Valores de k^{-1} e Φ_{Δ} para os compostos em acetonitrila.....	74
Tabela 6 - Percentuais de diminuição da absorbância dos compostos nos meios com diferentes concentrações de SFB e incorporação nas células B16F1 no meio contendo 10% de SFB em 24 horas de incubação.	76
Tabela 7 - Valores de Φ_{Δ} para a $H_2TE3PyPCl_4$ em acetonitrila utilizando o sistema de LED.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDA	Ácido 9,10-antraceniil-bismetilenodimalônico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
B16F1	Células de melanoma não-metastáticas
CA	Coeficiente angular
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CHCl_3	Clorofórmio
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistema
D_2O	óxido de deutério
DBB	1,2-dibenzoilbenzeno
DHP	Derivado de hematoporfirina
dinitrila	1,2-diciano-1,2-di(3-piridil)etileno
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-D_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
$\text{FS}^{\bullet-}$	Radical aniônico do fotossensibilizador
$\text{FS}^{\bullet+}$	Radical catiônico do fotossensibilizador
^1FS	Fotossensibilizador no estado fundamental
$^1\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado singleto excitado
$^3\text{FS}^*$	Fotossensibilizador no estado tripleto excitado
H^+	Íon hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
$h\nu$	Radiação eletromagnética
HOO^{\bullet}	Radical hidropoxila
HO^{\bullet}	Radical hidroxila
HO_2^{\bullet}	Radical hidroperoxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina-21,23-diato
$\text{H}_2\text{T3PyP}$	5,10,15,20-tetraquis(3-piridil)porfirina-21,23-diato
$\text{H}_2\text{T3EPyP}\text{Cl}_4$	Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirina-21,23-diato

$H_2(3Py)_8Pz$	Octaquis(3-piridil)porfirazina
$H_2(3EPy)_8PzCl_8$	Cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazina
H_2Pz	Porfirazinas base livre
I_2	Iodo
KNO_3	Nitrato de potássio
k^{-1}	Coeficiente angular da interpolação linear do gráfico de absorvância <i>versus</i> tempo de irradiação
MALDI-TOF MS	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo
Mg	Magnésio metálico
MgPz	Metaloporfirazinas de magnésio
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenoltetraazolio
NH_4PF_6	Hexafluorofosfato de amônio
3O_2	Oxigênio molecular
1O_2	Oxigênio singleto
OH^-	Ânion hidroxila
$O_2^{\bullet-}$	Ânion radical superóxido
PBS	Tampão fosfato-salino
PF_6^-	hexafluorofosfato
<i>p</i> -TSE	<i>p</i> -toluenossulfonato de etila
Q	Molécula doadora de elétrons
Q^{*+}	Molécula oxidada
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
SFB	Soro fetal bovino
S_0	Estado fundamental
S_n	Orbital do estado excitado singleto de mais alta energia não ocupado
S_1	Orbital do estado excitado singleto de menor energia
TBAC	Cloreto de tetrabutilamônio
TFA	Ácido trifluoroacético
TFD	Terapia fotodinâmica
T_n	Orbital do estado excitado tripleto de mais alta energia
T_1	Orbital do estado excitado tripleto de menor energia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

UV–Vis	Ultravioleta e visível
ZnPz	Metaloporfirazinas de zinco
[Zn(T3EPyP)]Cl ₄	Cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirinatozinco(II)
[Zn(3EPy) ₈ Pz]Cl ₈	Cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirinatozinco(II)
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singleto
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência
Φ_T	Rendimento quântico do estado tripleto
Φ_P	Rendimento quântico de fosforescência
$^1\Sigma_g^+$	Configuração de mais alta energia do oxigênio singleto
$^1\Delta_g$	Configuração mais estável do oxigênio singleto
$^3\Sigma_g^-$	Configuração do oxigênio molecular
η	Índice de refração
τ_{Δ}	Tempo de vida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	CÂNCER.....	19
1.2	CONCEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA	20
1.3	PORFIRINAS E PORFIRAZINAS.....	28
1.3.1	Porfirinas.....	28
1.3.2	Porfirazinas	30
2.	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
3.	METODOLOGIA.....	33
3.1	EQUIPAMENTOS.....	33
3.2	MATERIAIS.....	35
3.3	REAGENTES E SOLVENTES	35
3.4	SÍNTESE DE PORFIRINAS E METALOPORFIRINAS	36
3.4.1	Obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirina-21,23-diato, $H_2T3EPyPCl_4$	36
3.4.2	Obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirinatozinco(II), [Zn(T3EPyP)]Cl ₄	38
3.5	SÍNTESE DE PORFIRAZINAS E METALOPORFIRAZINAS	38
3.5.1	Obtenção da dinitrila 1,2-diciano-1,2-di(3-piridil)etileno.....	38
3.5.2	Obtenção da octaquis(3-piridil)porfirazina, $H_2(3Py)_8Pz$	40
3.5.3	Obtenção do cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazina, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$	41
3.5.4	Obtenção do cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazinatozinco(II), [Zn(3EPy) ₈ Pz]Cl ₈ ... 41	41
3.6	ESTUDOS FOTOFÍSICOS.....	42
3.6.1	Rendimento Quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ).....	42
3.6.2	Rendimento Quântico de fluorescência (Φ_F).....	43
3.7	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	44
3.7.1	Uptake celular	44
3.7.2	Teste de interação com o meio celular RPMI 1640 com indicador	44

3.7.3	Viabilidade celular.....	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	46
4.1.1	Porfirina H ₂ T3EPyPCl ₄	46
4.1.2	Metaloporfirina [Zn(T3EPyP)]Cl ₄	50
4.1.3	Dinitrila.....	53
4.1.4	Porfirazina H ₂ (3Py) ₈ Pz.....	56
4.1.5	Porfirazina H ₂ (3EPy) ₈ PzCl ₈	59
4.1.6	Metaloporfirazina [Zn(3EPy) ₈ Pz]Cl ₈	61
4.2	ESTUDOS FOTOFÍSICOS.....	63
4.2.1	Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) em água.....	63
4.2.2	Validação da metodologia de rendimento quântico de ¹ O ₂ (Φ_Δ).....	64
4.2.3	Φ_Δ dos compostos em água.....	67
4.2.4	Φ_Δ dos compostos em acetonitrila.....	71
4.3	ESTUDOS BIOLÓGICOS.....	76
4.3.1	Incorporação celular.....	76
4.3.2	Ensaio de citotoxicidade.....	78
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
6	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICES.....	95
	APÊNDICE A – Sistema de irradiação de fitas de LED RGB multicolorido.....	95
	APÊNDICE B – Sistema de LED vermelho para irradiação de placas celulares.....	96
	APÊNDICE C – Reações complementares na síntese da Dinitrila.....	97
	APÊNDICE D - Validação da metodologia de Φ_Δ utilizando um sistema de LED.....	98
	APÊNDICE E – Gráficos para obtenção de k ⁻¹ no experimento de validação da metodologia de Φ_Δ	101
	APÊNDICE F – Espectros e gráficos referentes aos experimentos de Φ_Δ	102
	APÊNDICE G – Gráfico referente ao experimento de incorporação celular.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Durante os processos de replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN), falhas podem ocorrer devido a fatores internos ou externos, originando as células anormais, ocasionando os estados neoplásicos, que dão origem ao câncer.^{1,2} O motivo principal dos óbitos causados pelo câncer é a metástase, que se trata do espalhamento dessas células anormais para os demais órgãos e tecidos do corpo.^{2,3,4}

No ano de 2020 foram diagnosticados mundialmente mais de 19 milhões de novos casos de câncer, com um total de 10 milhões de óbitos.⁵ Destes dados, o Brasil relatou mais de 590 mil novos casos e 259 mil mortes.^{3,6} A somatória dos óbitos causados por todos os tipos de câncer, está entre as cinco primeiras posições de causas de morte em todos os países do mundo, sendo que em 112 países, incluindo o Brasil, está na primeira ou segunda posição.^{3,5}

No ranking dos tipos de câncer mais incidentes, o de pele não melanoma ocupa o quarto lugar em número de novos casos, sendo aproximadamente 1,2 milhões em todo o mundo, tendo uma taxa de mortalidade próxima a 5,4%. Em décimo nono lugar, está o câncer de pele melanoma, que teve 330 mil casos e 17,6% de mortalidade no mundo em 2020,^{2,5} sendo que desses valores, o Brasil contribuiu com mais de 8 mil novos casos e aproximadamente 2 mil mortes. A previsão da Organização das Nações Unidas é que a população mundial atinja a marca de 8,3 bilhões de habitantes no ano de 2030, o que irá ocasionar cerca de 22,2 milhões de novos diagnósticos de câncer neste ano⁷.

A cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os métodos tradicionais para o tratamento do câncer, sendo que nos últimos anos, as pesquisas científicas relacionadas a esses procedimentos não vem apresentando avanços significativos nos resultados, fazendo com que o número de novos medicamentos aprovados clinicamente seja muito baixo.^{3,8,9,10}

Esses métodos são eficazes para diversos tipos de câncer, principalmente em estágios iniciais, porém, um aspecto negativo presente nesses procedimentos são os efeitos adversos. Por exemplo, a cirurgia é um procedimento invasivo, que pode ocasionar infecções, danos aos tecidos e órgãos, e uma recuperação lenta das funções corporais¹¹. Na quimioterapia, os medicamentos percorrem o organismo todo, podendo afetar células saudáveis, sendo que as mais afetadas são as originadas na medula óssea, boca, sistema digestivo, capilar e reprodutivo. Esse tipo de tratamento pode, portanto, provocar cardiotoxicidade, neurotoxicidade, esterilidade, neuropatia periférica, anemia, entre outros efeitos adversos¹². A radioterapia utiliza radiação de alta energia, como raios gama e raios X, ou feixes de elétrons para fazer pequenas rupturas no ADN dentro das células, e tem como principais efeitos

colaterais as irritações na pele na região em que ocorreu o tratamento, e alguns efeitos específicos para cada tipo de câncer¹³.

Uma outra abordagem terapêutica em constante desenvolvimento é a imunoterapia, que se baseia em estimular o sistema imunológico para que ele consiga localizar e combater o câncer. Mesmo que os resultados desse procedimento sejam satisfatórios, ainda é necessário dar muita atenção para os custos monetários do tratamento, visto que ainda é inviável desenvolver essa metodologia em sistemas públicos de saúde.¹⁴

Devido às desvantagens e desafios existentes nos métodos terapêuticos relatados, ainda há espaço para o desenvolvimento do tratamento do câncer. Dessa forma, uma possível solução seria encontrar novas abordagens terapêuticas com maior eficiência e dar ênfase em seus estudos. Nessas circunstâncias, a terapia fotodinâmica (TFD) vem demonstrando grande potencial em suprir diversas necessidades dessa área da saúde, visto que já é um método eficaz para alguns tipos de câncer, tendo efeitos adversos de menor intensidade e apresentando baixo custo de operação.¹⁵

1.2 CONCEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

No início do século XX foi feita uma descoberta acidental que resultou no surgimento do termo ação fotodinâmica. Um estudante de medicina verificou que microrganismos na presença de certos corantes estavam morrendo após serem expostos a luz, algo que não ocorria quando ficavam em um ambiente escuro. Algum tempo depois, foi descoberto que também era necessário a presença do oxigênio para que o fenômeno ocorresse.¹⁶ De modo geral, a TFD é um fenômeno que envolve uma molécula, denominada de fotossensibilizador (FS), que quando é exposta a uma radiação eletromagnética na região do visível, consegue produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) ou outras espécies distintas que resultam na morte de células cancerosas.^{15,17,18}

Os estudos mais elaborados nessa área, começaram a surgir na década de 70, quando o primeiro FS eficiente foi desenvolvido, sendo este, uma mistura de porfirinas solúveis em água denominado como 'derivado de hematoporfirina' (DHP).^{16,19} Grande parte dos FS utilizados na TFD contém uma estrutura tetrapirrólica, sendo que uma versão otimizada do DHP, denominado Photofrin®, é o primeiro fármaco aprovado clinicamente para a aplicação em pacientes. Porém, esse fármaco apresenta como principais desvantagens, a fotossensibilidade da pele por semanas ou meses após a aplicação e a utilização de luzes no tratamento que tem baixa penetração no tecido, visto que a sua absorbância na região do vermelho é muito baixa (consultar Figura 5, pág. 8).^{15,16,17,19,20}

O procedimento clínico de TFD (Figura 1, pág. 3) consiste em três estágios. O primeiro se refere a aplicação do FS no organismo, podendo ser por via intravenosa ou tópica. O

segundo estágio é a acumulação do FS nas células tumorais, que pode levar de 5 minutos até mais de 24 horas, pois depende da seletividade do FS. No terceiro estágio, ocorre o procedimento de emissão de luz para a área de interesse, utilizando um LED ou um laser e, ocorrendo assim, os fenômenos demonstrados na Figura 2 (pág. 4) e algumas das reações descritas no Quadro 1 (pág. 4 e 5).^{15,21}

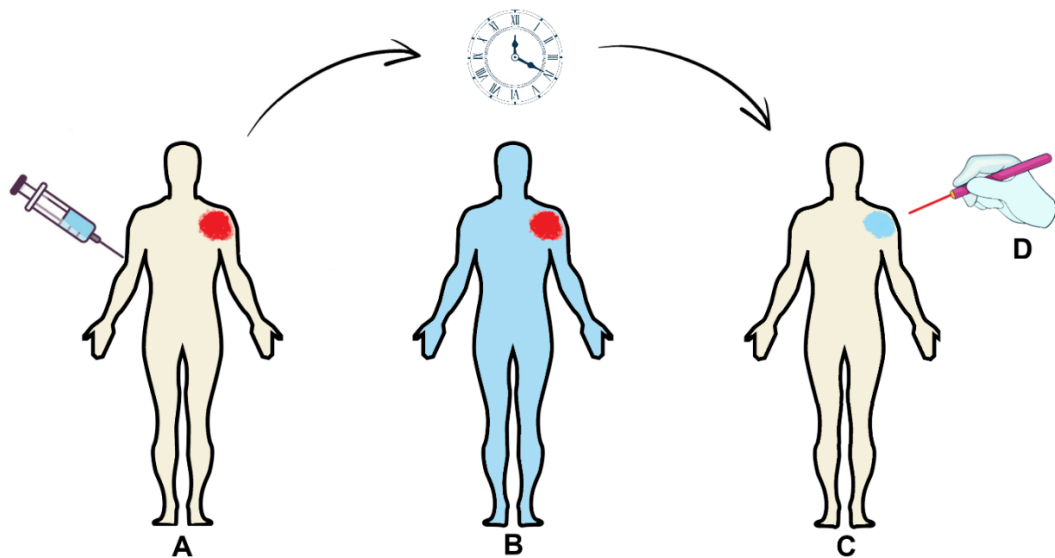


Figura 1- Princípios clínicos da TFD. A: Aplicação do FS; B: Distribuição do FS; C: Acúmulo do FS no tumor; D: Irradiação na região tumoral.

Conforme é mostrado na Figura 2 (pág. 4), a exposição do FS a uma fonte de luz faz com que o elétron saia do estado fundamental (S_0) para um orbital de mais alta energia não ocupado (S_n). Em seguida, ocorre uma conversão interna (CI) para o estado excitado singlete de menor energia (S_1), assim o elétron nesse estado pode sofrer: (1) decaimento não-radiativo e voltar para o S_0 , (2) decaimento radiativo conhecido como fluorescência ou; (3) um cruzamento intersistema (CIS) para o estado excitado tripleto de mais alta energia (T_n). O CIS é uma transição proibida por spin, porém, ele pode ser observado em moléculas cujo acoplamento spin-orbita não é desprezível. Desse modo, quando ocorre uma sobreposição dos níveis vibracionais S_1 e T_n , não há distinção entre eles e o preenchimento do orbital T_n do FS é possível.^{15,21}

Quando ocorre a troca de multiplicidade, observa-se novamente uma conversão interna, o elétron decai do T_n para o estado excitado tripleto de menor energia (T_1) e nesse estado podem ocorrer os seguintes fenômenos: um decaimento não-radiativo resultando na espécie S_0 sem transferência de energia e um decaimento radiativo denominado de fosforescência.^{15,21}

Porém, nesse estado T_1 , ainda podem ocorrer outros dois fenômenos quando há a interação com outras substâncias: (1) o FS pode interagir diretamente com um substrato do meio, que pode ser a membrana celular ou uma molécula,^{17,21,22} ocorrendo transferência de íon hidrogênio (H^+) ou elétrons, gerando ERO como, por exemplo, HOO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ e HO^\bullet , resultando no mecanismo do tipo I ou; (2) o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular (3O_2), transferindo a energia do elétron para ele e formando o oxigênio singlete (1O_2), ocasionando o mecanismo do tipo II.^{15,21,23,24}

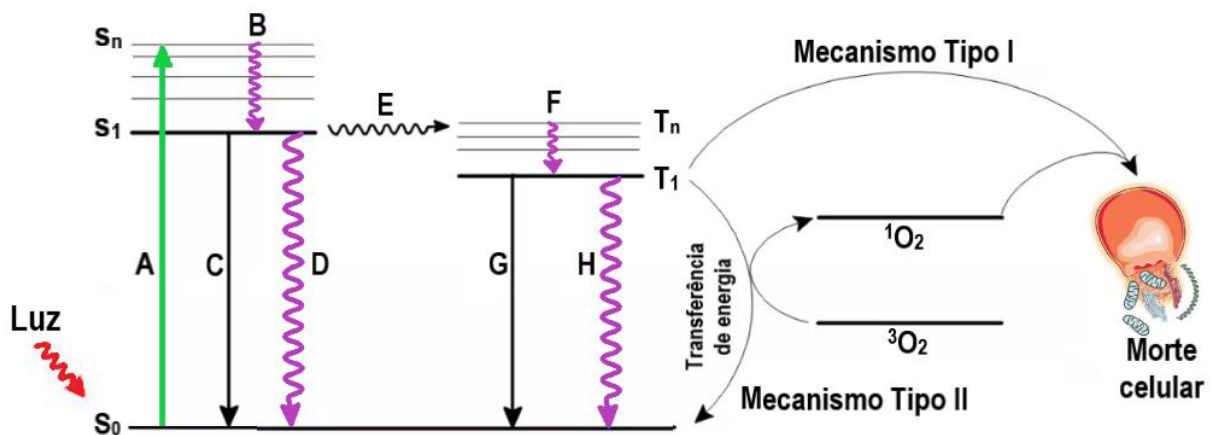


Figura 2 - Representação do Diagrama de Jablonski para a produção de oxigênio singlete. A: Excitação; B/F: Conversão interna; C: Fluorescência; D/H: Decaimento não-radiativo E: Cruzamento intersistema; G: Fosforescência.^{15,25}

As equações químicas que representam as principais reações que ocorrem na TFD estão no Quadro 1 (pág. 4 e 5). Deve-se destacar que para o mecanismo do tipo I, associa-se diferentes tipos de reações, que podem levar a geração de diversas ERO. Já o mecanismo do tipo II se limita a reação de produção de 1O_2 .

Quadro 1 - Processos que podem ocorrer na TFD pelos mecanismos tipo I e II.

Fotoprocesso	Reação
Excitação	$^1FS + h\nu \rightarrow ^1FS^* \rightarrow ^3FS^*$
Tipo I	$^3FS^* + Q \rightarrow FS^{\bullet-} + Q^{\bullet+}$ $^3FS^* + ^1FS \rightarrow FS^{\bullet-} + FS^{\bullet+}$ $FS^{\bullet-} + ^3O_2 \rightarrow ^1FS + O_2^{\bullet-}$ $^3FS^* + ^3O_2 \rightarrow FS^{\bullet+} + O_2^{\bullet-}$ $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow ^3O_2 + H_2O_2$ $O_2^{\bullet-} + Q^{\bullet+} \rightarrow HOO^\bullet + Q(-H)^\bullet$

Continuação do Quadro 1.

	$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Q}^{\bullet+} \rightarrow \text{produtos}$ $\text{Q}^{\bullet+} \rightarrow \text{Q}(-\text{H})^{\bullet} + \text{H}^+$ $\text{Q}(-\text{H})^{\bullet} + {}^3\text{O}_2 \rightarrow \text{HOO}^{\bullet} + \text{Q}(-\text{HH})^{\bullet}$ $\text{HOO}^{\bullet} + \text{Q} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Q}(-\text{H})^{\bullet}$ $2 \text{HOO}^{\bullet} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + {}^3\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{HO}^{\bullet} + \text{HO}^- + {}^3\text{O}_2$ $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2^{\bullet} + \text{HO}^-$ $2 \text{HO}_2^{\bullet} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + {}^3\text{O}_2$
Tipo II	${}^3\text{FS}^* + {}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{FS} + {}^1\text{O}_2$

${}^1\text{FS}$: FS no estado fundamental; $h\nu$: radiação eletromagnética; ${}^1\text{FS}^*$: FS no estado singleto excitado; ${}^3\text{FS}^*$: FS no estado tripleto excitado; Q: molécula doadora de elétrons; $\text{Q}^{\bullet+}$: molécula oxidada; $\text{FS}^{\bullet-}$: radical aniônico do FS; $\text{FS}^{\bullet+}$: radical catiônico do FS; $\text{O}_2^{\bullet-}$: ânion radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HOO^{\bullet} : radical hidroperoxila; HO^{\bullet} : radical hidroxila; OH^- : ânion hidroxila; HO_2^{\bullet} : radical hidroperoxil.^{24, 26}

Partindo do ${}^3\text{O}_2$ para obter diretamente o ${}^1\text{O}_2$ é necessário que a transferência de energia do fotossensibilizador seja de aproximadamente $94,2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Quando a transferência de energia atinge um valor igual ou superior a $156,9 \text{ kJ mol}^{-1}$, o ${}^1\text{O}_2$ pode ser encontrado com a configuração de mais alta energia (${}^1\Sigma_g^+$), cujo tempo de vida (τ_{Δ}) é na ordem de 10^{-11} s ,²⁷ decaindo rapidamente por uma CI para a configuração ${}^1\Delta_g$ (Figura 3, pág. 6). O tempo de vida do ${}^1\text{O}_2$ (${}^1\Delta_g$) varia de acordo com o solvente em que se encontra, sendo o seu maior valor em tetracloreto de carbono ($73000 \mu\text{s}$) e o menor em água ($3,3 \mu\text{s}$),²⁸ limitando a difusão nas células de 10 nm a 55 nm ^{26,29,30}.

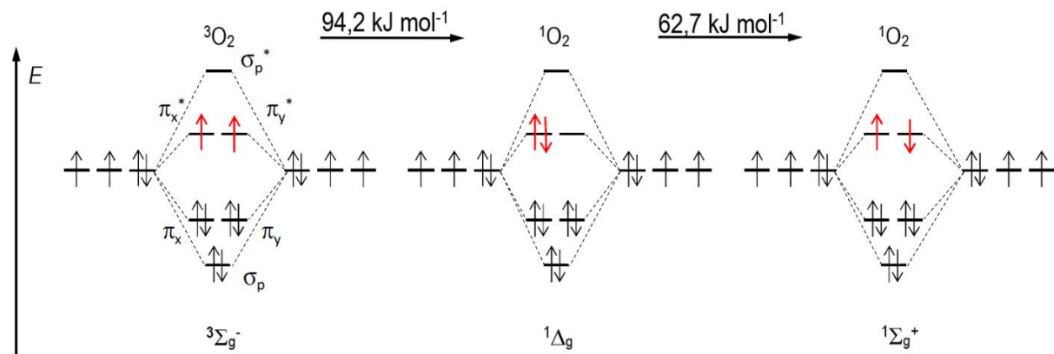


Figura 3 - Representação do diagrama simplificado de orbitais moleculares da molécula de oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) e nos seus estados excitados ($^1\text{O}_2$), segundo a Teoria dos Orbitais Moleculares. $^1\Sigma_g^+$: Configuração de mais alta energia do $^1\text{O}_2$; $^1\Delta_g$: configuração mais estável do $^1\text{O}_2$; $^3\Sigma_g^-$: configuração do oxigênio molecular.²⁶

Uma molécula que é capaz de produzir ERO, incluindo o $^1\text{O}_2$, tem grande potencial para se tornar um FS, pois essas substâncias conseguem oxidar componentes da membrana plasmática e de demais organelas de uma célula, resultando na sua morte.^{30,15} Fazer uma quantificação dessa produção de $^1\text{O}_2$ é de extrema importância no processo de desenvolvimento de um FS.

Criou-se então, o termo rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ), que identifica a quantidade de $^1\text{O}_2$ produzido pela quantidade de fótons absorvidos. Uma das formas de fazer essa quantificação, é por meio do tempo de vida de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm, porém, é necessário utilizar detectores de alta sensibilidade, que tem um valor de aquisição muito elevado, tornando esse método pouco viável.^{30,31} Dessa forma, foi criado um método alternativo para a determinação indireta do $^1\text{O}_2$, por meio de uma análise quantitativa, utilizando moléculas específicas, denominadas sondas de $^1\text{O}_2$. Essas sondas reagem com o $^1\text{O}_2$ formando produtos que não absorvem luz na região do visível, sendo possível acompanhar o decaimento da banda de absorção da sonda e relacioná-lo diretamente com a produção de $^1\text{O}_2$ do FS.^{30,31,32,33,34,35}

Uma sonda de $^1\text{O}_2$ amplamente utilizada devido ao baixo valor comercial e alta solubilidade em uma gama de solventes é o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) (Figura 4, pág. 7), porém, ele não pode ser utilizado em água, pois apresenta baixa solubilidade. Portanto, para a determinação de $^1\text{O}_2$ em água, é necessário utilizar outra sonda, sendo o ácido 9,10-antracenediil-bismetileno-dimalônico (ABDA) (Figura 4, pág. 7) o mais comumente usado.³⁵ Existem outras sondas que podem ser utilizadas, como por exemplo, betacianina,³⁶ ácido úrico, triptofano, ácido p-nitrosodimetilanilina, ácido benzotriazol, albumina de soro bovino, entre outros.³⁰

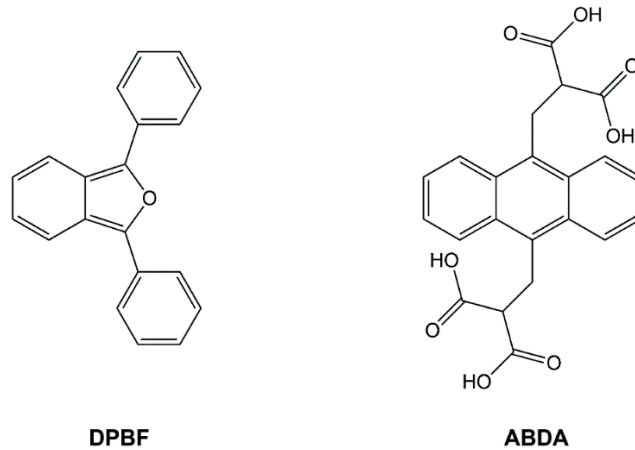


Figura 4 - Estrutura do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) e ácido 9,10-antracenediil-bismetilenodimalônico (ABDA)

A luz solar foi a primeira fonte de luz usada na TFD, sendo que existem relatos de sua utilização para fins medicinais há mais de 5000 mil anos.²⁰ Visto que não é possível controlar a intensidade dessa luz, optou-se por utilizar fontes de luz que tenham um comprimento de onda específico e um controle da intensidade aplicada no paciente.¹⁸

Sabe-se que em comprimentos de onda acima de 800 nm a radiação eletromagnética não fornece energia suficiente para que o $^3\text{O}_2$ fique com a configuração de $^1\text{O}_2$, dessa forma, é necessário utilizar valores abaixo disso.^{15,17,19} Porém, a penetração no tecido é afetada de acordo com a região espectral da luz. A radiação eletromagnética de maior comprimento de onda tem uma menor dispersão de energia e, conseqüentemente, maior penetração no tecido.³⁷ A Figura 5 (pág. 8) demonstra a penetração no tecido que cada região do espectro visível atinge. Dessa forma, sabe-se que em comprimentos de onda abaixo de 600 nm, a penetração no tecido é muito superficial, assim, é desejável que um FS de última geração apresente alta absorção na região do vermelho (600 e 800 nm).^{15,18,19,38}

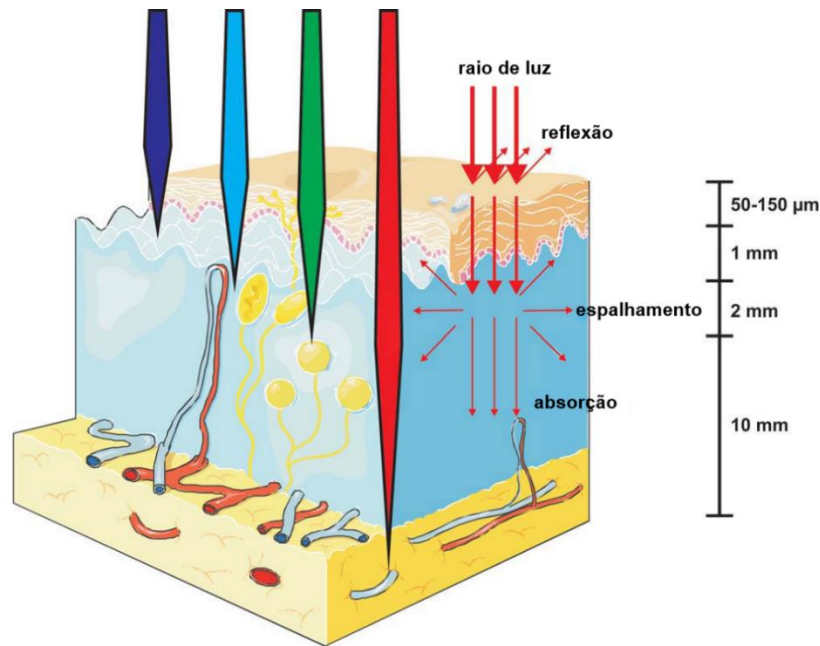


Figura 5 - Penetração da radiação eletromagnética no tecido de acordo com a região do visível.

Adaptado de Agostinis (2011).¹⁵

O desenvolvimento de um fármaco é um processo demorado e que envolve diversas análises e pré-requisitos para a sua aprovação clínica. No caso dos FS, o ideal é que eles tenham as seguintes propriedades para serem mais eficientes e aceitos para procedimentos terapêuticos: (1) ser puro, permitindo análises de controle de qualidade com baixos custos; (2) ser estável quimicamente; (3) ser seletivo para células tumorais, reduzindo os efeitos adversos provindos da morte de células saudáveis; (4) acumular rapidamente nos tecidos tumorais, caso contrário, pode haver ativação do FS fora da região de interesse; (5) apresentar alta absorção na região entre 600 nm a 800 nm; (6) ser excretado rapidamente do organismo, no máximo em um dia, evitando provocar fotossensibilidade ao paciente; (7) apresentar baixa toxicidade no escuro; (8) possuir caráter anfifílico, pois tendo uma região hidrofílica o FS consegue se solubilizar com maior facilidade no organismo, evitando possíveis efeitos colaterais devido a aglomeração na corrente sanguínea. Se o composto tiver uma região lipofílica, há um aumento na capacidade de interação com os tumores.^{15,17,18,19,39}

As principais classes de moléculas que apresentam esses critérios são as porfirinas, ftalocianinas, porfíricenos, clorinas e texafirinas. Porém, ainda há um déficit na TFD, visto que grande parte dos fármacos atuais não atende à maioria dos critérios citados, resultando em diversas barreiras na sua aplicação. Isso faz com que os estudos científicos recentes foquem na síntese de novos FS.^{18,40,41} O Quadro 2 (pág. 9) mostra alguns dos fármacos que são clinicamente aprovados para a aplicação na terapia fotodinâmica.

Quadro 2 - Fármacos aprovados clinicamente para aplicação na TFD, contendo a classe, comprimento de onda de excitação e indicação terapêutica.^{24,38,39,42,43,44}

Fármaco	Classe	Excitação (nm)	Indicação terapêutica
Photofrin®	Porfirina	630	Câncer de esôfago, endobrônquico, displasia de alto grau no esôfago de Barrett
Levulan kerastick®	Porfirina	635	Ceratose actínica, carcinoma basocelular, câncer de cabeça e pescoço
Visudyne®	Porfirina	690	Degeneração macular
Metvix® / Metvixia®	Porfirina	635	Doença de Bowen e carcinoma basocelular superficial
Purlytin®	Clorina	664	Câncer de mama e sarcoma de Kaposi
Foscan®	Clorina	652	Câncer paliativo de cabeça e pescoço
Laserphyrin®	Clorina	664	Câncer de pulmão precoce
Photosen®	Ftalocianina	675	Câncer de pele, mama, pulmão, orofaringe, laringe, cabeça e pescoço
Tookad®	Bacterioclorina	762	Câncer de próstata
Photochlor®	Feoforbeto	665	Câncer de esôfago e células basais
Lutex®	Texafirina	732	Câncer de próstata
Synthetic hypericin	Antraquinona	570-650	Linfoma cutâneo de células T

1.3 PORFIRINAS E PORFIRAZINAS

1.3.1 Porfirinas

As porfirinas (Figura 6A) são moléculas macrocíclicas constituídas de quatro anéis pirrólicos ligados por átomos de carbono metilidênicos (posições meso). Os quatro átomos de nitrogênio dessa molécula são capazes de formar ligações com íons metálicos produzindo as metaloporfirinas (Figura 6B).^{45,46}

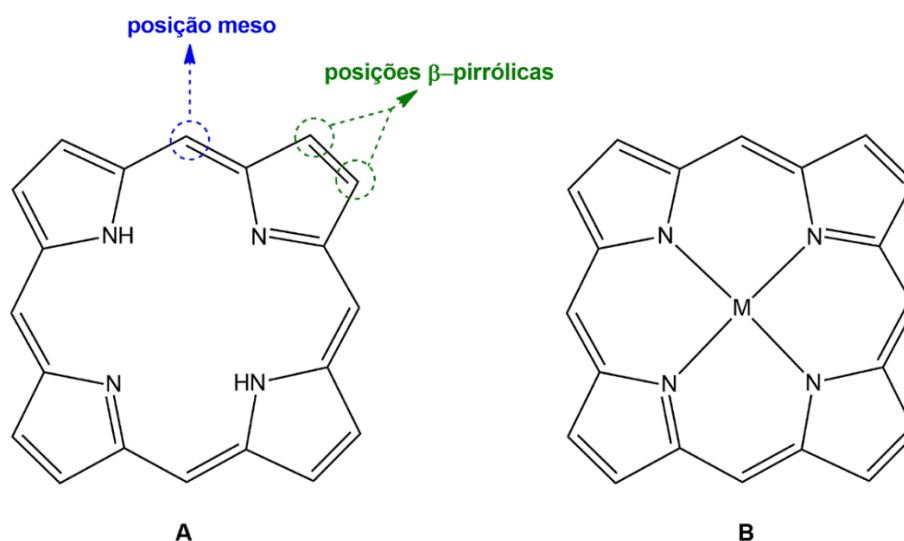


Figura 6 – Estrutura química de porfirina (A) e metaloporfirina (B).

Porfirinas são compostos conhecidos desde o século XIX, sendo consideradas uma classe de compostos com muita versatilidade para modificações estruturais, e grande potencial para aplicação em diversas áreas.⁴⁷ Em 1913 Mayer-Betz injetou em si mesmo 200 mg de hematoporfirina, relatando não sofrer muitos efeitos adversos, até que se expôs a luz solar e começou a ter um inchaço extremo em seu corpo, permanecendo fotossensível durante muito tempo. A partir desse relato, as pesquisas relacionadas a porfirinas como FS começaram por volta de 1920.^{48,49} Mostrou-se por volta de 1946 que a hematoporfirina acumulada no tecido canceroso foi capaz de identificar as células anormais ali presentes, devido à forte fluorescência que apresentou. Vinte anos depois, constatou-se que o DHP se acumulou majoritariamente no tecido canceroso ao invés do tecido saudável.^{48,49} Dessa forma, essa classe de compostos começou a ser explorada para o desenvolvimento de fármacos, principalmente no tratamento de tumores malignos.

Um substituinte das posições meso para as porfirinas, que começou a ser explorado pela comunidade científica, foi o grupo piridil (C_6H_4N), sendo o primeiro isômero dessa classe sintetizado inicialmente na década de 60 (4-piridilporfirina⁵⁰) e os outros dois isômeros na

década de 70 (2- e 3-piridilporfirina^{51,52,53,54}) (Figura 7). A síntese inicial consistia na condensação direta do pirrol e aldeído correspondente, usando o ácido propanoico como solvente.⁵¹ Atualmente, essas porfirinas são fornecidas comercialmente.

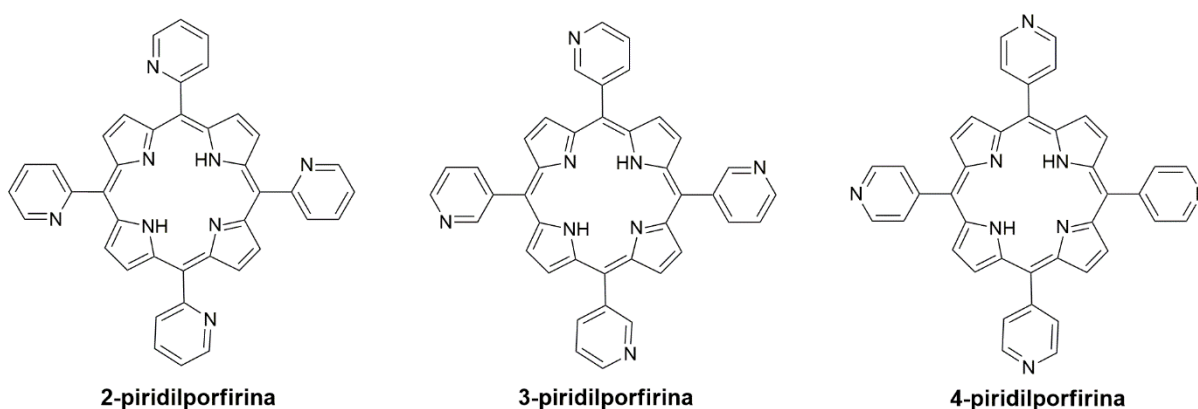


Figura 7 – Estrutura dos isômeros das porfirinas com o substituinte piridil.

Os estudos fotofísicos dessa classe de compostos começaram na década de 80, em que foi relatado que não há grandes diferenças nas propriedades fotofísicas para as porfirinas base livre e a suas respectivas metaloporfirinas de zinco.⁵⁵ Em relação a TFD, um problema inerente para esses compostos foi a solubilidade, pois como descrito anteriormente, um bom FS deve ter caráter anfifílico e as porfirinas com grupo piridil não são solúveis em água.

Esse problema foi solucionado ainda na década de 70, quando se começou a sintetizar porfirinas catiônicas com o substituinte piridil, utilizando *p*-toluenossulfonato de metila em excesso e DMF ou CH₂Cl₂ como solvente.^{56,57} O intuito da adição de um grupo alquil no substituinte piridil é tornar o composto que antes era totalmente hidrofóbico em um composto hidrossolúvel, dessa forma, atendendo ao critério de anfifilicidade. Os estudos fotofísicos envolvendo essa classe de compostos catiônicos começaram a surgir na década de 80,^{58,59} demonstrando bons resultados para a TFD, sendo que a 3-metilpiridilporfirina apresentou maior valor de Φ_{Δ} quando comparada a 2-metil-piridilporfirina e 4-metilpiridilporfirina.⁵⁸ De modo geral, comparando o Φ_{Δ} da porfirina base livre com o da metaloporfirina de zinco(II), verifica-se um aumento significativo no Φ_{Δ} após a inserção do zinco, sendo um possível indício de uma maior atividade terapêutica,^{58,60} mas vale lembrar que diversos fatores precisam ser levados em consideração e não apenas o Φ_{Δ} .⁶¹

Dos critérios descritos anteriormente para os FS, o primeiro deles que uma substância deve ter para ser considerada promissora na TFD, é a absorção na região de 600 a 800 nm. As porfirinas de modo geral, tem como característica uma alta absorção na região do ultravioleta e visível, em que na região indicada para TFD, elas normalmente apresentam bandas eletrônicas de menor intensidade, mas que podem ser suficientes para a geração de

$^1\text{O}_2$.⁴⁸ Uma evidência disso é que alguns dos fármacos demonstrados no Quadro 2 (pág. 9) são excitados na faixa de 630-690 nm durante o tratamento.

A síntese de piridilporfirinas contendo diferentes substituintes alquila e centros metálicos está em constante crescimento desde o início do século XXI,^{62,63,64,65,66,67} em que diversos estudos biológicos estão demonstrando baixa atividade citotóxica no escuro e alta atividade após a irradiação.^{62,68,69,70,71} Assim, a síntese de novas porfirinas hidrossolúveis, análise fotofísica e estudos de citotoxicidade desses compostos é um caminho com muito potencial que deve ser explorado.

1.3.2 Porfirazinas

Outra classe de compostos contendo anéis tetrapirrólicos são as tetra-azaporfirinas, também denominadas porfirazinas (Figura 8A), que se distinguem das porfirinas pela substituição dos átomos de carbono metilidênicos por átomos de nitrogênio. Essa substituição na posição meso afeta o comportamento químico do macrociclo em comparação as porfirinas, assim, ocorre um aumento da reatividade na formação de metaloporfirazinas (Figura 8B), devido a alteração na densidade eletrônica do anel e conseqüentemente no pKa dos átomos de hidrogênio pirrólicos. A posição meso torna-se inativa para modificações estruturais, tornando as posições β -pirrólicas a única opção de adição de substituintes.^{72,73}

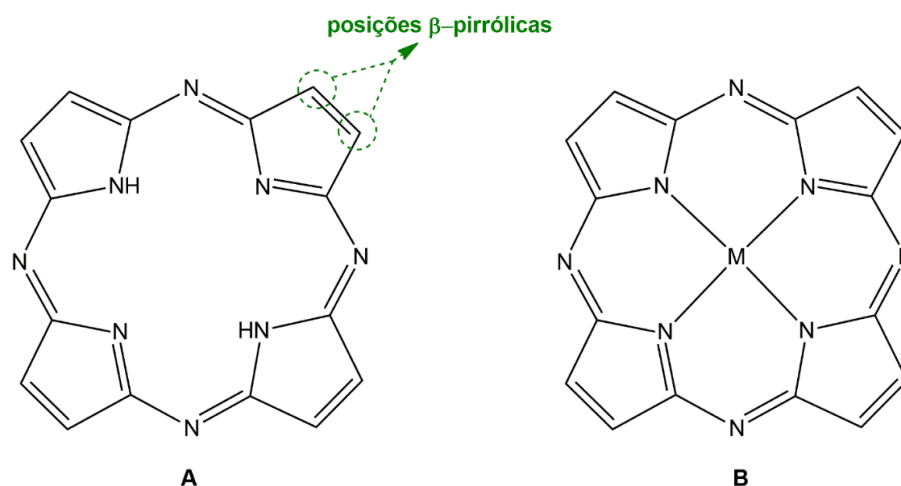


Figura 8 - Estrutura química de porfirazina (A) e metaloporfirazina (B).

A primeira caracterização estrutural de uma Pz ocorreu na década de 30, mas essa classe de compostos só começou a ser amplamente sintetizada, quando começou a se utilizar nitrilas com substituintes mais reativos (heteroátomos e cadeias carbônicas maiores), melhorando significativamente o rendimento das reações.⁷² Enquanto as piridilporfirinas já

eram amplamente estudadas na década de 70, a Pz com o substituinte 4-piridil foi sintetizada no final da década de 90,⁷⁴ a 2-piridil há menos de dez anos,⁷⁵ e a 3-piridil foi sintetizada nesse trabalho de mestrado. Como a reação de alquilação do átomo de nitrogênio piridínico já é bastante conhecida e essencial para tornar o composto anfifílico, os mesmos trabalhos que desenvolveram o macrociclo neutro, sinterizaram as respectivas porfirazinas 4-alquilpiridil e 2-alquilpiridil.

As piridilporfirazinas vem demonstrando resultados satisfatórios de Φ_{Δ} , em que já se verificou que a inserção de zinco(II) na porfirazina base livre resulta em um aumento considerável de Φ_{Δ} quando comparado a inserção de magnésio(II),⁷⁶ e que a alquilação do composto potencializa o Φ_{Δ} .⁷⁷ Também foi relatado uma atividade citotóxica de uma porfirazina de zinco(II) octacatiônica, em que os resultados evidenciam um comportamento de FS.⁷⁷

A partir desses dados, pode-se dizer que é interessante investigar a atividade fotofísica e citotóxica da porfirazina contendo o substituinte 3-piridil, visto que ainda não há nada relatado sobre ela. Além disso, fazer uma comparação de porfirinas e porfirazinas com o mesmo substituinte, em condições experimentais semelhantes é algo que ainda não foi relatado na literatura e que pode trazer novas perspectivas, discussões e descobertas para a TFD.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo sintetizar porfirinas e porfirazinas catiônicas de zinco(II), contendo o grupo 3-etilpiridil como substituinte, e verificar a eficácia desses compostos como fotossensibilizadores, por meio de análises fotofísicas e de fototoxicidade em células tumorais *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Sintetizar os compostos: cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirina-21,23-dieta ($H_2T3EPyPCL_4$), cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirinatozinco(II) ($[Zn(T3EPyP)]Cl_4$), cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazina ($H_2(3EPy)_8PzCl_8$), cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazinatozinco(II) ($[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$);
- ❖ Desenvolver e validar um sistema de irradiação para estudos de Φ_Δ ;
- ❖ Determinar o Φ_Δ em água e acetonitrila dos compostos sintetizados;
- ❖ Determinar o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) em água dos compostos sintetizados;
- ❖ Fazer ensaios de citotoxicidade dos compostos sintetizados em células de melanoma não-metastáticas (B16F1) *in vitro*.

3. METODOLOGIA

3.1 EQUIPAMENTOS

A) Análise Elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras foram medidas pelo técnico Marley A. P. de Assis, utilizando um analisador Elementar CHNS/O PE2400 Série II (Series II - CHNS/O Analyzer 2400) da Perkin Elmer, no laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da UFMG.

B) Análise Térmica

O experimento de análise térmica das porfirinas foi realizado pelo técnico Bruno R. S. Lemos, utilizando um analisador Térmico Simultâneo (TGA/DSC) Mettler Toledo, do Departamento de Química da UFMG.

C) Espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível

Na caracterização de compostos, acompanhamento das reações e experimentos de rendimento quântico de oxigênio singleto foi utilizado o espectrofotômetro HP 8453A diode-array. Nas medidas de absorbância para o experimento de rendimento quântico de fluorescência foi usado o espectrofotômetro da marca Hitachi modelo U-2010, que pertence ao Departamento de Química da UFMG.

D) Espectrofotômetro de fluorescência

Os espectros de emissão dos compostos para a caracterização e rendimento quântico de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse que pertence ao Departamento de Química da UFMG.

E) Espectrômetro de Massas: ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS)

Os espectros de massas foram obtidos utilizando a técnica MALDI-TOF MS em um espectrômetro Autoflex III MALDI-TOF MS da Bruker modificado com Nd:YAG laser (330-360, 495-540, 808, 990-1080 nm) equipado com fonte de íons de imagem de dessorção a laser de

feixe inteligente. As medições foram realizadas pelo Prof. Dr. Thiago T. Tasso e Prof. Dr. Gilson de F. Silva no modo positivo com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico para as porfirinas e no modo negativo sem matriz para a porfirazina neutra. O equipamento pertence ao laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq) do Centro de Laboratórios Multiusuários (CELAM), o Laboratório Multiusuários de Proteômica – LMProt, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

F) Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 (400 MHz) operado pela aluna de doutorado Patrícia S. Tessaro. Ele pertence ao laboratório Institucional de Pesquisa (LIPq), o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR), do Departamento de Química da UFMG.

G) Espectrofotômetro de placas celulares

Para a leitura da absorbância do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenoltetraazolio (MTT) nos experimentos de citotoxicidade, foi utilizado um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific modelo Multiskan GO.

Os demais equipamentos utilizados neste trabalho, estão relatados na Tabela 1 (pág. 16 e 17).

Tabela 1- Equipamentos utilizados com seu respectivo modelo e marca.

Equipamento	Modelo	Marca
Agitador Vórtex	MX-S	DLAB
Balança Analítica	BP210D	Sartorius
Banho-maria digital	---	Lucadema
Cabine de segurança biológica	BIO SEG12	Grupo VECO
Câmara de Neubauer	0,100 mm e 0,0025 mm ²	Optik New
Câmara escura	CX-20	Spectroline
Centrífuga	KC5	Kindly

Continuação da Tabela 1.

Chapa de aquecimento	C-MAG HS 7	IKA
Estufa de secagem	---	LUCADEMA
Estufa com controle de umidade e CO ₂	MCO-18AC	Sanyo
Evaporador rotativo com banho	R-114	BÜCHI
Laser de irradiação verde	532 nm; 100 mW	MTOLASER
Laser de irradiação vermelho	648 nm; 100 mW	MTOLASER
lavadora ultrassônica digital	Maxiclean	Unique
Manta de aquecimento	---	QUIMIB
Microscópio	Eclipse TS100	Nikon
pHmetro	pH meter 440	Corning
Sistema de irradiação de LED verde	Figura 46 (pág. 77, Apêndice A)	
Sistema de irradiação de LED vermelho	Figura 47 (pág. 78, Apêndice B)	

3.2 MATERIAIS

Nas análises feitas no espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta e visível e fluorescência foi utilizada uma cubeta de quartzo com as quatro faces polidas. Na caracterização dos compostos foram utilizadas placas de sílica com indicador de fluorescência em 254 nm da marca Fluka e placas de alumina neutra tipo E com indicador de fluorescência em 254 nm da marca Merck.

3.3 REAGENTES E SOLVENTES

As substâncias usadas, sem tratamento prévio, para as reações de obtenção dos compostos porfirínicos, estudos fotofísicos e estudos biológicos são: 3-piridilacetoneitrila (98%, Sigma-Aldrich), 5,10,15,20-tetrafenilporfirina-21,23-dieta (H₂TPP, ≥ 97%, Sigma-Aldrich), 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF, 97%, Aldrich), acetona (C₃H₆O, P.A., Vetec), acetoneitrila (MeCN, 99%, Aldrich), ácido 9,10-antraceno-diil-bismetilenodimalônico (ABDA, ≥ 90%, Sigma),

ácido clorídrico (HCl, 37%, Neon), ácido trifluoroacético (TFA, 99%, Sigma-Aldrich), álcool etílico (EtOH, P.A., Synth), alumina básica (0.05-0.15 mm, Fluka), alumina neutra (150 mesh, Sigma-Aldrich), azul de metileno (P.A., Grupo Química), bicarbonato de sódio (P.A., Neon), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenoltetraazolio (MTT, Thermo Fisher SCI), cloreto de tetrabutilamônio (TBAC, > 97%, Sigma-Aldrich), cloreto de zinco (97%, Proquímicos), clorofórmio (CHCl₃, 99,8%, Neon), clorofórmio-d (CDCl₃, 99,9%, Cambridge, I.L.), diclorometano (CH₂Cl₂, P.A., Synth), dimetilsulfóxido (DMSO, P.A., Merck), dimetilsulfóxido-d₆ (DMSO-D₆, 99,9%, Sigma-Aldrich), glicerina (Não identificado), hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆, >95%, Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH, Cromato P.Q.), metanol-d₄ (MeOD, 99,8%, Cambridge I. L.), água-d₂ (D₂O, 99,9%, Aldrich), *p*-toluenossulfonato de etila (*p*-TSE, 98%, Aldrich), rosa bengala (Não identificado), sulfato de sódio anidro (P.A., Synth), sulfito de sódio (P.A., Neon), violeta cresil (Não identificado).

A 5,10,15,20-tetraquis(3-piridil)porfirina-21,23-dieta (H₂T3PyP) foi obtida no laboratório conforme descrito na literatura.⁷⁸

O álcool metílico (MeOH, P.A., Synth), o butanol (C₄H₁₀O, Merck) e a dimetilformamida (DMF, P.A., Synth) foram destilados e armazenados em recipientes com peneiras moleculares.

O éter etílico ((C₂H₅)₂O, 99%, Vetec) foi passado em uma coluna de alumina básica e guardado em um recipiente com peneiras moleculares.

O iodo foi sublimado duas vezes, obtendo cristais para uso nas sínteses.

O magnésio metálico (Mg, Sigma-Aldrich) foi colocado em uma solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ até remoção total da camada de óxido de magnésio, lavado com água destilada e seco na estufa a 100 °C.

Os meios de cultura RPMI 1640 com indicador e o RPMI 1640 sem indicador foram preparados pela Prof^a. Dr^a. Heveline Silva.

As peneiras moleculares (4 Å, Strem Chemicals) foram ativadas com o auxílio de um maçarico em um sistema com vácuo constante.

3.4 SÍNTESE DE PORFIRINAS E METALOPORFIRINAS

3.4.1 Obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirina-21,23-dieta, H₂T3EPyPCL₄.

A obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirina-21,23-dieta, H₂T3EPyPCL₄, foi realizada por adaptação do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017).⁶³ Em um balão de fundo redondo foram adicionados H₂T3PyP (200 mg; 0,323 mmol) e DMF (20 mL), e o sistema foi deixado em refluxo a 110 °C por 15 minutos, sob agitação magnética. Logo após, foi adicionado o *p*-toluenossulfonato de etila (*p*-TSE) (3,0 mL; 17,6

mmol) e a reação ocorreu por 48 horas, sendo monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD), usando SiO_2 como fase estacionária e uma mistura de $\text{KNO}_3(\text{sat}):\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (1:1:8) como fase móvel. Ao término da reação, verificado por CCD, após o sistema atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 20 mL de éter etílico ao balão e o sobrenadante foi vertido em um erlenmeyer. Foram adicionados 20 mL de éter etílico novamente aos dois frascos, e o sobrenadante foi vertido em outro erlenmeyer, repetindo-se este processo de adição de éter etílico até precipitação total da porfirina (aderida às paredes das vidrarias) e eliminação completa da DMF.

O precipitado resultante, aderido às paredes do balão e dos erlenmeyers, foi solubilizado em uma mínima quantidade de água e transferido para um erlenmeyer. A essa solução foi feita a adição, gota a gota, da solução aquosa de hexafluorofosfato de amônio (3 mol L^{-1}), até formação de um precipitado. A solução e o precipitado foram transferidos para um tubo de ensaio que foi centrifugado, sendo o sobrenadante descartado, e ao sólido foi adicionado éter etílico. O tubo de ensaio foi agitado no vórtex, centrifugado e o sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem do sólido foi repetido mais duas vezes.

Em seguida, foram adicionados 5 mL de acetona ao sólido, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e o solvente foi removido em um evaporador rotativo. Foram adicionados 15 mL de acetona ao sólido, levando à formação de uma solução, que foi transferida para um erlenmeyer e foi feita a adição, gota a gota, de uma solução saturada de cloreto de tetrabutílamônio (TBAC) (em acetona) até formação de um precipitado. A solução e o precipitado foram transferidos para um tubo de ensaio que foi centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado acetona. A mistura foi agitada no vórtex, centrifugada e o sobrenadante foi descartado. A etapa de lavagem do sólido foi repetida mais duas vezes.

Essa metátese de contra-íons (hexafluorofosfato e cloreto) foi repetida mais duas vezes. O sólido obtido ao final da purificação foi solubilizado em metanol, a solução foi vertida em um frasco vial, e o solvente foi eliminado em um evaporador rotativo, deixando-se, por fim, o sólido na estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 8 horas.

Rendimento da reação: 231,5 mg; 0,264 mmol; 81,7%

UV-Vis (H_2O), λ_{max} , nm (log ϵ): 417 (5,40); 514 (4,13); 582 (3,68).

RMN ^1H (D_2O): δ 9,89 (s, 4 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (s, 8 H, H_4 -piridil e H_6 -piridil), δ 9,19 e δ 9,00 (m, 8 H, β -pirrólico), δ 8,56 (s, 4 H, H_5 -piridil), δ 4,98 (s, 8 H, CH_2 etil), δ 1,86 (t, 12 H, J: 6,6 Hz, CH_3 etil).

Análise elementar: C, 50,01; H, 6,72; N, 9,70%. Calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{46}\text{Cl}_4\text{N}_8 \cdot 15\text{H}_2\text{O}$: C, 50,27; H, 6,68; N, 9,77%.

3.4.2 Obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirinatozinc(II), [Zn(T3EPyP)]Cl₄.

A obtenção da cloreto de 5,10,15,20-tetraquis(3-etilpiridil)porfirinatozinc(II), [Zn(T3EPyP)]Cl₄, foi realizada por adaptação do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017).⁶³ A porfirina base livre H₂TEPyPCl₄ (65,7 mg; 0,075 mmol) foi colocada em um béquer de 150 mL e solubilizada, sob agitação magnética, em 40 mL de água destilada (1,8 mmol L⁻¹). Utilizando um medidor de pH, foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 mol L⁻¹), gota a gota, até obter o pH 11,25. Em seguida, foi adicionado cloreto de zinco (0,217 g; 1,5 mmol) sólido. O pH da solução diminuiu para 5,11 e a reação ocorreu por 5 minutos. O curso da metalação foi acompanhado por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis).

Após o término da reação, verificada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, o composto foi purificado seguindo as etapas de precipitação, utilizando as soluções de hexafluorofostato de amônio e cloreto de tetrabutilamônio, conforme relatado no tópico 3.4.1 (pág. 18).

Rendimento da reação: 56,36 mg; 0,06 mmol; 80%

UV-Vis (H₂O), λ_{max}, nm (log ε): 429 (5,44); 558 (4,24); 598 (3,37).

RMN ¹H (D₂O): δ 9,82 (s, 4 H, H₂-piridil), δ 9,35 (s, 8 H, H₄-piridil e H₆-piridil), δ 9,03 (s, 8 H, β-pirrólico), δ 8,51 (s, 4 H, H₅-piridil), δ 4,97 (s, 8 H, CH₂ etil), δ 1,88 (s, 12 H, CH₃ etil).

Análise elementar: C, 45,92; H, 5,88; N, 8,86%. Calculado para C₄₈H₄₄Cl₄N₈Zn·18H₂O: C, 45,60; H, 6,38; N, 8,86%.

3.5 SÍNTESE DE PORFIRAZINAS E METALOPORFIRAZINAS

3.5.1 Obtenção da dinitrila 1,2-diciano-1,2-di(3-piridil)etileno

A síntese do 1,2-diciano-1,2-di(3-piridil)etileno (que será referido como “dinitrila” ao longo do texto para simplificação), foi realizada baseando-se no método descrito por Donzello e colaboradores (2014).⁷⁵ Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados: 3-piridilacetônitrila (0,618 g; 5,2 mmol), iodo bissublimado (1,285 g; 5,2 mmol) e éter etílico (5,0 mL). O balão foi tampado com um septo; em seguida, a agulha de uma seringa acoplada a uma bexiga com gás argônio, foi presa a ele (sistema I, Figura 9, pág. 21).

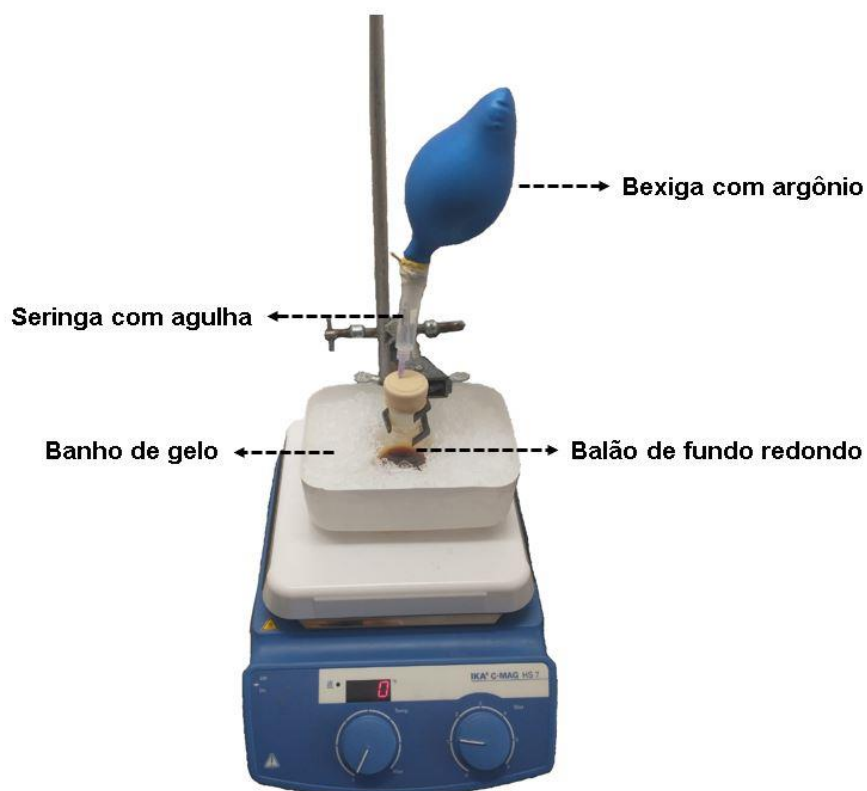


Figura 9 - Sistema usado para a obtenção da dinitrila.

Em um erlenmeyer contendo metanol (3,7 mL) foi adicionado cuidadosamente sódio metálico (0,252 g; 11 mmol) cortado em pequenos pedaços. O sistema foi agitado até a reação completa do sódio metálico, gerando uma solução de metóxido de sódio.

A solução de metóxido de sódio foi adicionada, gota a gota e com o auxílio de uma microseringa de 250 μL , ao sistema durante 30 minutos, sob agitação magnética e banho de gelo. Após a adição de toda a solução, a reação ocorreu por mais 30 minutos sob banho de gelo. O frasco contendo a solução resultante foi vedada com Parafilm® M e colocada no freezer por 1 hora. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo, utilizando um funil de Büchner, e o sólido retido no papel foi lavado com clorofórmio e água gelada, e colocado na estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 5 horas.

Rendimento da reação: 0,381 g; 1,64 mmol; 62,7%

UV-Vis (DMSO), λ_{max} , nm: 316

RMN ^1H (DMSO- D_6): δ 9,05 (s, 2 H, H₂-piridil), δ 8,82 (s, 2 H, H₆-piridil), δ 8,28 (d, 2 H, J: 7,0 Hz, H₄-piridil), δ 7,70 (s, 2 H, H₅-piridil).

3.5.2 Obtenção da octaquis(3-piridil)porfirazina, $H_2(3Py)_8Pz$.

A obtenção da octaquis(3-piridil)porfirazina, $H_2(3Py)_8Pz$, foi realizada baseando-se no método descrito por Donzello e colaboradores (2014).⁷⁵ Em um balão de fundo redondo foram adicionadas tiras de magnésio metálico (124,4 mg; 5,12 mmol), butanol (15,5 mL) e uma ponta de espátula de cristais de iodo. O sistema permaneceu em refluxo a 120 °C por 24 horas. Em seguida, foi adicionada a dinitrila (300,1 mg; 1,29 mmol) e a reação ocorreu em refluxo a 110 °C por 72 horas. Ao final deste tempo, a temperatura foi aumentada para 120 °C e argônio foi borbulhado até a remoção total do solvente. Em seguida, 20 mL de água destilada e algumas gotas de ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionados ao sólido, e o sistema foi deixado sob agitação magnética por 5 minutos. Em seguida a solução obtida foi vertida em um funil de separação.

Ao funil de separação foram adicionados 25 mL de clorofórmio e a primeira extração do produto foi realizada, sendo a fase orgânica descartada. Repetiu-se o processo de lavagem com clorofórmio até que a coloração amarronzada não fosse mais observada na fase orgânica. Na sequência, tendo apenas a fase aquosa no funil de separação, foram adicionados 15 mL de clorofórmio e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio saturada, agitando a solução até que fosse cessada a liberação de gases. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa filtrada a vácuo utilizando um funil de Büchner. O papel filtro foi deixado na estufa a 65 °C por 2 horas, picotado e colocado em um béquer contendo uma mistura 7:3 de $CHCl_3:MeOH$, a solução resultante foi transferida para um balão de fundo redondo, foi adicionado alumina básica e o solvente foi removido no evaporador rotativo, obtendo uma pastilha.

Posteriormente, foi realizada a purificação do produto por cromatografia em coluna (3 cm de diâmetro e 25 cm de altura). Como fase estacionária foi usada alumina neutra (6 cm, na parte inferior) e alumina básica (2 cm, na parte superior). Foi utilizada uma mistura de $CHCl_3:MeOH$ (99:1) como eluente inicial, para remover as impurezas restantes, por fim, o gradiente foi aumentado aos poucos até chegar em uma proporção 85:15 ($CHCl_3:MeOH$) para obter a $H_2(3Py)_8Pz$. As frações obtidas foram analisadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível e aquelas referentes à porfirazina foram transferidas para um balão de fundo redondo. O solvente foi removido em um evaporador rotativo e o balão foi deixado em um dessecador sob vácuo.

Rendimento da reação: 73,1 mg; 0,078 mmol; 24,3%

UV-Vis ($CHCl_3/MeOH$), λ_{max} , nm: 367; 592; 660.

RMN 1H (4:1 $CDCl_3:MeOD$): δ 9,43 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 8,82 (d, 8 H, J: 4,8 Hz, H_6 -piridil), δ 8,71 (d, 8 H, J: 7,7 Hz, H_4 -piridil), δ 7,83-7,80 (m, 8 H, H_5 -piridil).

3.5.3 Obtenção do cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazina, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$.

A síntese da cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazina, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$, foi realizada por adaptação do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017).⁶³ Em um balão de fundo redondo foram adicionados $H_2(3Py)_8Pz$ (32,37 mg; 0,035 mmol), DMF (1 mL) e *p*-TSE (1,72 g; 8,6 mmol). A reação ocorreu sob refluxo, a 120 °C, por 4 horas sob atmosfera de argônio. Após o término da reação, argônio foi borbulhado no sistema até que o volume da mistura fosse reduzido para 25% do valor inicial. A mistura resultante foi tratada de maneira idêntica a $H_2T3EPyPCl_4$ (tópico 3.4.1, pág. 18), adicionou-se 15 mL de éter etílico ao balão, verteu-se em um erlenmeyer a solução e foi adicionado éter etílico em ambos os frascos até a precipitação do produto. Na sequência, foi realizada a purificação por meio da reação de metátese de contra-íons.

Rendimento da reação: 45,28 mg; 0,03 mmol; 90%

UV-Vis ($CHCl_3/MeOH$), λ_{max} , nm: 370 (4,72); 649 (4,82).

RMN 1H (D_2O): δ 9,67 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,9 Hz, H_4 -piridil), δ 8,45 (m, 8 H, H_5 -piridil), δ 4,72 (CH_2 etil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH_3 etil).

3.5.4 Obtenção do cloreto de octaquis(3-etilpiridil)porfirazinatozinco(II), $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$.

A síntese do octaquis(3-etilpiridil)porfirazinatozinco(II), $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$, foi realizada por adaptação do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017).⁶³ Em um béquer foram adicionados a $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ (42 mg; 0,029 mmol), 15 mL de água destilada e uma solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 mol L^{-1} , gota a gota) até se obter uma solução com pH 11,20. Logo após, foi adicionado cloreto de zinco (0,0833 g; 0,61 mmol) e a reação ocorreu por 5 minutos, em que o pH da solução mudou para 5,11. O curso da reação de metalação foi acompanhado por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.

Após o término da reação, o composto foi purificado por metátese de contra-íons, utilizando as soluções de hexafluorofostato de amônio e cloreto de tetrabutylamônio, conforme relatado no tópico 3.4.1 (pág. 18).

Rendimento da reação: 25,0 mg; 0,017 mmol; 60%

UV-Vis ($CHCl_3/MeOH$), λ_{max} , nm: 373 (4,80); 580 (4,30); 632 (5,00).

RMN 1H (D_2O): δ 9,69 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,7 Hz, H_4 -piridil), δ 8,44 (t, 8 H, J: 6,9 Hz, H_5 -piridil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH_3 etil).

3.6 ESTUDOS FOTOFÍSICOS

3.6.1 Rendimento Quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ})

O valor de Φ_{Δ} de uma substância pode ser medido, por meio da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível, pelo acompanhamento da cinética de reação entre uma sonda molecular e oxigênio singleto produzido pela irradiação dessa substância. Para tal, em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 2,00 mL de solvente e uma barra magnética, sendo feita uma medida do branco. Em seguida, à mesma cubeta, foram adicionados 20 μ L da solução da substância (absorbância abaixo de 0,1 no comprimento de onda do laser a ser utilizado) e 20 μ L da sonda de $^1\text{O}_2$ (absorbância próxima a 1,0 no pico da banda mais intensa). O sistema foi agitado até homogeneização e o espectro de absorção na região do UV-Vis foi medido. Em seguida, a cubeta foi posicionada na chapa de agitação e a solução foi irradiada em intervalos de tempo definidos de maneira a obter 5 espectros de absorção até o decaimento de 30% da absorbância inicial da banda da sonda. Este experimento foi realizado em triplicata, e o mesmo procedimento foi adotado para a medição do padrão.

Nos experimentos realizados em água e acetonitrila foram utilizadas as sondas ABDA e DPBF, respectivamente. Sabendo que a $\text{H}_2\text{T3EPyP}\text{Cl}_4$ e $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ absorvem na mesma região do DPBF, foi necessário adicionar antes os compostos, fazer uma medida de branco e, logo após, adicionar a solução de DPBF na cubeta.

Nos experimentos com a $\text{H}_2\text{T3EPyP}\text{Cl}_4$ e $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$, o rosa bengala foi utilizado como padrão e a irradiação foi feita com o laser verde. Para a $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$ e $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$, o padrão usado foi o azul de metileno e o laser vermelho foi usado para irradiação. Na validação da metodologia foram utilizados o azul de metileno como padrão, o rosa bengala como substância a ter o valor de Φ_{Δ} determinado e o laser verde para a irradiação.

Conforme mostra na Figura 10 (pág. 25), foi desenvolvido um sistema de irradiação para a determinação do Φ_{Δ} , em que (1) é a caixa de madeira pintada de preto deixando o ambiente mais escuro possível e evitando refrações aleatórias do laser; (2) chapa de agitação magnética com marcação para o posicionamento da cubeta; (3) anteparo para bloqueio da irradiação; e (4) laser vermelho (648 nm).

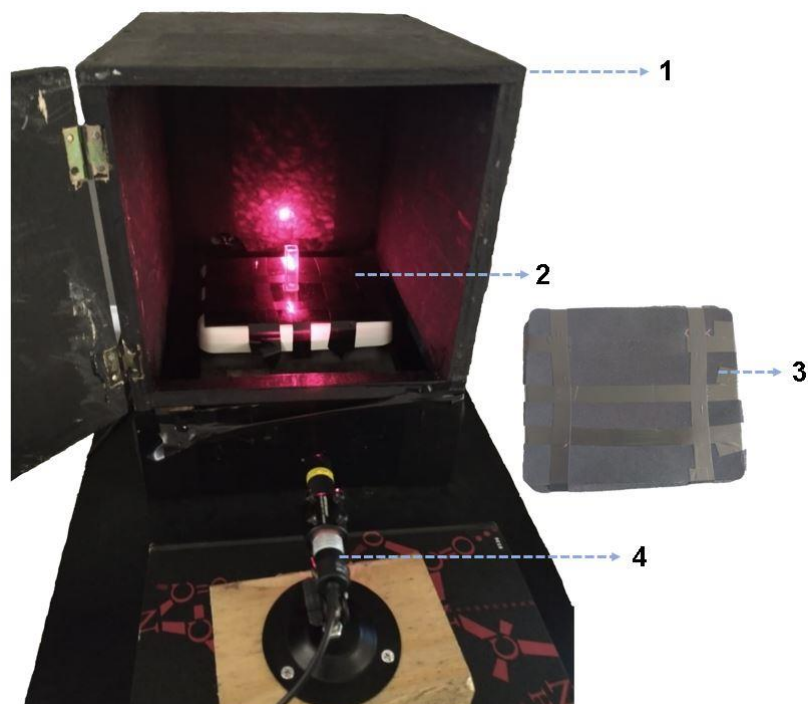


Figura 10 - Sistema de irradiação para experimentos de Φ_{Δ} , 1: Caixa de madeira; 2: chapa de aquecimento; 3: aparato para bloqueio do laser; 4: laser de irradiação.

3.6.2 Rendimento Quântico de fluorescência (Φ_F)

Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 3,00 mL de solvente e foi feita a medida do branco no espectrômetro de absorção na região do UV-Vis. Em seguida, foi adicionado o composto de interesse (absorbância próximo a 0,1 no comprimento de onda de excitação escolhido) à cubeta, o sistema foi homogeneizado, e foi feita a medida do espectro de absorção na região UV-Vis e de emissão. O composto foi adicionado à cubeta mais três vezes, sendo as medições dos espectros de absorção na região do UV-Vis e emissão realizadas em cada uma delas, de forma que a absorbância na última adição não ultrapassasse 0,3. O mesmo procedimento foi adotado para o padrão violeta cresil, porém, a absorbância no comprimento de onda de excitação foi ajustado de forma a não ultrapassar 0,1. O experimento foi repetido mais duas vezes para cada composto e para o padrão.

Esses experimentos foram feitos em acetonitrila e água, o comprimento de onda escolhido para a excitação da $H_2T3EPyP\text{Cl}_4$ e $[Zn(T3EPyP)]\text{Cl}_4$ foi de 577 nm, registrando o espectro de 590 a 800 nm. Para a $H_2(3EPy)_8\text{PzCl}_8$ e $[Zn(3EPy)_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ a excitação foi em 590 nm e o espectro registrado de 600 a 800 nm. Dessa forma, para o violeta cresil foi feito um experimento com excitação em 577 nm e outro em 590 nm.

3.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pela Prof^a. Dr^a. Heveline Silva no Departamento de Química da UFMG. As células tumorais de melanoma não-metastático (B16F1) utilizadas nos experimentos foram cultivadas a 37 °C em garrafas de 25 cm² em meio de cultura RPMI 1640 com indicador suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) em pH 7,4, atmosfera úmida a 5% de CO₂. Para aplicação dos compostos H₂T3EPyPCL₄, [Zn(T3EPyP)]Cl₄, H₂(3EPy)₈PzCl₈ e [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈ nos poços, foram preparadas soluções estoque (1 × 10⁻² mol L⁻¹) dos mesmos em água Milli-Q®.

3.7.1 Uptake celular

Com o intuito de se determinar o tempo mínimo de incubação das células com os compostos, de forma a atingir maior incorporação celular, foram feitos experimentos no meio celular RPMI 1640 com indicador e em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. Em placas de 6 poços, foram adicionados 3,6 × 10⁵ células/poço, que foram deixadas na estufa por um período de incubação de 24 horas para adesão. Logo após, o sobrenadante foi removido e as soluções de 4 μM dos compostos de interesse em meio celular RPMI 1640 com indicador foram adicionadas aos poços, retornando as placas para a estufa. Alíquotas das soluções de 4 μM sem a presença de células foram armazenadas em um tubo Falcon na estufa para controle e uma solução contendo apenas células no meio de cultura foi armazenada para realização do branco no UV-Vis. Por fim, foram feitas medidas no espectrômetro de absorção na região do ultravioleta e visível da solução controle e do sobrenadante dos poços nos tempos de 1, 3, 6 e 24 horas, sendo que foram adicionados 1,00 mL de DMSO e 1,00 mL da solução do poço na cubeta previamente à medida.

O experimento em PBS foi feito de forma similar, porém a adição dos compostos foi feita em solução de PBS pH 7,4, com tempo de exposição de 3 horas, sendo necessário centrifugar o sobrenadante do poço em um microtubo antes de realizar a análise no espectrômetro de absorção na região do UV-Vis.

3.7.2 Teste de interação com o meio celular RPMI 1640 com indicador

Em microtubos foi adicionado soluções 10 μM dos compostos solubilizados em meio de cultura RPMI 1640 com indicador suplementados com diferentes concentrações de SFB (0, 2,5, 5 e 10%), sendo armazenados em um banho-maria a 37 °C. Mediu-se o espectro de absorção na região do UV-Vis nos tempos 0, 1, 3 e 24 horas, fixando o comprimento de onda no pico de maior intensidade de cada composto.

3.7.3 Viabilidade celular

As células foram distribuídas em placas de 96 poços com densidade de $1,0 \times 10^3$ células/poço, por um período de incubação de 24 horas para adesão. A partir das soluções estoque, soluções de 100 μM em meio de cultura foram preparadas, e posteriormente diluídas para as concentrações de 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; e 0,01 μM . As soluções foram adicionadas aos poços, as placas foram cobertas com papel alumínio e levadas para a estufa. Depois de 24 horas de incubação com os compostos, o sobrenadante foi removido e o meio de cultura RPMI 1640 sem indicador foi adicionado. A placa de viabilidade celular no escuro foi guardada na estufa e a placa de viabilidade celular no claro foi irradiada por 1 hora ($\approx 22 \text{ J cm}^{-2}$) no sistema de LEDs. Logo após, o sobrenadante dos poços de ambas as placas, foi substituído por meio de cultura com indicador, e as placas foram recobertas com papel alumínio e deixadas na estufa por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com MTT a 50 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}/\text{poço}$ por 4 horas, o sobrenadante foi removido, e 100 μL de DMSO foram adicionados em cada poço para a leitura espectrofotométrica em 570 nm no leitor de placas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

4.1.1 Porfirina $H_2T3EPyP$

A síntese da porfirina base livre $H_2T3EPyP$ já foi relatada na literatura.^{67,79,80} Porém, optou-se por adaptar a metodologia descrita por Alenezi e colaboradores (2017),⁶³ pois ela descreve a obtenção desse composto no estado sólido, utilizando apenas éter etílico para remover a DMF, enquanto nas outras metodologias, realizam uma extração em água destilada e clorofórmio⁶⁷, ou utilizam como reagente de etilação, o iodoetano⁷⁹. Obteve-se a $H_2T3EPyP$ a partir da reação de etilação da porfirina H_2T3PyP com tosilato de etila, utilizando DMF como solvente (Figura 11).

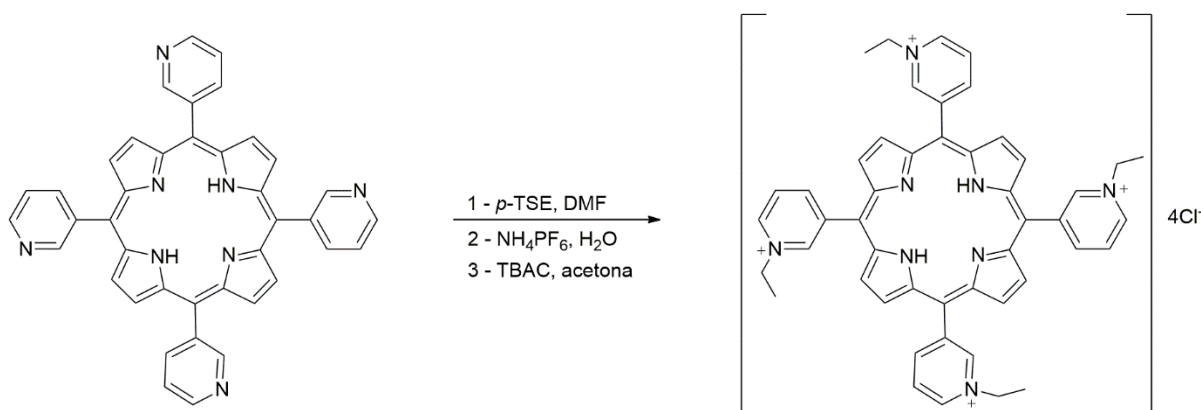


Figura 11 - Esquema da reação de obtenção da porfirina $H_2T3EPyP$. *p*-TSE: *p*-toluenossulfonato de etila; TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.

A alquilação completa dos grupos piridil foi verificada por CCD, uma vez que o composto tetra-catiônico tem maior polaridade ($R_f = 0,22$) que a H_2T3PyP e os demais compostos parcialmente alquilados.⁶⁷

O produto obtido apresenta os ânions tosilato como contra-íons, porém, esses compostos catiônicos são usualmente caracterizados na literatura com o contra-íon cloreto.^{62,63,64,65,68,69,70} Dessa forma, a solução em DMF obtida na reação é lavada com éter etílico para remover toda a DMF, pois na metátese de íons não pode haver resquícios desse solvente, visto que ele solubilizaria o sólido com os contra-íons hexafluorofosfato (PF_6^-).

A porfirina $H_2T3EPyP(PF_6)_4$ sólida, obtida a partir da reação de metátese com os íons PF_6^- em meio aquoso, foi lavada várias vezes com éter etílico, no intuito de remover o excesso utilizado de NH_4PF_6 . Para eliminar resquícios de água do sólido, a porfirina $H_2T3EPyP(PF_6)_4$ foi solubilizada em acetona e o solvente foi eliminado sob pressão reduzida. Logo após, a

porfirina foi solubilizada novamente em acetona e foi feita a metátese com íons cloreto (Cl⁻), sendo a porfirina H₂T3EPyPCl₄ lavada repetidas vezes com acetona para remover o excesso de TBAC utilizado.

A caracterização da H₂T3EPyPCl₄ por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis em água (Figura 12), indicou um deslocamento mínimo da banda Soret (417 nm) e a presença de apenas duas bandas Q (514 e 581 nm), quando comparado ao espectro da H₂T3PyP em clorofórmio. Considerando apenas o macrociclo sem os substituintes, a porfirina base livre tem simetria D_{2h} e tende a ter quatro bandas Q,^{81,82} conforme é visto para a H₂T3PyP.⁸³ Mas isso não ocorre para a H₂T3EPyPCl₄, pois pode estar ocorrendo uma sobreposição das bandas Q, devido a uma possível alteração energética nos orbitais após a quaternização do átomo de nitrogênio dos grupos piridil. O espectro obtido é semelhante ao que já foi relatado na literatura para esse composto.⁶⁷

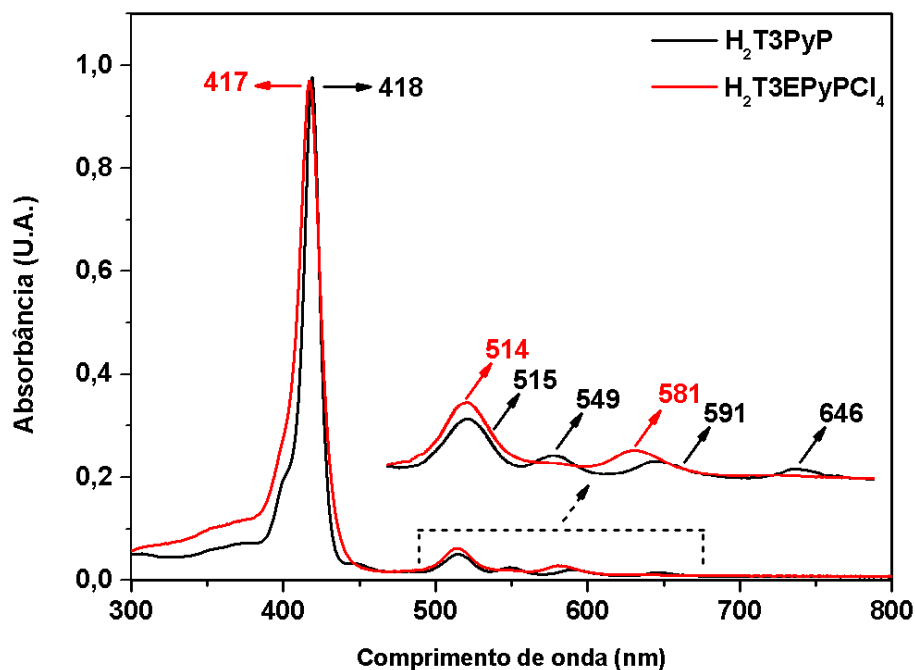


Figura 12 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para H₂T3PyP ($4,55 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em clorofórmio e para H₂T3EPyPCl₄ ($3,87 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em água.

O espectro de RMN ¹H da H₂T3EPyPCl₄ (Figura 13, pág. 30) indicou que houve uma sobreposição de sinais dos átomos de hidrogênio H₄-piridil e H₆-piridil em $\delta = 9,40$ ppm e que ocorreu a alquilação completa do composto pela presença dos sinais em $\delta = 4,98$ ppm referentes aos oito átomos de hidrogênio do CH₂ da etila e em $\delta = 1,86$ ppm referente aos doze átomos de hidrogênio do CH₃ da etila. Em $\delta = 4,75$ ppm encontra-se o sinal referente a água em D₂O.⁸⁴ Para a H₂T3PyP é relatado um sinal em $\delta = -2,81$ ppm referente aos átomos de hidrogênio *N*-pirrólicos,⁸³ que não é visto para a H₂T3EPyPCl₄. Sugere-se que isso ocorra,

pois o D₂O atua como uma base e consegue estabelecer um equilíbrio ácido-base com os átomos de hidrogênio *N*-pirrólicos, ou pode ocorrer a troca dos átomos de deutério por átomos de hidrogênio. Esse mesmo comportamento foi verificado em RMN ¹H em D₂O de outras porfirinas.^{85,86,87}

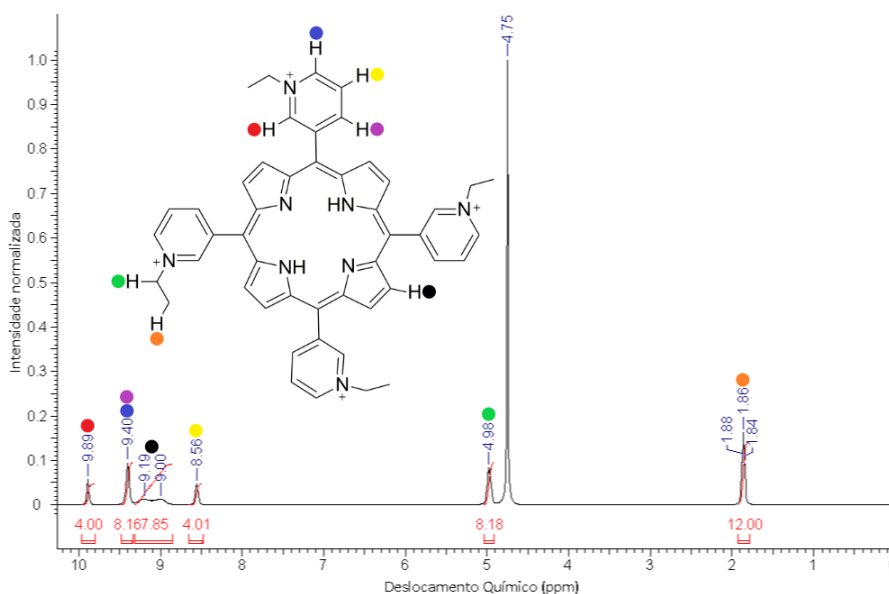


Figura 13- Espectro de RMN ¹H da H₂T3EPyPCL₄ obtido em D₂O a 25 °C. δ 9,89 (s, 4 H, H₂-piridil), δ 9,40 (s, 8 H, H₄-piridil e H₆-piridil), δ 9,19 e δ 9,00 (m, 8 H, β -pirrólico), δ 8,56 (s, 4 H, H₅-piridil), δ 4,98 (s, 8 H, CH₂ etil), δ 1,86 (t, 12 H, J: 6,6 H, CH₃ etil).

A caracterização do composto utilizando a técnica MALDI-TOF MS no modo positivo (Figura 14, pág. 31) mostrou um pico em 876 referente à espécie [H₂T3EPyPCL₄]^{•+}, os picos em 848; 820 e 790 são referentes a substituição de um, dois e três grupos etila por íons H⁺ respectivamente. Os picos em 731; 703; 675 e 647 são referentes às espécies de porfirina tetra-, tri-, di- e mono etiladas, respectivamente, sem a presença do contra-íon cloreto e há sobreposição de picos entre fragmentos com massa semelhante, envolvendo espécies com e sem os átomos de hidrogênio *N*-pirrólicos, conforme mostra a Figura 15 (pág. 31).

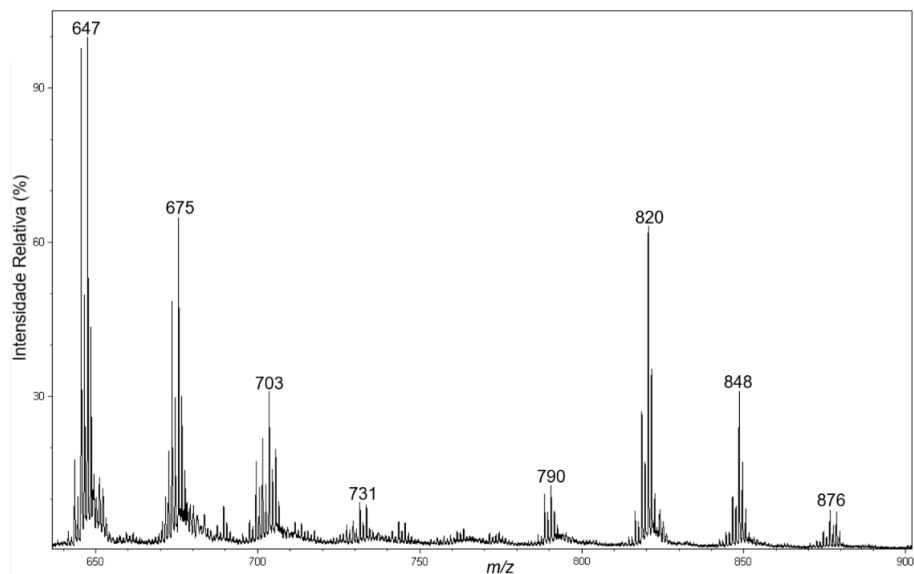


Figura 14 - Espectro de massas da $H_2T3EPyPCl_4$ obtido por meio da técnica de MALDI-TOF MS. Matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, preparada em MeCN/TFA (1%).

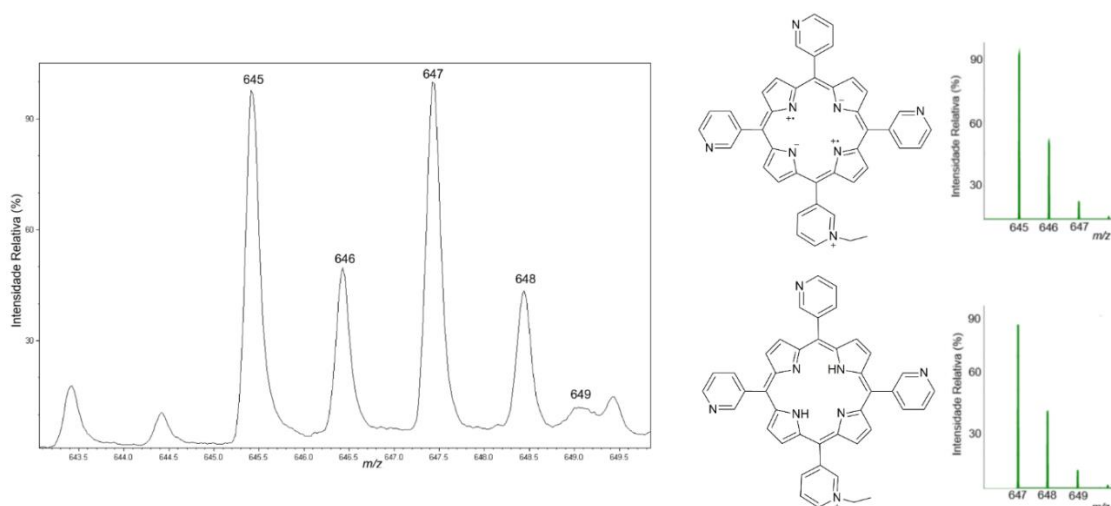


Figura 15 - Fragmentos da $H_2T3EPyPCl_4$ com massas semelhantes e suas respectivas simulações feitas no software ChemCalc (disponível em <http://www.chemcalc.org/>).

A análise termogravimétrica da $H_2T3EPyPCl_4 \cdot 15H_2O$ (Figura 16, pág. 32) mostrou 3 processos de perda de massa. O primeiro deles se trata da desidratação, sendo visto de 35,81 até 166,63 °C uma perda de 19,274% de massa, que equivale a doze moléculas de água, sendo 18,848% a perda teórica desse processo. Já é relatado que para as porfirinas alquilpiridil é comum encontrar de dez a vinte moléculas de água em sua composição.^{88,89,90,91} O segundo processo tem uma perda de massa de 25,809% na faixa de 167,88 até 356,81 °C, referente a desalquilação (saída de etilas e cloretos) e de duas moléculas de água, sendo 25,624% a perda teórica desse processo. O último processo que está na faixa de 356,19 até

594,22 °C é referente à decomposição do macrociclo porfirínico, resultando em 53,861% de perda de massa experimental e 53,941% teórico.

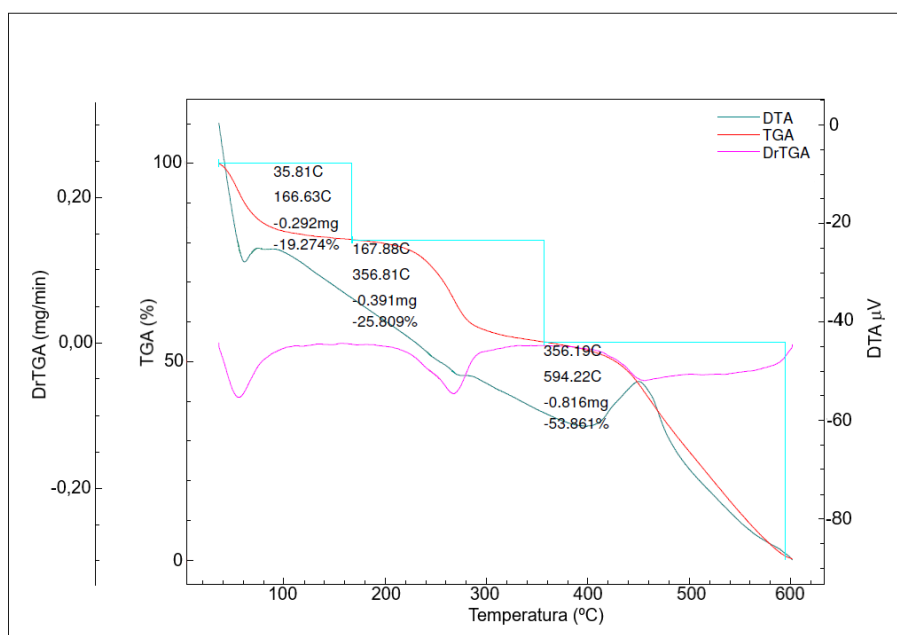


Figura 16 - Análise de decomposição termogravimétrica da $H_2TEPyCl_4$ em cadinho de alumina, sob atmosfera de ar sintético e razão de aquecimento de 10 °C por minuto.

4.1.2 Metaloporfirina $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$

A metaloporfirina inédita $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ foi obtida a partir da metalação da $H_2T3EPyP$ com cloreto de zinco em meio aquoso (Figura 17), de acordo com adaptações do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017)⁶³. Durante a reação de metalação, a elevação do pH para 11,25 foi necessária para facilitar a desprotonação da porfirina base livre.

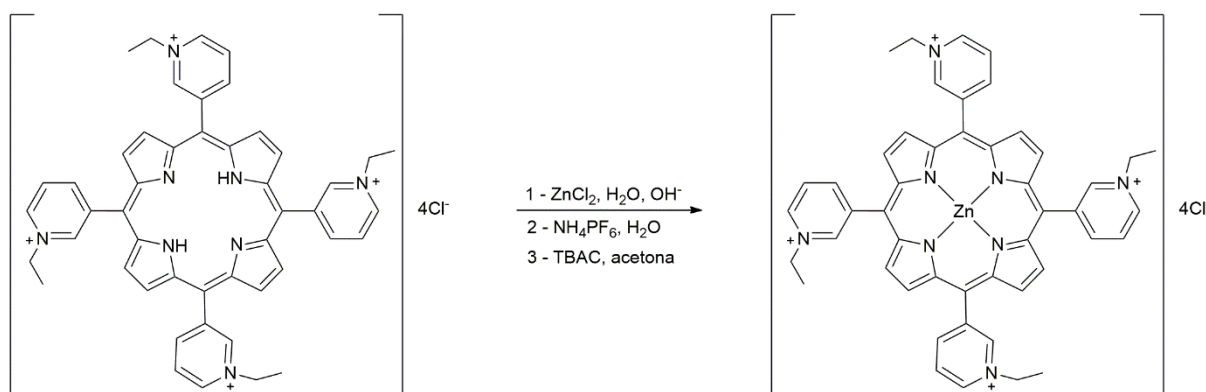


Figura 17 - Esquema da reação de obtenção da metaloporfirina $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$. TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.

O término da reação de metalação foi verificado por meio da espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, em que a Figura 18 refere-se ao espectro da metaloporfirina após a metátese de contra-íon. No espectro observa-se um deslocamento batocrômico da banda Soret (429 nm) e das bandas Q (558 e 598 nm), sendo que esse comportamento é descrito para outras metaloporfirinas de zinco na literatura.^{62,92} Além disso, a banda Q menos energética sofreu uma diminuição significativa de intensidade.

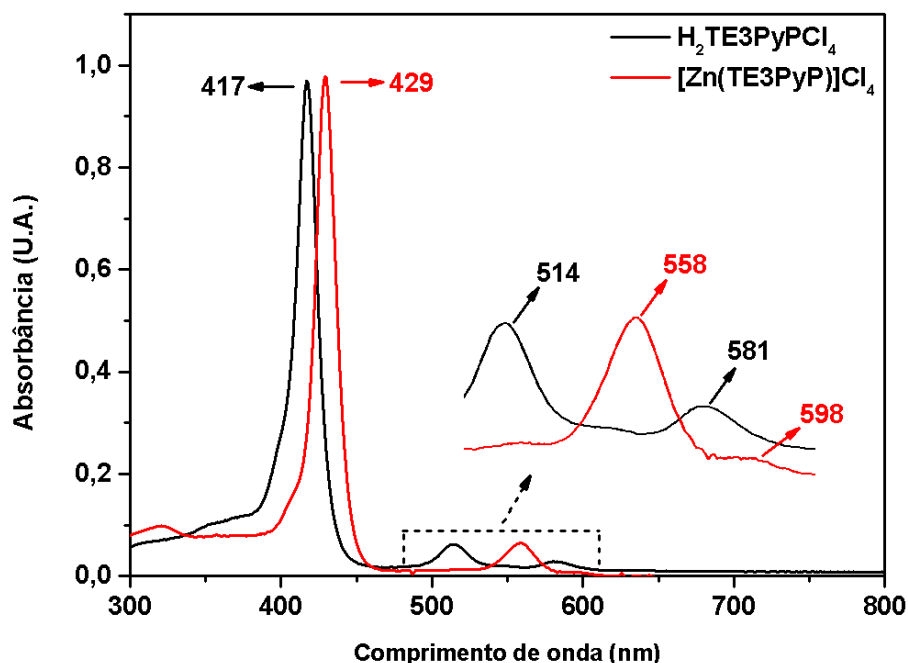


Figura 18 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para a $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ ($3,87 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ ($3,48 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em água.

A caracterização por RMN ^1H da $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ (Figura 19, pág. 34), mostrou que os sinais vistos para a $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ (Figura 13, pág. 30) se mantiveram, porém, tendo um menor deslocamento químico nos átomos de hidrogênio piridínicos. Sugere-se que esse menor deslocamento químico seja pela inserção do centro metálico no macrociclo, pois o zinco fornece densidade eletrônica para a molécula, tornando os átomos de hidrogênio mais blindados, sendo que esse fenômeno pode ser observado para outras metaloporfirinas de zinco.^{51,93,94,95} O único sinal que se desdobrou de maneira diferente no espectro da $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$, foi o dos átomos de hidrogênio β -pirrólicos em $\delta = 9,03 \text{ ppm}$, sendo que no espectro da $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ aparece em $\delta = 9,00$ e $9,19 \text{ ppm}$. Para justificar essa diferença, sugere-se que exista uma carga negativa em ressonância no macrociclo, devido a remoção de um dos átomos de hidrogênio N -pirrólicos pelo solvente, de forma a afetar o desdobramento do sinal referente aos átomos de hidrogênio β -pirrólicos da $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$. O sinal referente a água em D_2O em $\delta = 4,75 \text{ ppm}$ está de acordo com a literatura.⁸⁴

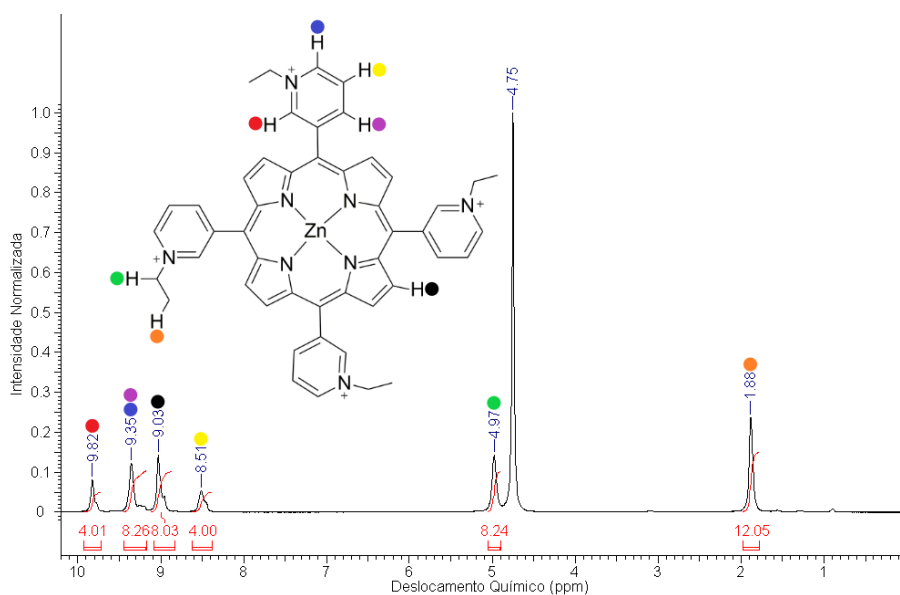


Figura 19 - Espectro de RMN ¹H da [Zn(T3EPyP)]Cl₄ obtido em D₂O a 25 °C. δ 9,82 (s, 4 H, H₂-piridil), δ 9,35 (s, 8 H, H₄-piridil e H₆-piridil), δ 9,03 (s, 8 H, β-pirrólico), δ 8,51 (s, 4 H, H₅-piridil), δ 4,97 (s, 8 H, CH₂ etil), δ 1,88 (s, 12 H, CH₃ etil).

A Figura 20 (pág. 35) mostra o espectro de massas da [Zn(T3EPyP)]Cl₄ (M) utilizando a técnica MALDI-TOF MS no modo positivo. O pico em 938 é referente à espécie [M]^{•+} e em 940 é a [M + 2H]^{•+}. Os picos em 910 e 882 são referentes a espécies com substituição de um e dois grupos etil por íons H⁺, respectivamente, além disso, também existem fragmentos com massas semelhantes, igual demonstrado para o pico 938 e 940. Os picos em 795; 765; 737, e 709 são referentes aos compostos tetra-, tri-, di- e mono etilados, respectivamente, sem a presença dos contra-íon cloreto e também há fragmentos com massa semelhante conforme relatado para a H₂TEPyPCL₄ (Figura 15, pág. 31).

A análise termogravimétrica da [Zn(T3EPyP)]Cl₄·18H₂O (Figura 21, pág. 35) mostrou um comportamento parecido com o da H₂TEPyPCL₄, porém com o surgimento de mais um processo. No primeiro processo ocorreu uma perda de 14,767% de massa, que equivale a 10 moléculas de água, sendo 14,248% a perda teórica desse processo. O segundo processo teve uma perda de massa de 28,387%, que equivale a desalquilação mais 6 moléculas de água, sendo 28,939% a perda teórica desse processo. A porcentagem 33,620% vista no terceiro processo, representa a perda parcial do macrociclo e no último processo ocorre a perda restante do macrociclo. Esses fenômenos foram bem semelhantes ao que já é relatado na literatura para a metaloporfirina de manganês 2-etilpiridil.⁸⁸

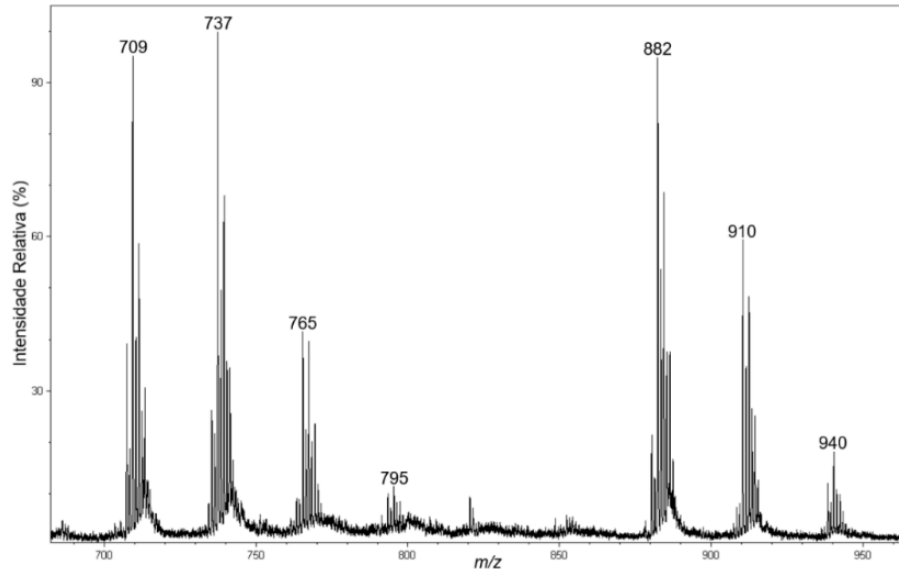


Figura 20 - Espectro de massas da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ obtido por meio da técnica MALDI-TOF MS. Matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, preparada em MeCN/TFA (1%).

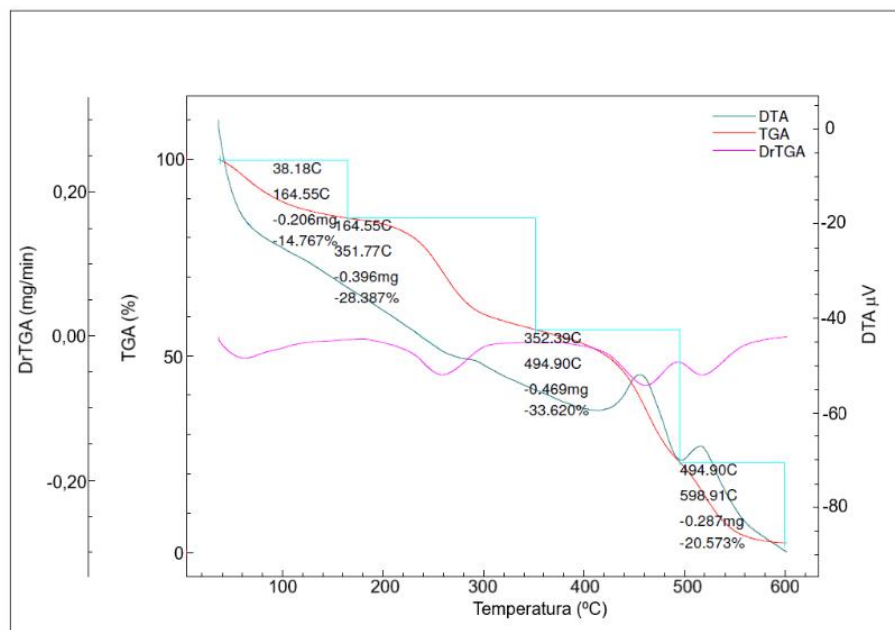


Figura 21 - Análise de decomposição termogravimétrica da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ em cadinho de alumina, sob atmosfera de ar sintético e razão de aquecimento de $10^{\circ}C$ por minuto.

4.1.3 Dinitrila

A dinitrila foi sintetizada pela primeira vez por Niyomura e colaboradores (2008)⁹⁶, sendo obtida com baixo rendimento, pois era um subproduto da reação. A formação dessa molécula, neste presente trabalho, ocorreu a partir da reação da 3-piridilacetoneitrila, iodo e

metóxido de sódio utilizando éter etílico como solvente, a partir de adaptações do método descrito por Donzello e colaboradores (2014)⁷⁵ e Yeh colaboradores 2004 (Figura 22)⁹⁷.

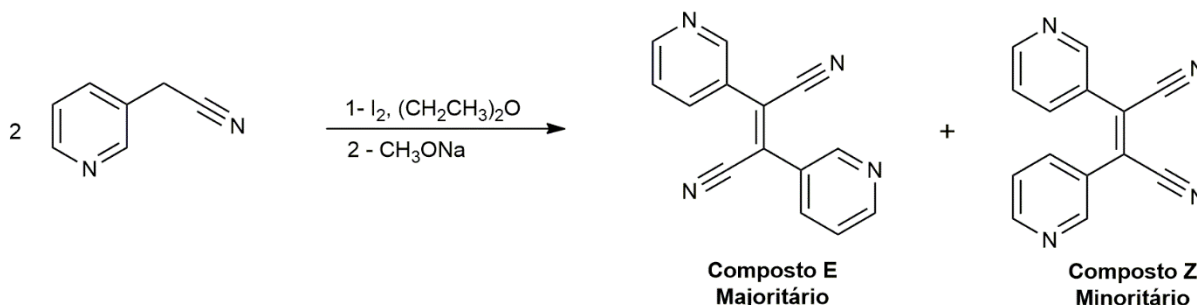


Figura 22 - Esquema da reação de obtenção da dinitrila.

Já é relatado na literatura que a adição de um excesso de 50% de metóxido de sódio (3 mol de metóxido de sódio para 2 mol de dinitrila), leva a um produto de ciclização intramolecular, que é um intermediário da maleimida (Figura 48, pág. 79, Apêndice C),⁹⁷ assim, optou-se por adicionar um excesso de 10% e fazer uma adição lenta (gota a gota). Nesse método, verificou-se experimentalmente, que o rendimento e a massa de produto sólido são maiores, sendo desnecessário realizar uma extração com o sobrenadante da reação. O sólido é lavado com água gelada para remover o iodeto de sódio formado na reação.

Para verificar a pureza do reagente de partida, a 3-piridilacetonitrila, e comprovar a obtenção da dinitrila por comparação de sinais de átomos de hidrogênio, foi feito o RMN ¹H (Figura 23, pág. 37), em que os sinais obtidos se assemelham ao que já é relatado na literatura.⁹⁸ Nesse espectro, visualmente temos um multiplete em maior deslocamento químico, que na verdade se trata de um singlete em $\delta = 7,50$ ppm, referente ao H₂-piridil e um duplete em $\delta = 7,48$ ppm, referente ao H₄-piridil. O sinal em $\delta = 3,03$ ppm indica a presença do CH₂, pois devido a hibridação sp³ do átomo de carbono, os átomos de hidrogênio ligados a ele têm menor deslocamento químico. O sinal em $\delta = 2,50$ ppm referente ao DMSO no DMSO-d₆ também foi identificado.⁸⁴

A Figura 24 (pág. 37) apresenta o espectro de RMN ¹H da dinitrila, sendo que os valores dos deslocamentos químicos referentes aos átomos de hidrogênio da molécula, são próximos ao que já foi relatado na literatura.⁹⁶ Existem quatro sinais de menor intensidade que se assemelham aos quatro sinais de maior intensidade, que indicam a existência de uma mistura de isômeros, a fumaronitrila (composto E) e a maleonitrila (composto Z). Sabe-se que o produto em excesso é a fumaronitrila, pois os seus átomos de hidrogênio são mais desblindados que os átomos de hidrogênio da maleonitrila.^{97,99} O sinal em $\delta = 3,32$ ppm referente a água e em $\delta = 2,50$ ppm referente ao DMSO foram identificados no DMSO-d₆.⁸⁴

Ao se comparar o espectro da dinitrila com o da 3-piridilacetoneitrila, nota-se que há um maior deslocamento químico dos sinais, pois a dinitrila tem uma conjugação π maior, tornando os átomos de hidrogênio mais desblindados.

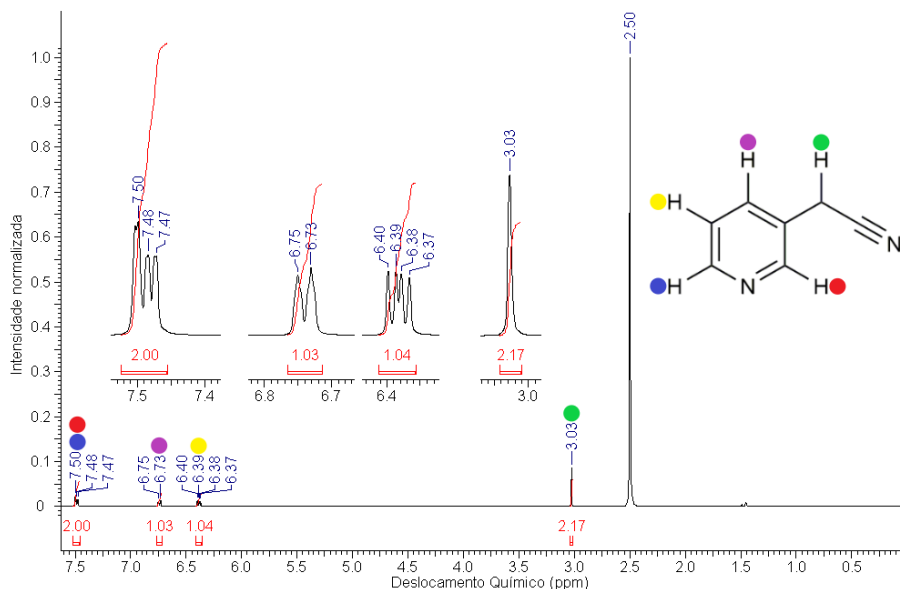


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H da 3-piridilacetoneitrila em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ a 25 °C. δ 7,50-7,47 (m, 2 H, H₂-piridil e H₄-piridil), δ 6,73 (d, 1 H, J: 7,8 Hz, H₆-piridil), δ 6,40 - 6,37 (m, 1 H, H₅-piridil), δ 3,03 (s, 2 H, CH₂).

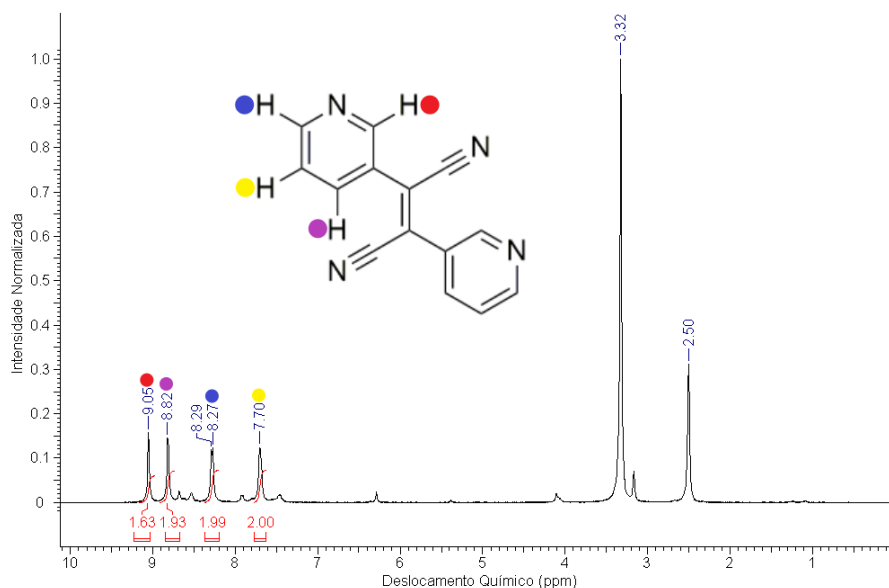


Figura 24 - Espectro de RMN ^1H da dinitrila em $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ a 25 °C. δ 9,05 (s, 2 H, H₂-piridil), δ 8,82 (s, 2 H, H₆-piridil), δ 8,28 (d, 2 H, J: 7,0 Hz, H₄-piridil), δ 7,70 (s, 2 H, H₅-piridil).

4.1.4 Porfirazina $H_2(3Py)_8Pz$

A porfirazina $H_2(3Py)_8Pz$ inédita foi obtida em duas etapas (Figura 25). Na primeira etapa o magnésio metálico foi deixado em refluxo com o butanol para formar o butóxido de magnésio, e na sequência foi adicionada a dinitrila, formando a $[Mg(3Py)_8Pz]$. A ideia inicial era isolar essa metaloporfirazina, mas devido à dificuldade na solubilização do composto, optou-se por realizar a segunda etapa por adaptação da metodologia descrita por Izquierdo e colaboradores (2015).¹⁰⁰ Dessa forma, após a primeira reação finalizar, o solvente da reação foi eliminado por fluxo de argônio e foi adicionada uma pequena quantidade de água e TFA para que ocorresse a desmetalização, formando assim, a porfirazina base livre ($H_2(3Py)_8Pz$).

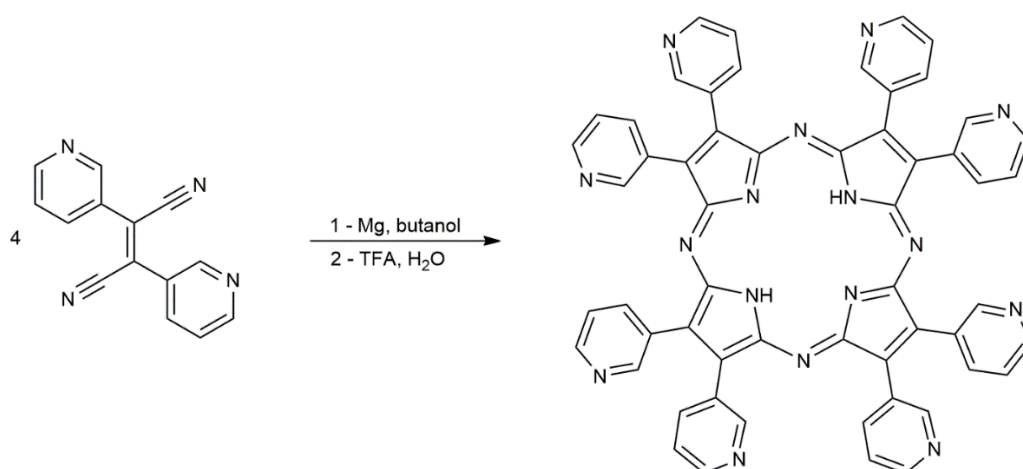


Figura 25 - Esquema da reação de obtenção da porfirazina $H_2(3Py)_8Pz$. TFA: ácido trifluoroacético.

Na sequência, foi realizada a extração com água destilada e clorofórmio, em que a $H_2(3Py)_8Pz$ ficou dissolvida na fase aquosa devido à protonação dos grupos piridil e átomos de nitrogênio pirrólicos em meio ácido, e uma parte dos subprodutos permaneceu na fase orgânica, sendo descartada. A extração com água destilada e clorofórmio foi repetida, acrescentando-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio para desprotonar a $H_2(3Py)_8Pz$. Após a neutralização total, a $H_2(3Py)_8Pz$ precipitou, sendo a mistura filtrada a vácuo. O sólido obtido foi lavado com clorofórmio e água destilada. Foi verificado por CCD, que ainda existiam impurezas no produto obtido, dessa forma, foi feita uma purificação por cromatografia em coluna.

O rendimento dessa reação é consideravelmente baixo, pois o isômero E da dinitrila não forma o macrociclo, e a isomerização para a conformação Z durante a síntese ocorre apenas parcialmente. Existem algumas estratégias que podem ser adotadas para a conversão de isômeros E/Z, como por exemplo, a exposição do composto a luz ultravioleta e a elevação da temperatura.⁹⁹ Ambas foram testadas, mas não se obteve uma alta taxa de conversão em nenhuma delas.

A caracterização por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (Figura 26), mostrou que a $H_2(3Py)_8Pz$ tem uma banda B (366 nm) e duas bandas Q (592 e 660 nm), sendo muito semelhante ao que já é relatado na literatura para a $H_2(2Py)_8Pz$.⁷⁶

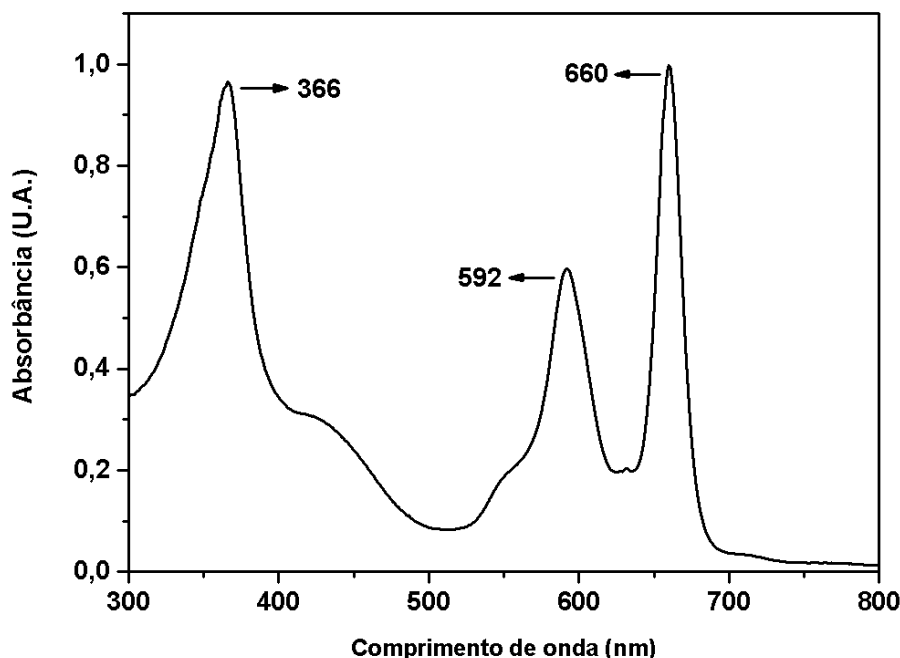


Figura 26 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para a $H_2(3Py)_8Pz$ em 4:1 $CHCl_3:MeOH$.

O espectro de RMN 1H (Figura 27, pág. 40) da $H_2(3Py)_8Pz$ foi feito em uma mistura de solventes, 8:2 de $CDCl_3:MeOD$, devido à baixa solubilidade nos solventes puros. Os sinais referentes aos átomos de hidrogênio da molécula seguem a mesma ordem do espectro de RMN 1H da dinitrila (Figura 24, pág. 37), apenas tendo maior deslocamento químico, devido ao aumento da conjugação π , que desblindou mais os átomos de hidrogênio. O sinal referente a clorofórmio em $CDCl_3$ foi verificado em $\delta = 7,27$ ppm, já o sinal de metanol e água em $CDCl_3$ não seguem os valores descritos na literatura,⁸⁴ pois como há MeOD, o deslocamento foi afetado. O sinal característico de porfirazinas referente aos átomos de hidrogênio pirrólicos em deslocamento químico negativo,⁷⁶ não foi verificado, devido ao mesmo efeito já relatado para a $H_2TE3PyPCL_4$ (tópico 4.1.1, pág. 28).

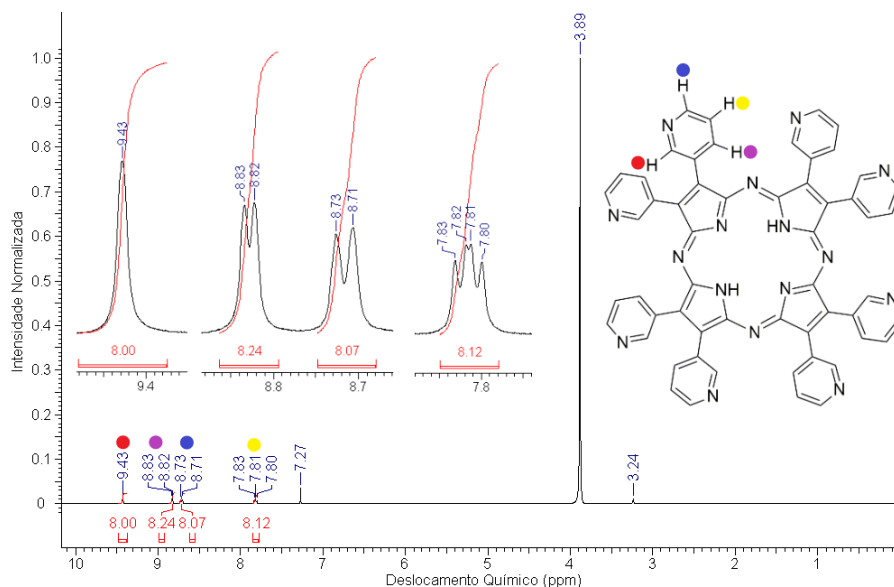


Figura 27- Espectro de RMN ^1H da $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ em 4:1 $\text{CDCl}_3:\text{MeOD}$ a 25 °C. δ 9,43 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 8,82 (d, 8 H, J: 4,8 Hz, H_6 -piridil), δ 8,71 (d, 8 H, J: 7,7 Hz, H_4 -piridil), δ 7,83-7,80 (m, 8 H, H_5 -piridil).

A Figura 28 mostra o espectro de massas utilizando a técnica MALDI-TOF MS, no modo negativo e sem matriz, para a $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ (M), sendo que o pico em 930,3184 pode ser atribuído à espécie $[\text{M}]^{\bullet-}$. A simulação feita no software ChemCalc reforça que estrutura proposta é condizente. Além disso, acredita-se que uma sobreposição de sinais, devido a presença da espécie $[\text{M} - \text{H}]^-$, que tem um pico em 929 (forte), 930 (médio), 931 (fraco).

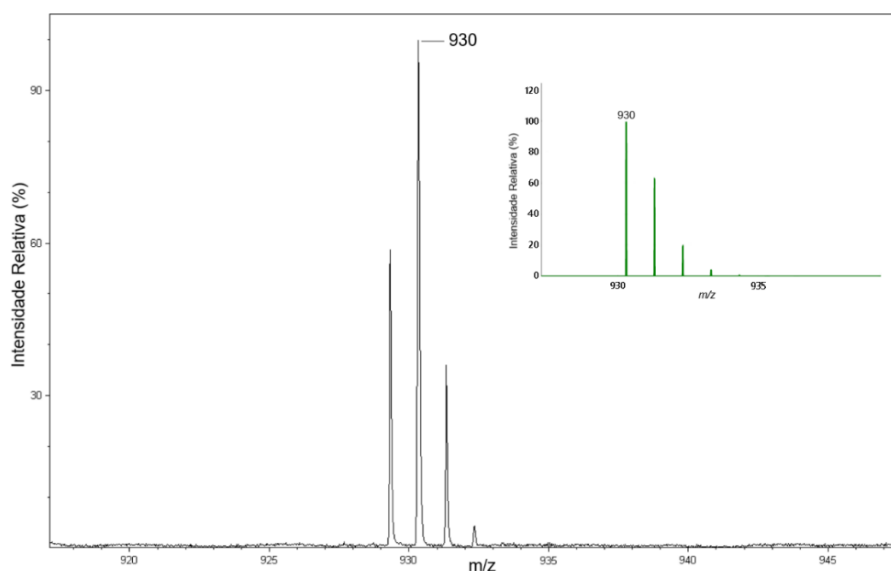


Figura 28 - Espectro de massas da $\text{H}_2(3\text{Py})_8\text{Pz}$ obtido por meio da técnica MALDI-TOF MS, sem o uso matriz.

4.1.5 Porfirazina $H_2(3EPy)_8PzCl_8$

A obtenção da porfirazina $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ inédita ocorreu por adaptações do método descrito por Alenezi e colaboradores (2017)⁶³. Durante o processo de síntese, a $H_2(3Py)_8Pz$ foi deixada em refluxo com *p*-TSE e DMF por quatro horas (Figura 29). Na sequência, foi borbulhado argônio na solução para eliminar o excesso de DMF. Vale ressaltar que a $H_2(3EPy)_8Pz^{8+}$ só é obtida com alto rendimento se a etapa de borbulhamento de argônio for efetuada, caso o contrário, os produtos com menos alquilações são majoritários.

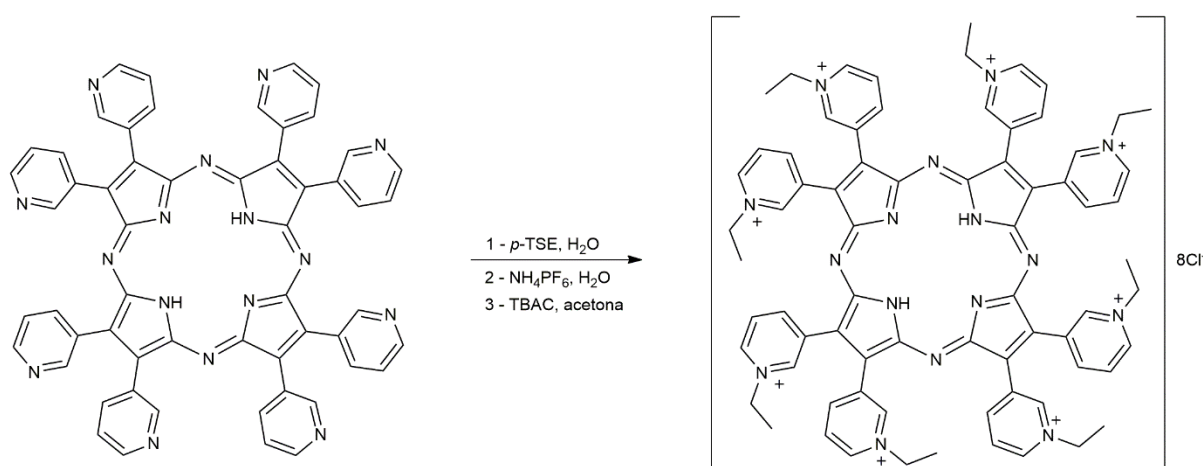


Figura 29 - Esquema da reação de obtenção da porfirazina $H_2(3EPy)_8PzCl_8$. *p*-TSE: *p*-toluenossulfonato de etila; TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.

O espectro de absorção na região do UV-Vis da $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ em água, quando comparado ao espectro da $H_2(3Py)_8Pz$ em $CHCl_3:MeOH$ (Figura 30, pág. 42), mostrou que o composto após a alquilação passa a ter apenas uma banda Q (649 nm) com um ombro (626 nm), ocorrendo um deslocamento hipsocrômico. A banda B (371nm) sofre um deslocamento batocrômico. Porfirazinas normalmente tem duas bandas Q, mas no caso da $H_2(3EPy)_8PzCl_8$, pode estar ocorrendo o mesmo fenômeno descrito para a $H_2T3EPyPzCl_4$ (tópico 4.1.1, pág. 28).

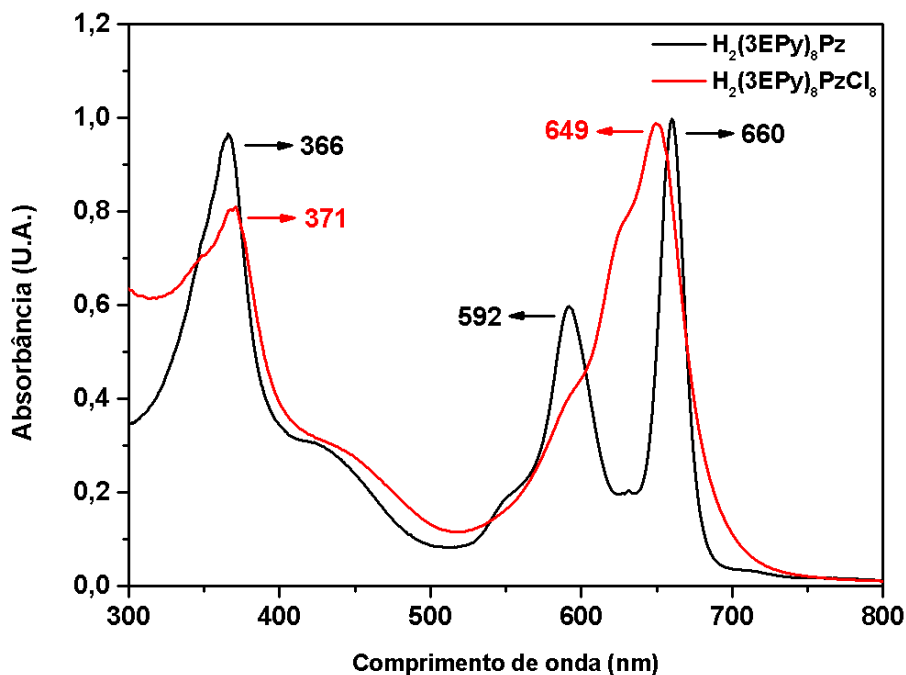


Figura 30 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para $H_2(3EPy)_8Pz$ em 4:1 $CHCl_3:MeOH$ e $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em água.

A caracterização por RMN 1H (Figura 31, pág. 43), mostrou que os sinais referentes aos átomos de hidrogênio do anel piridínico sofreram um maior deslocamento químico, devido a presença da carga positiva no átomo de nitrogênio. O sinal do CH_2 da etila em $\delta = 4,72$ ficou parcialmente suprimido pelo sinal da água em D_2O ($\delta = 4,75$),⁸⁴ não sendo possível determinar o número exato de átomos de hidrogênio. Dessa forma, o sinal do CH_3 da etila em $\delta = 1,55$ ppm indicou que ocorreu a alquilação total do composto, pois resultou em 24 átomos de hidrogênio. Seguindo o mesmo princípio relatado para o espectro da $H_2(3EPy)_8Pz$ (Figura 27, pág. 40), o sinal referente aos átomos de hidrogênio pirrólicos não foi verificado.

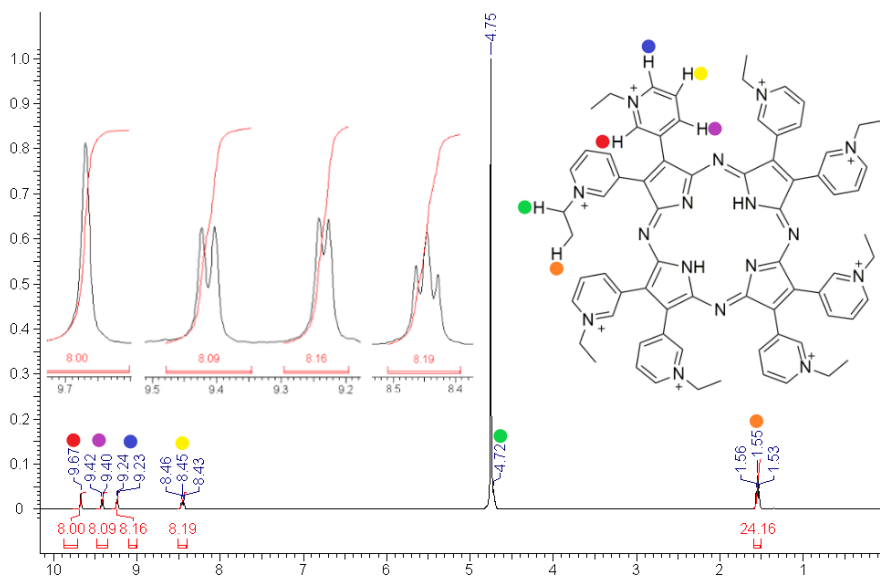


Figura 31 - Espectro de RMN ¹H da H₂(3EPy)₈PzCl₈ em D₂O a 25 °C. δ 9,67 (s, 8 H, H₂-piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H₆-piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,9 Hz, H₄-piridil), δ 8,45 (m, 8 H, H₅-piridil), δ 4,72 (CH₂ etil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH₃ etil).

4.1.6 Metaloporfirazina [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈

A metaloporfirazina [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈ inédita, foi obtida a partir da metodologia descrita para a metaloporfirina [Zn(T3EPyP)]Cl₄ (Índice 4.1.2)⁶³. A H₂(3EPy)₈PzCl₈ reagiu com cloreto de zinco em meio aquoso (Figura 32), sendo o término da reação acompanhado por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (Figura 33, pág. 44).

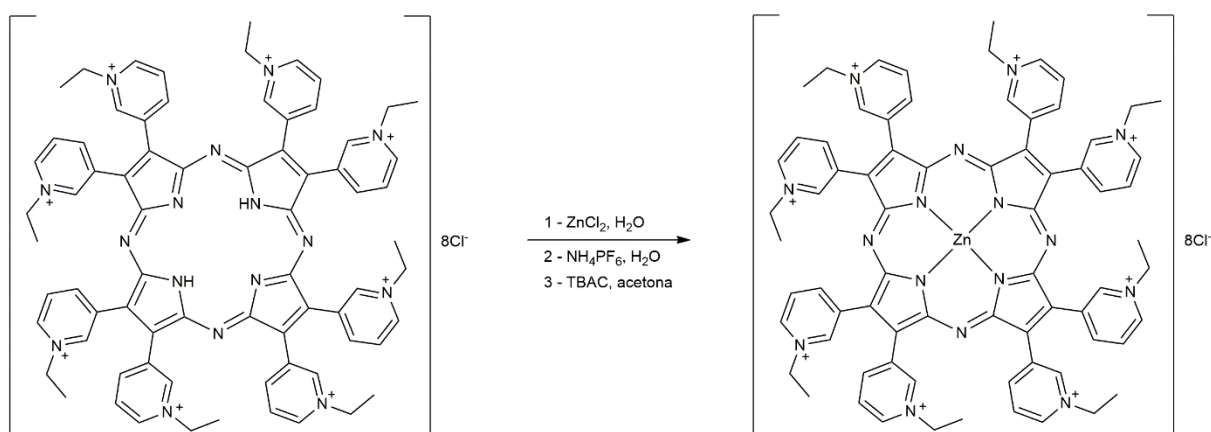


Figura 32 - Esquema da reação de obtenção da metaloporfirazina [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈. TBAC: cloreto de tetrabutilamônio.

O espectro de absorção na região do UV-Vis da [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈ comparado ao da H₂(3EPy)₈PzCl₈ (Figura 33, pág. 44) mostra que ocorre um leve deslocamento batocrômico

da banda B (373 nm), e há um deslocamento hipsocrômico da banda Q (632 nm) com o surgimento de um ombro em 580 nm. A porfirazina base livre tem simetria D_{2h} e tende a ter duas bandas Q intensas, e a metaloporfirazina tem simetria D_{4h} , resultando em apenas uma banda Q intensa.⁸² Essas características espectrais se assemelham a demais trabalhos de metaloporfirazinas de zinco já relatados na literatura.^{76,77,101}

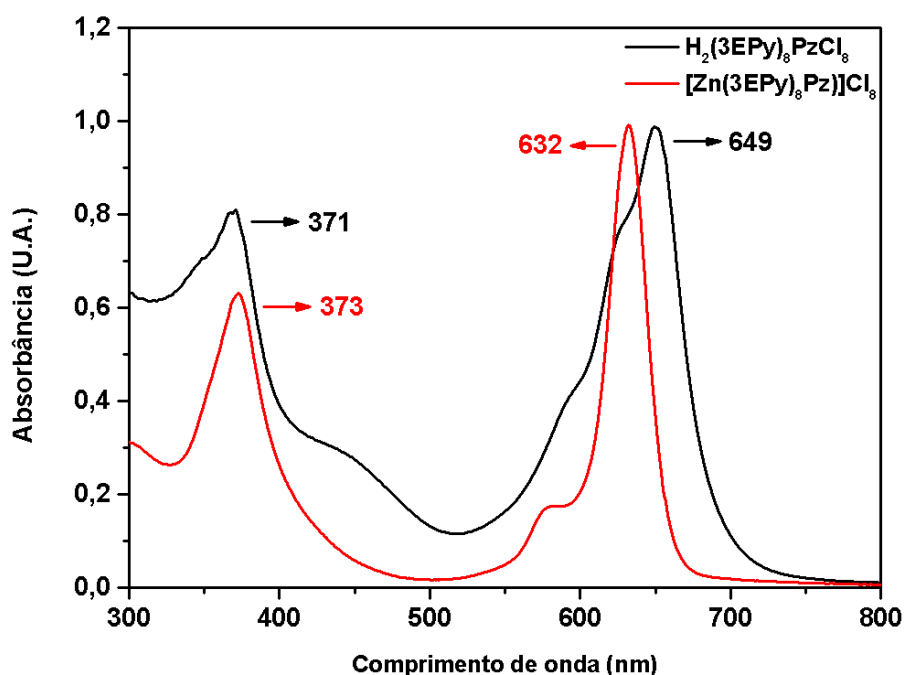


Figura 33 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ ($9,73 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em água.

A caracterização por RMN 1H (Figura 34, pág. 45) mostrou que a única diferença espectral da metaloporfirazina para a $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ (Figura 31, pág. 43) é o desaparecimento total do sinal referente ao CH_2 da etila, que está sendo suprimido pelo sinal da água em D_2O ($\delta = 4,75$).⁸⁴

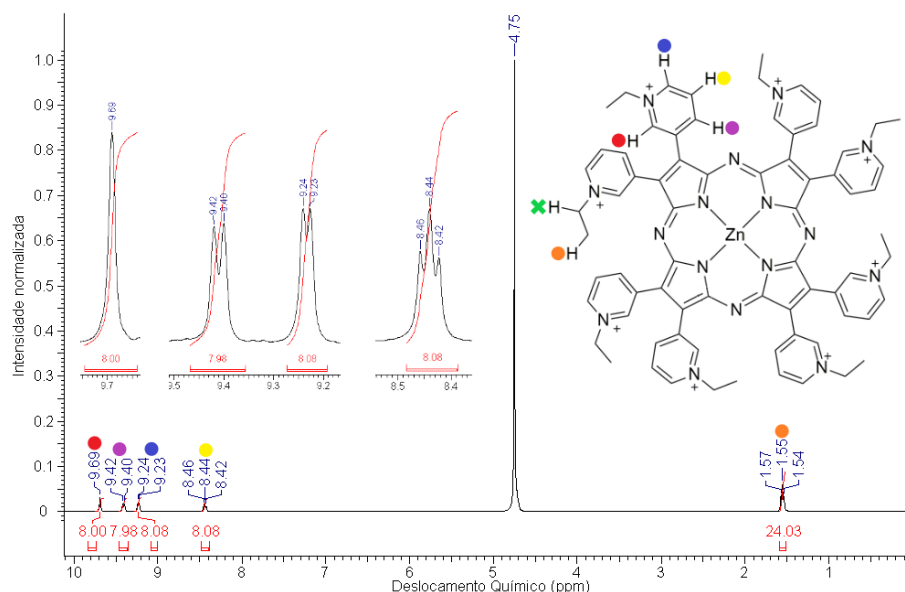


Figura 34 - Espectro de RMN ^1H da $[\text{Zn}(\text{3EPy})_6\text{Pz}]\text{Cl}_8$ em D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$. δ 9,69 (s, 8 H, H_2 -piridil), δ 9,40 (d, 8 H, J: 7,8 Hz, H_6 -piridil), δ 9,24 (d, 8 H, J: 5,7 Hz, H_4 -piridil), δ 8,44 (t, 8 H, J: 6,9 Hz, H_5 -piridil), δ 1,55 (t, 24 H, J: 7,1 Hz, CH_3 etil).

Após verificar que todos os compostos de interesse sintetizados foram caracterizados e estavam puros, pode-se iniciar a etapa de estudos fotofísicos que será relatada a seguir.

4.2 ESTUDOS FOTOFÍSICOS

4.2.1 Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) em água

Os experimentos para determinação do Φ_F dos compostos em água foram baseados na metodologia de Williams e colaboradores (1983)¹⁰² e Dhimi e colaboradores (1995)¹⁰³, utilizando o violeta cresil como referência. Na Equação 1, CA refere-se ao coeficiente angular da interpolação linear do gráfico de absorvância *versus* área do espectro de emissão e η é o índice de refração do solvente.

$$\Phi_{F \text{ composto}} = \Phi_{F \text{ referência}} \times \left(\frac{\text{CA}_{\text{composto}}}{\text{CA}_{\text{referência}}} \right) \times \left(\frac{\eta_{\text{composto}}^2}{\eta_{\text{referência}}^2} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

A Tabela 2 (pág. 45 e 46) mostra os valores obtidos de Φ_F e CA para cada composto.

Tabela 2 - Valores de CA e Φ_F para os compostos em água.

Composto	CA 1ª rep	CA 2ª rep	CA 3ª rep	Φ_F
$\text{H}_2\text{TE3PyPzCl}_4$	34824,5	35067,6	34918,9	$0,0204 \pm 0,0002$

Continuação da Tabela 2.

[Zn(T3EPyP)]Cl ₄	26250,9	24964,2	22657,1	0,0144 ± 0,0009
H ₂ (3EPy) ₈ PzCl ₈	8800,7	7398,2	9280,6	0,0048 ± 0,0005
[Zn(3EPy) ₈ Pz]Cl ₈	93117,6	112322,1	113519,6	0,061 ± 0,005
Violeta cresil	^a 691398,8	^a 687351,7	^a 678739,9	0,40 ¹²⁹
	^b 679092,8	^b 696474,2	^b 727353,4	

^a – Referência das porfirinas; ^b – Referência das porfirazinas; rep = replicata.

Verificou-se que a porfirina base livre tem maior valor de Φ_F que a metaloporfirina, sendo que isto já foi relatado na literatura para porfirinas alquilpiridil,⁵⁵ e para porfirinas após a inserção do zinco.¹⁰⁴ Além disso, a própria H₂TE3PyPCL₄ tem um menor Φ_F quando comparado com a H₂T3PyP ($\Phi_F = 0,066$ em CH₂Cl₂).⁵⁵ A porfirazina tem menor Φ_F que a metaloporfirazina, mostrando que a inserção do zinco não segue uma mesma tendência para porfirinas e porfirazinas de mesmo substituinte.

A maioria dos resultados de Φ_F para porfirazinas são vistos para metaloporfirazinas de magnésio (MgPz), metaloporfirazinas de zinco (ZnPz) e porfirazinas base livre (H₂Pz), sendo que um levantamento feito por Pereira e Tasso (2021) demonstrou que ZnPzs tendem a ter um Φ_F similar as H₂Pzs, e as MgPzs normalmente apresentam valores maiores de Φ_F .⁶¹ Ghazal e colaboradores (2017) mostraram que uma H₂Pz neutra em DMF apresenta $\Phi_F = 0,142$, as suas respectivas ZnPz e MgPz apresentam $\Phi_F = 0,162$ e $\Phi_F = 0,349$, respectivamente. Em água, esses compostos apresentam $\Phi_F = 0,01$ para a MgPz e H₂Pz, e $\Phi_F = 0,055$ para a ZnPz. Após a alquilação desses compostos, em DMF ocorreu uma diminuição significativa do Φ_F , sendo de 0,07 para a MgPz e H₂Pz, e 0,033 para a ZnPz. Em água, ocorreu um aumento do Φ_F quando comparado ao composto neutro, sendo $\Phi_F = 0,216$ para MgPz, $\Phi_F = 0,124$ para ZnPz e $\Phi_F = 0,028$ para H₂Pz.¹⁰⁵ Isso indica que porfirazinas catiônicas tendem a ter baixos valores de Φ_F e que não existe uma tendência após a inserção do zinco para as porfirazinas.

4.2.2 Validação da metodologia de rendimento quântico de ¹O₂ (Φ_Δ)

Inicialmente, utilizou-se um sistema de irradiação de LED para a determinação do Φ_Δ , porém, os resultados obtidos não foram satisfatórios e não será dado ênfase nesse tópico para esses experimentos realizados. A metodologia desenvolvida e seus respectivos resultados estão descritos no Apêndice D (pág. 80).

Quando o composto de interesse é irradiado por uma fonte de luz, os seus elétrons podem ser excitados e os fenômenos que estão descritos no Diagrama de Jablonski podem ocorrer (Figura 2, pág. 4). No qual, a geração de oxigênio singleto é uma etapa importante

quando se pensa na TFD.^{15,21,24} Para quantificar essa espécie é possível utilizar um método indireto no espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, por meio da cinética de decaimento da absorbância de uma sonda de $^1\text{O}_2$.^{30,31,32,33,34,35} A sonda mais conhecida e utilizada para experimentos em solventes orgânicos é o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), que quando está na presença de $^1\text{O}_2$ reage prontamente e gera como produto o 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB) (Figura 35),³⁵ se tratando de uma substância que não absorve na região do UV-Vis e, portanto, não interfere no decaimento da banda do DPBF. Como alguns dos experimentos que serão mostrados adiante foram feitos em metanol ou acetonitrila, optou-se por utilizar o DPBF como sonda de $^1\text{O}_2$, devido ao seu baixo custo de aquisição e ampla utilização na literatura.^{106,107}

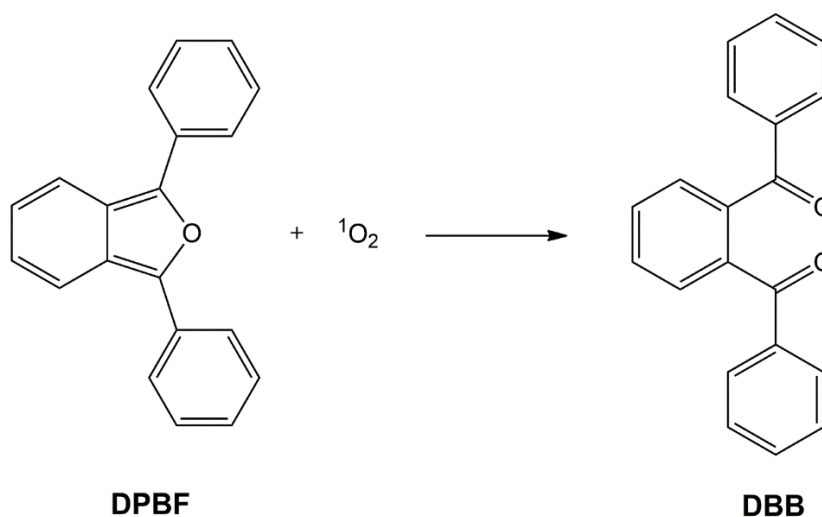


Figura 35 - Reação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) com $^1\text{O}_2$ formando o 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB).

Experimentos utilizando um laser na determinação do Φ_Δ são mais explorados na literatura quando comparado aos com LED.^{25,35,108,109,110} Isso ocorre, pois diferente do LED que emite luz em uma faixa larga de comprimentos de onda, o laser é uma fonte de luz monocromática, ocasionando menores erros experimentais. Para a realização dos cálculos, é possível utilizar apenas um valor de absorbância, sendo desnecessário realizar o experimento com quatro absorbâncias diferentes, conforme relatado para o método utilizando LED (Apêndice D, pág. 80).

Para validar a metodologia, decidiu-se realizar o experimento com duas substâncias que possuem valores de Φ_Δ tabelados na literatura. Para isso, o Φ_Δ do rosa bengala foi determinado usando-se o azul de metileno como referência e metanol como solvente. Os resultados obtidos foram comparados com o que já é relatado na literatura e serão demonstrados adiante.

De modo geral, o experimento consistiu em irradiar com o laser verde (532 nm) a solução na cubeta com intervalos de tempo pré-determinados, até o decaimento de aproximadamente 30% da absorbância do DPBF em 410 nm, conforme é mostrado na Figura 36.

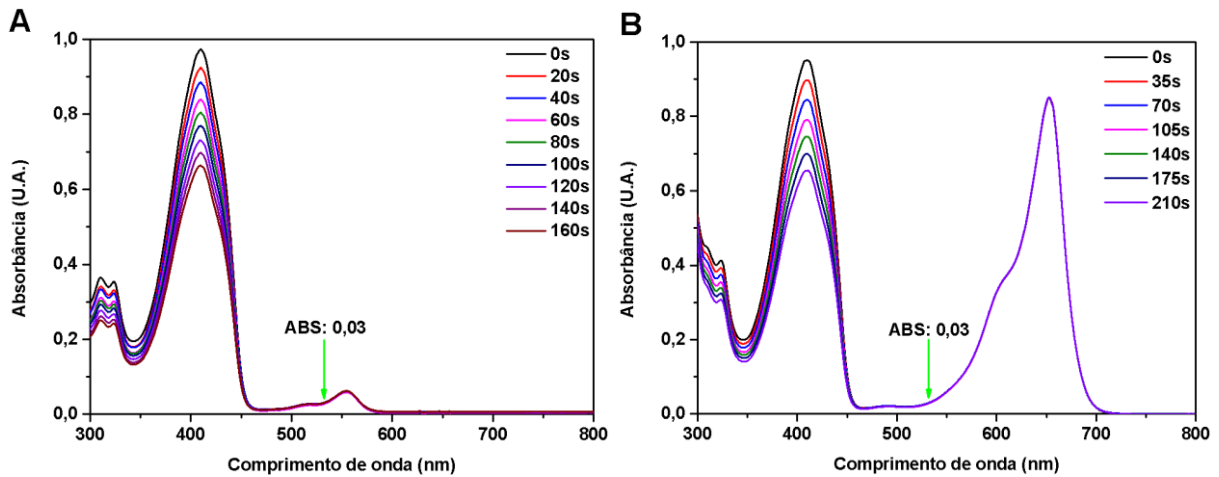


Figura 36 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para o decaimento do DPBF sob irradiação do laser verde. A: rosa bengala e B: azul de metileno.

O cálculo para a determinação do Φ_{Δ} baseou-se na Equação 2, descrita por Thomas e colaboradores (2012)³³ e Adarsh e colaboradores (2011)³⁴, sendo F o fator de correção da absorbância, em que $F = 1 - 10^{-ABS}$ (ABS = absorbância no comprimento de onda de irradiação) e k^{-1} o coeficiente angular da interpolação linear do gráfico de absorbância *versus* tempo de irradiação (Figura 52, pág. 83, Apêndice E).

$$\Phi_{\Delta \text{ composto}} = \Phi_{\Delta \text{ referência}} \times \left(\frac{k_{\text{composto}}^{-1}}{k_{\text{referência}}^{-1}} \right) \times \left(\frac{F_{\text{referência}}}{F_{\text{composto}}} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Os resultados obtidos para as triplicatas realizadas estão na Tabela 3 (pág. 48), sendo obtido um valor de Φ_{Δ} para o rosa bengala de $0,74 \pm 0,05$, mostrando que a metodologia é eficaz, pois o valor de Φ_{Δ} do rosa bengala em metanol relatado na literatura é de $0,76$.¹⁰⁷

Tabela 3 - Dados de k^{-1} e Φ_{Δ} referente aos experimentos de validação da metodologia

Composto	k^{-1} 1ª replicata	k^{-1} 2ª replicata	k^{-1} 3ª replicata	Φ_{Δ}
Azul de metileno	$1,17 \times 10^{-3}$	$1,32 \times 10^{-3}$	$1,42 \times 10^{-3}$	$0,50^{106,107}$
Rosa bengala	$1,94 \times 10^{-3}$	$1,93 \times 10^{-3}$	$1,92 \times 10^{-3}$	$0,74 \pm 0,05$

4.2.3 Φ_{Δ} dos compostos em água

O ácido 9,10-antraceniil-bismetilenodimalônico (ABDA) é uma sonda de $^1\text{O}_2$ para se utilizar em meio aquoso, desde que esteja solubilizado inicialmente em DMSO. Além disso, ele é seletivo apenas para o $^1\text{O}_2$, não interagindo com demais radicais de oxigênio, tornando o resultado obtido de Φ_{Δ} mais confiável.^{35,111} Quando o ABDA interage com o $^1\text{O}_2$, forma-se um endoperóxido (Figura 37) que não absorve na região UV-Vis. Os picos mais intensos da banda do ABDA ficam em 378 e 399 nm, sendo que ambos podem ser escolhidos para a plotagem dos gráficos de absorvância *versus* tempo de irradiação.

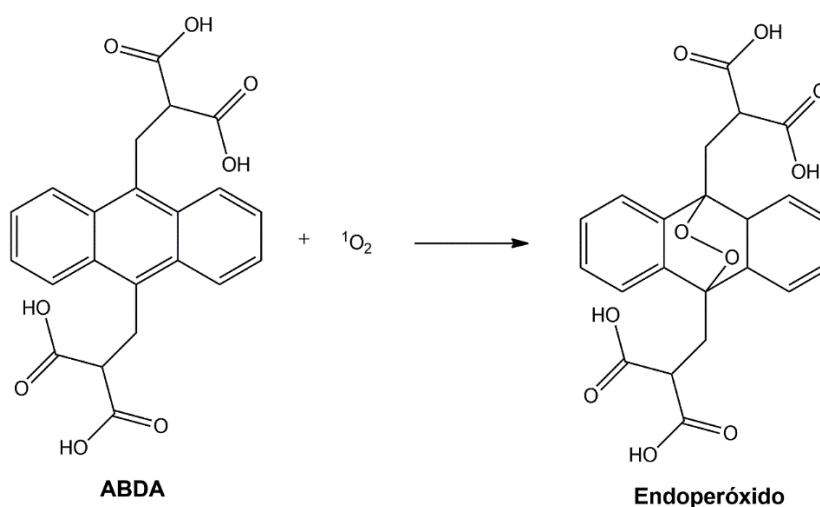


Figura 37 - Reação entre o ácido 9,10-antraceniil-bismetilenodimalônico (ABDA) e $^1\text{O}_2$ formando um endoperóxido.

Sabe-se que o ABDA é um composto que contém quatro grupos ácido carboxílico (Figura 37), assim, quando dissolvido em água, torna a solução ácida. Dessa forma, foi necessário verificar a eventual protonação e/ou desmetalção dos fotossensibilizadores no meio contendo essa sonda.

É relatado na literatura, que a protonação de porfirinas resulta em um deslocamento batocrômico da banda Soret e comportamentos diversos das bandas Q, dependendo do ácido que for utilizado.^{112,113,114} Comparando o espectro da $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ em água com o espectro em solução aquosa de ABDA (Figura 38, pág. 50), verifica-se que ocorreu um deslocamento batocrômico de todas as suas bandas, 417 nm \rightarrow 429 nm; 514 nm \rightarrow 520 nm; 581 nm \rightarrow 594 nm. Ao analisar o espectro da $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ em solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹ (Figura 38, pág. 50), temos um deslocamento batocrômico ainda maior da banda Soret (436 nm) e uma mudança na intensidade e deslocamento das bandas Q (586 e 635 nm). Uma sugestão do fenômeno visto no experimento de Φ_{Δ} em água, é que estejam ocorrendo interações entre a

$H_2TE3PyPCl_4$ e o ABDA, pois o espectro do composto em água e em água na presença de ABDA são semelhantes, descartando assim, uma possível protonação do composto.

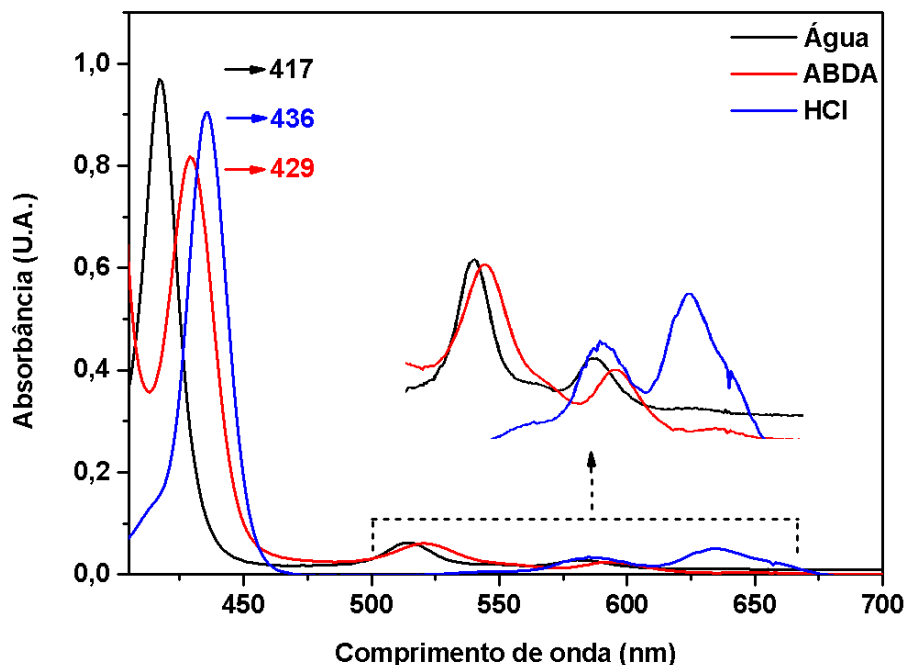


Figura 38 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $H_2T3EPyPCl_4$ em água, ABDA e HCl 1 mol L^{-1} .

Analisando os espectros da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ somente em água com ou sem solução aquosa de ABDA (Figura 39, pág. 51), verifica-se que também ocorreu um deslocamento batocrômico, 429 nm \rightarrow 437 nm e 558 nm \rightarrow 563 nm. Já no espectro em solução aquosa de HCl 1 mol L^{-1} (Figura 39, pág. 51), ocorreu a desmetalacão e protonação da porfirina, pois o espectro está idêntico ao da $H_2TE3PyPCl_4$ nesse solvente (Figura 38). Dessa forma, pode-se afirmar que não houve desmetalacão no experimento de Φ_{Δ} em água, pois o espectro da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ mantém seu perfil espectral na presença de ABDA. Acredita-se que ocorre alguma interação entre a metaloporfirina e o ABDA, que resulta no deslocamento batocrômico das bandas espectrais.

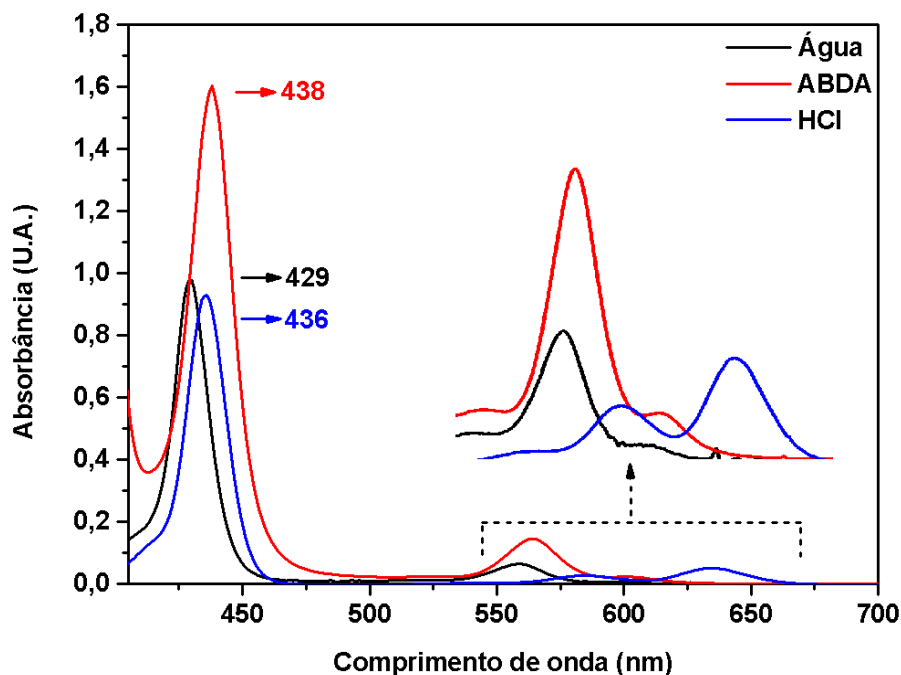


Figura 39 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ em água, ABDA e HCl 1 mol L⁻¹.

As porfirinas obtidas apresentam alta absorbância na região do azul, baixa absorbância na região do verde e é praticamente nula na região do vermelho. Como as sondas de 1O_2 também tem alta absorbância na região do azul, é inviável irradiar nessa região, pois haveria competição pela absorção da irradiação eletromagnética, e também produção de 1O_2 por ambas as substâncias (sonda e composto de interesse). Dessa forma, utilizou-se um laser verde de emissão em 532 nm para todos os experimentos de Φ_Δ que envolveram porfirinas. Além disso, utilizou-se o rosa bengala como referência, por ter uma banda intensa em aproximadamente 550 nm,¹¹⁵ região de emissão do laser verde (532nm).

A Figura 40 (pág. 52) refere-se a uma das replicatas do experimento de Φ_Δ da $H_2TE3PyPCL_4$ (A) e da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ (B) em água. Nota-se que houve os deslocamentos espectrais descritos anteriormente (Figura 38, pág. 50; Figura 39) e não houve fotodegradação dos compostos em 532 nm, indicando que são fotoestáveis nesse sistema de reação. No entanto, o rosa de bengala apresentou uma degradação de 31,1% nas mesmas condições experimentais, Figura 53 (pág. 84, Apêndice F), sendo uma característica já relatada para esse composto.¹¹⁵

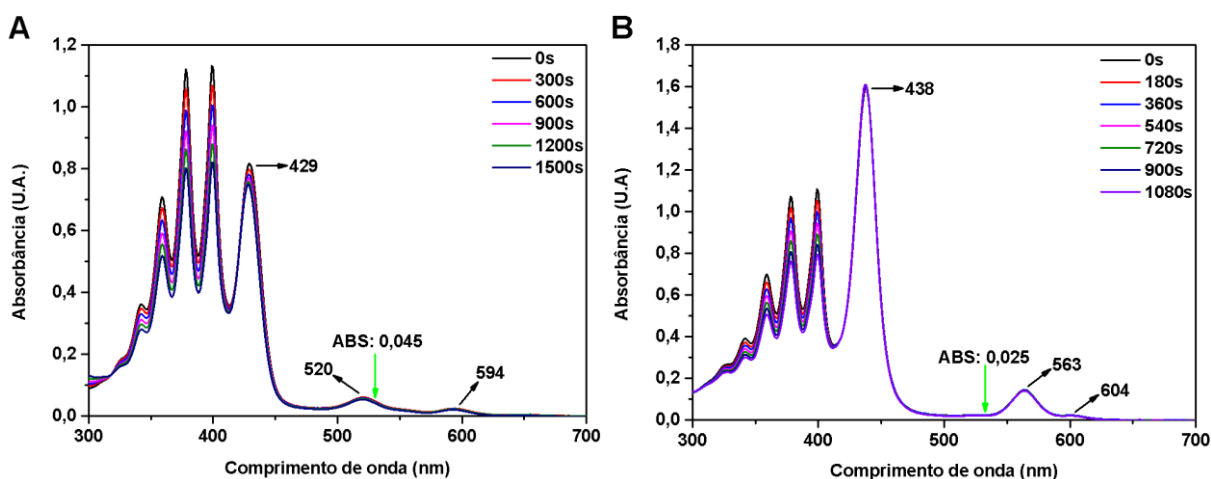


Figura 40 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do ABDA com A: $H_2T3EPyPCL_4$; B: $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ em água, sob irradiação do laser verde (seta verde).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos de k^{-1} e Φ_{Δ} para os compostos em água. A $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ produzem uma quantidade mínima de 1O_2 em água, pois em seus experimentos houve 5% de decaimento da banda do ABDA. Já é relatado na literatura algumas porfirazinas catiônicas que tem Φ_{Δ} próximo a zero,^{116,117} portanto, esse fenômeno não é algo incomum para essa classe de compostos.

Tabela 4 - Dados de k^{-1} e Φ_{Δ} referente a $H_2TE3PyPCL_4$, $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ e rosa bengala em água.

Composto	k^{-1} 1ª replicata	k^{-1} 2ª replicata	k^{-1} 3ª replicata	Φ_{Δ}
$H_2TE3PyPCL_4$	$1,64 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-4}$	$2,34 \times 10^{-4}$	$0,162 \pm 0,003$
$[Zn(T3EPyP)]Cl_4$	$2,90 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$2,87 \times 10^{-4}$	$0,41 \pm 0,04$
Rosa bengala	^a $7,30 \times 10^{-4}$	^a $1,03 \times 10^{-3}$	^a $1,17 \times 10^{-3}$	$0,75^{107}$
	^b $5,67 \times 10^{-4}$	^b $7,67 \times 10^{-4}$	^b $5,17 \times 10^{-4}$	
$H_2(3EPy)_8PzCl_8$	---	---	---	<0,01
$[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$	---	---	---	<0,01

^a - Valores para experimento da $H_2TE3PyPCL_4$; ^b - Valores para experimento da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$

Analisando os valores obtidos na Tabela 4, temos que a $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ produz 2,5 vezes mais 1O_2 que a $H_2TE3PyPCL_4$. Esse aumento significativo era esperado, visto que na literatura é relatado que a inserção do zinco na porfirina geralmente resulta em um aumento do Φ_{Δ} .^{58,109} O Φ_F da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ é um pouco menor que da $H_2TE3PyPCL_4$ (consultar Tabela 2, pág. 45), sendo que isto pode ser um indicativo que na $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ há uma

probabilidade maior dos elétrons excitados estarem realizando um cruzamento intersistema, quando comparado a $H_2TE3PyPCL_4$. Existem trabalhos na literatura que descrevem uma diminuição do Φ_F resultando em um aumento do rendimento quântico do estado tripleto (Φ_T)¹¹⁸ e Φ_Δ ^{25,76}.

Alguns trabalhos envolvendo estudos fotofísicos de porfirinas catiônicas não apresentam os valores de Φ_Δ em água, apenas em solventes orgânicos.^{104,119} Para as porfirinas com o substituinte 3-metilpiridil, é relatado que o Φ_Δ em água é de 0,68 para a 4-metilpiridil, 0,74 para a 2-metilpiridil, 0,77 para a 3-metilpiridil e 0,88 para a metaloporfirina de zinco 4-metilpiridil.⁵⁸ Verifica-se então, que a substituição do metil pelo etil na alquilação, resulta em uma diminuição significativa do Φ_Δ , tanto para a porfirina base livre quanto para a metaloporfirina.

Fazendo uma comparação com porfirinas aprovadas/testadas para aplicação terapêutica, temos que em meio aquoso, o derivado de hematoporfirina (DHP) tem um Φ_Δ de 0,36,¹²⁰ a hematoporfirina tem valores próximos a 0,50,¹²⁰ a porfirina com o substituinte 4-sulfonatofenil tem Φ_Δ de 0,51¹²⁰ e o Photofrin® em PBS apresenta valores de Φ_Δ inferiores a 0,30,^{121,122} Dessa forma, verifica-se que, enquanto o resultado obtido para a $H_2TE3PyPCL_4$ não é tão satisfatório, o da $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ está bem semelhante ao relatado para essas porfirinas.

Na literatura há poucos relatos do Φ_Δ em água de porfirazinas catiônicas.^{77,123} Machacek e colaboradores (2016) sintetizaram cinco porfirazinas catiônicas, porém devido ao forte fenômeno de agregação desses compostos em água, obtiveram o Φ_Δ em água para apenas um composto, sendo o valor de 0,56.¹²³ Sciscione e colaboradores (2017) sintetizaram duas metaloporfirazinas com o substituinte 2-metilpiridil, não quantificando o valor de Φ_Δ , apenas relatando que seus valores de Φ_Δ são maiores que de uma ftalocianina aniônica utilizada como referência.⁷⁷ Pereira e Tasso (2021) mostraram que em água/metanol, DMF/DMSO, metaloporfirazinas de zinco tendem a ter valores de Φ_Δ superiores a sua respectiva base livre. As Pzs apresentam um Φ_Δ em água/metanol abaixo de 0,05 e em DMF/DMSO na média de 0,02. As ZnPzs em água/metanol têm uma média de 0,05 e em DMF/DMSO uma média de 0,5.⁶¹ Portanto, como o Φ_Δ de porfirazinas tende a ser baixo em água, pode-se dizer que os resultados da $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ não são adequados para um FS em relação ao mecanismo tipo II, porém, estão próximos ao esperado para essa classe de compostos.

4.2.4 Φ_Δ dos compostos em acetonitrila

Para compreender melhor as propriedades fotofísicas dos compostos e compará-los, visto que as porfirazinas não apresentaram Φ_Δ em água, optou-se por realizar experimentos

em um solvente orgânico. Como os compostos de interesse sofrem agregação em metanol e etanol, optou-se por utilizar a acetonitrila, dessa forma, utilizou-se o DPBF como sonda de $^1\text{O}_2$, pelas suas características já discutidas.³⁵

A Figura 41 mostra uma das replicatas do experimento de Φ_Δ da $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ (A) e $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ (B) em acetonitrila sob irradiação do laser verde (532 nm). Como a banda Soret da $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ em acetonitrila fica em 417 nm, foi necessário fazer uma medida de branco da solução da porfirina, porém, como a absorvância em 532 nm é muito baixa, precisa-se utilizar uma concentração maior, assim, a banda Soret fica muito intensa e a medida do branco não consegue ficar uniforme, resultando nessa distorção da banda do DPBF entre 417 e 424 nm. A banda Soret da $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ em acetonitrila fica em 443 nm, sendo necessário seguir o mesmo procedimento feito para a $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$, resultando na distorção da banda do DPBF entre 437 e 445 nm. O espectro do experimento do rosa bengala (referência das porfirinas) está na Figura 54A (pág. 84, Apêndice F).

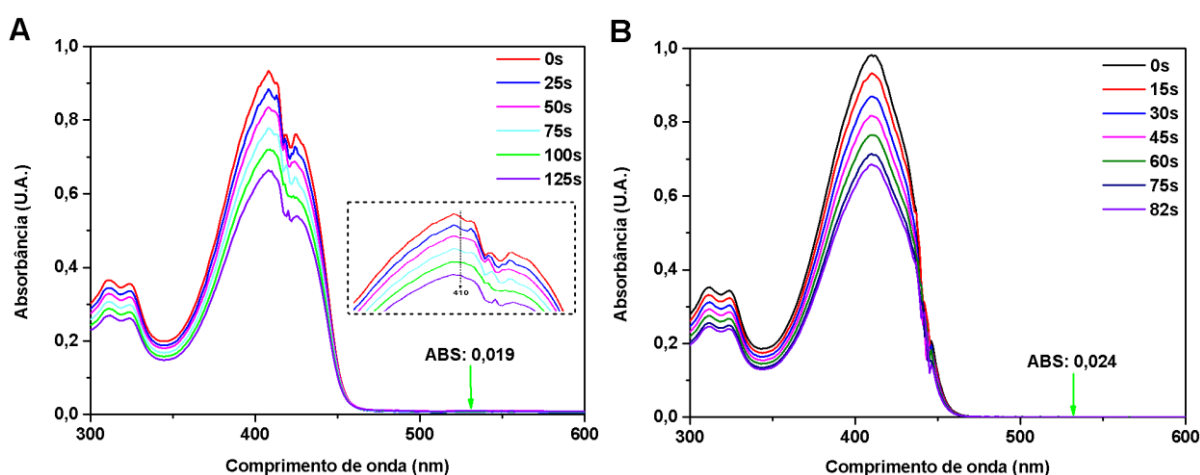


Figura 41- Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com A: $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$; B: $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ em acetonitrila, sob irradiação do laser verde (seta verde).

Como as porfirazinas tem bandas mais intensas na região do vermelho, optou-se pelo laser de irradiação com comprimento de onda em 648 nm, usando o azul de metileno como referência, devido à sua maior absorção de luz nessa região.

Uma das replicatas da $\text{H}_2(3\text{EPy})_8\text{PzCl}_8$ é mostrada na Figura 42A (pág. 55), em que foi feito o branco após a adição da porfirazina, e ao analisar a região em que a banda mais intensa da porfirazina se localiza (649 nm), sugere-se que possa estar ocorrendo o mesmo fenômeno observado para a $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$, que será relatado adiante. Um dos experimentos de Φ_Δ da $[\text{Zn}(3\text{EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ é demonstrado na Figura 42B (pág. 55), em que a absorvância em 648 nm decaiu 27% durante o experimento. O experimento da referência (azul de metileno) se encontra na Figura 54B (pág. 84, Apêndice F).

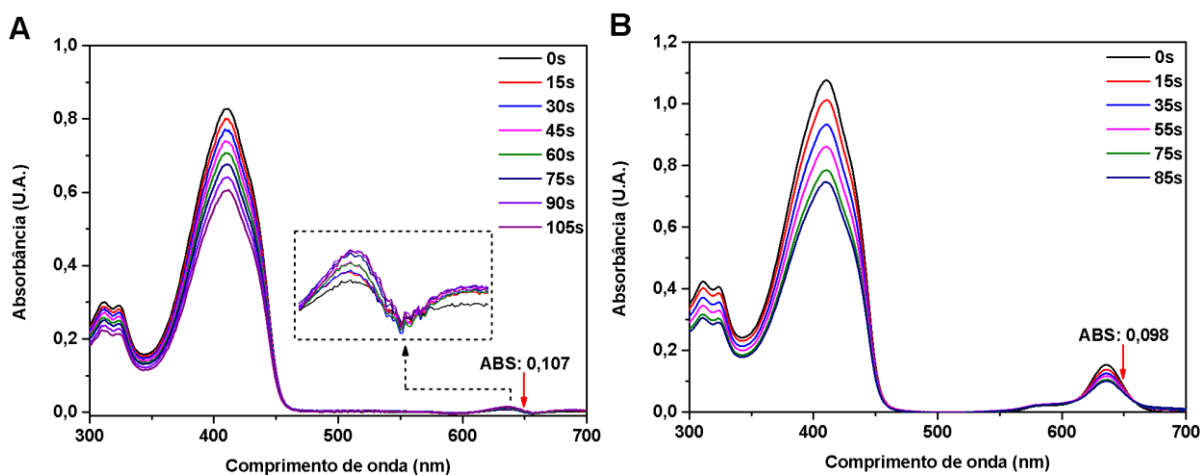


Figura 42 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com a A: $H_2(3EPy)_8PzCl_8$; B: $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ em acetonitrila, sob irradiação do laser vermelho (seta vermelha).

O decaimento da banda da $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ durante o experimento não está associado com a agregação do composto ou interação do mesmo com o DPBF, uma vez que, em experimentos sem irradiação na ausência e na presença de DPBF, não foram observadas mudanças na absorbância da metaloporfirazina com o tempo (Figura 55, pág. 85, Apêndice F). Outros dois procedimentos foram realizados com irradiação (Figura 43, pág. 56), um deles foi utilizando apenas uma solução de $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$, que resultou em um decaimento de 4,7% em 648 nm. Isso mostra que a irradiação do laser na metaloporfirazina causa uma possível degradação, sugere-se que isso esteja ocorrendo, devido à formação de um ânion radical que já é relatado para outras porfirazinas em acetonitrila.²⁵ Porém, isso não justifica ainda o decaimento de 27% que foi visto no experimento de Φ_Δ . O outro procedimento realizado, consistiu em repetir as mesmas condições do experimento de Φ_Δ , verificou-se que o decaimento em 648 nm foi de 22,4%. Portanto, sugere-se que o decaimento da metaloporfirazina está relacionado com a irradiação e com os produtos da reação do DPBF com oxigênio singleto, como por exemplo, o DBB.³⁵ Analisando a Figura 56 (pág. 85, Apêndice F), pode-se afirmar que a degradação que ocorre nas porfirazinas durante o experimento, não afeta a cinética do decaimento do DPBF, pois os valores do coeficiente de determinação (R^2) são acima de 0,99, dessa forma, os valores obtidos de Φ_Δ são confiáveis.

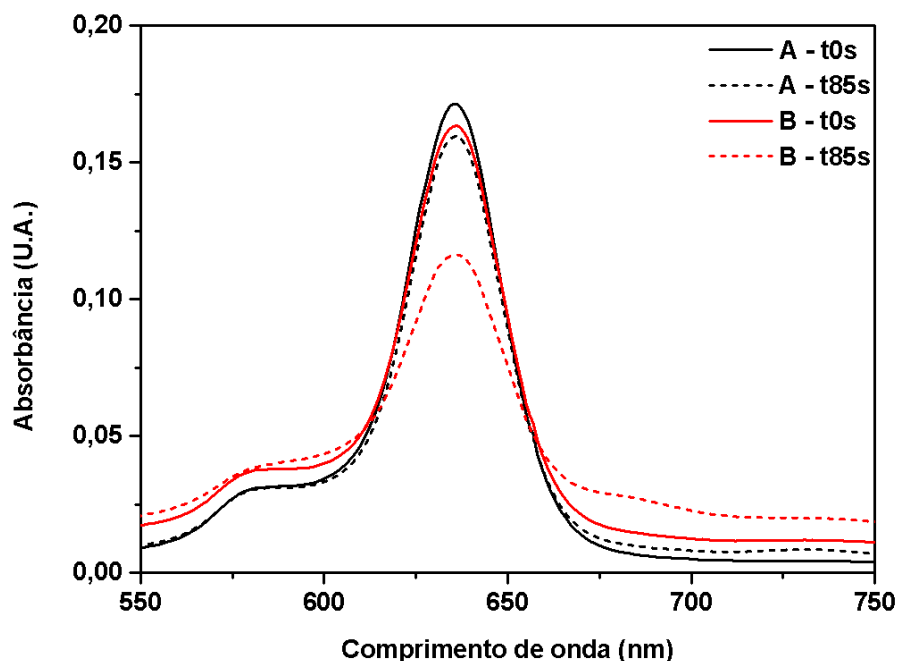


Figura 43 - Espectros de absorção na região do UV-Vis reproduzindo o experimento de Φ_{Δ} da $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ em acetonitrila A: sem DPBF e com irradiação; B: com DPBF e irradiação.

Após a realização dos experimentos com todos os compostos, o Φ_{Δ} foi calculado e os valores obtidos estão descritos na Tabela 5, juntos dos valores de k^{-1} .

Tabela 5 - Valores de k^{-1} e Φ_{Δ} para os compostos em acetonitrila.

Composto	k^{-1} 1ª replicata	k^{-1} 2ª replicata	k^{-1} 3ª replicata	Φ_{Δ}
$\text{H}_2\text{TE3PyP}\text{Cl}_4$	$2,28 \times 10^{-3}$	$2,33 \times 10^{-3}$	$2,05 \times 10^{-3}$	$0,85 \pm 0,04$
$[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$	$3,56 \times 10^{-3}$	$3,48 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$0,89 \pm 0,10$
Rosa bengala	^a $1,36 \times 10^{-3}$	^a $1,29 \times 10^{-3}$	^a $1,16 \times 10^{-3}$	$0,45^{110}$
	^b $1,80 \times 10^{-3}$	^b $1,86 \times 10^{-3}$	^b $1,97 \times 10^{-3}$	
$\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{Pz}\text{Cl}_8$	$1,90 \times 10^{-3}$	$2,12 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$0,16 \pm 0,01$
$[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$	$3,48 \times 10^{-3}$	$3,24 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^{-3}$	$0,20 \pm 0,01$
Azul de metileno	^c $5,91 \times 10^{-3}$	^c $6,99 \times 10^{-3}$	^c $6,67 \times 10^{-3}$	$0,52^{106}$
	^d $8,74 \times 10^{-3}$	^d $8,97 \times 10^{-3}$	^d $8,94 \times 10^{-3}$	

^a – Referência $\text{H}_2\text{TE3PyP}\text{Cl}_4$; ^b – Referência $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$; ^c – Referência $\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{Pz}\text{Cl}_8$; ^d – Referência $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$.

O experimento da $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ apresentou o maior valor de desvio padrão, porém, ao desconsiderar a segunda replicata, o resultado ficaria $0,95 \pm 0,01$, assim, seria interessante repetir esse experimento, para tentar obter um resultado com baixo desvio padrão em uma triplicata.

Conforme já discutido para o experimento de Φ_{Δ} em água, a inserção do zinco nas porfirinas e porfirazinas, geralmente resulta em um aumento do Φ_{Δ} ,^{58,109,117} sendo que em acetonitrila isso também foi verificado. Houve um aumento significativo do Φ_{Δ} em acetonitrila, quando comparado ao Φ_{Δ} em água (consultar a Tabela 4, pág. 52), sendo uma característica bastante observada para diversas porfirinas e porfirazinas.^{116,120,123} A discussão para explicar esse aumento de Φ_{Δ} com a mudança do solvente é bastante complexa, pois seria necessário obter em cada solvente os rendimentos quânticos de fosforescência (Φ_P) e tripleto (Φ_T), a alteração ocasionada pelo solvente nos níveis de energia do estado tripleto, na desativação do estado excitado, no potencial redox do estado excitado, entre outros.

Grande parte dos experimentos de Φ_{Δ} em solventes orgânicos são feitos em DMF, metanol, etanol, clorofórmio e tolueno,^{25,104,106,107,109,119,124} devido as porfirinas e porfirazinas serem usualmente mais solúveis neles. Sciscione e colaboradores (2017) relatam que a porfirazina de zinco com o substituinte 2-piridil tem um Φ_{Δ} de 0,64 em DMF,⁷⁶ porém, neste presente trabalho, o procedimento de alquilação antecedeu a metalação, não sendo possível fazer uma comparação entre os substituintes 2- e 3-piridil.

Em acetonitrila é relatado para a tetrafenilporfirina um Φ_{Δ} de 0,50¹²⁵ e de 0,98 após a inserção do gálio¹²⁶. Para a tetrabenzoporfirina de zinco e tetrabenzoporfirina de magnésio é relatado um Φ_{Δ} de 0,75 e 0,60, respectivamente.¹²⁴ Esse solvente é pouco utilizado para experimentos de Φ_{Δ} , dessa forma, não foram encontrados Φ_{Δ} de moléculas semelhantes as sintetizadas neste trabalho para realizar comparações. Também não há relatos de trabalhos fazendo comparações de Φ_{Δ} nas mesmas condições experimentais para porfirinas e porfirazinas com o mesmo substituinte, não havendo uma maneira de relacionar e verificar uma tendência do Φ_{Δ} desses compostos. Mas neste presente trabalho, pode-se afirmar que porfirinas com o substituinte 3-etilpiridil são mais eficientes na produção de 1O_2 que as porfirazinas com o mesmo substituinte.

Em relação aos critérios estabelecidos para um FS ideal (consultar tópico 1.2, pág. 2) pode-se dizer sobre os compostos deste trabalho, que as porfirinas tem uma baixa absorbância na região de interesse (600 a 800 nm) e as porfirazinas tem uma alta absorbância nessa região. Porém, as porfirinas são capazes de produzir o 1O_2 no meio aquoso, algo que não foi verificado para as porfirazinas. Além disso, as porfirazinas se mostraram ser menos fotoestáveis que as porfirinas, mas como no sistema biológico há outros interferentes, não é possível afirmar que a fotoestabilidade segue a mesma tendência observada nos experimentos de Φ_{Δ} .

Vale ressaltar que a produção de 1O_2 é apenas um dos parâmetros que deve ser levado em consideração para um FS, pois existem outros fatores que devem ser avaliados para compreender o mecanismo de ação do FS, como por exemplo, a sublocalização celular,^{51,62,128} reação contato-dependente,²⁵ produção de ERO, toxicidade no escuro e na

presença de irradiação eletromagnética^{62,101} e a seletividade para células tumorais ao invés das células saudáveis¹³⁰. Dessa forma, o tópico a seguir mostrará os resultados de incorporação, toxicidade e fototoxicidade em células B16F1 para melhor compreender as características dos compostos de interesse.

4.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Incorporação celular

Para verificar a toxicidade dos compostos de interesse na presença de radiação eletromagnética e no escuro, deve-se inicialmente analisar o comportamento dos compostos perante as células B16F1. Dessa forma, o primeiro procedimento realizado foi um teste para verificar a incorporação celular dos compostos estudados ao longo do tempo. Compostos que conseguem apresentar uma maior incorporação celular, geralmente induzem a uma maior porcentagem de morte celular, sendo um fator importante para uma melhor eficiência na TFD.^{62,111,127,128}

Algo que pode interferir nesse fenômeno de incorporação celular, são as substâncias presentes no meio de cultura, pois as mesmas podem interagir ou até mesmo degradar os compostos de interesse, e a diminuição do pH ocasionado pelas células que pode resultar em protonações dos compostos. A Tabela 6 mostra os valores de incorporação celular e de diminuição da banda mais intensa de cada composto, que ocorre com o meio de cultura RPMI 1640 com indicador suplementados com diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) em 24 horas.

Tabela 6 - Percentuais de diminuição da absorbância dos compostos nos meios com diferentes concentrações de SFB e incorporação nas células B16F1 no meio contendo 10% de SFB em 24 horas de incubação.

Composto	Meio 0% SFB (%)	Meio 2,5% SFB (%)	Meio 5% SFB (%)	Meio 10% SFB (%)	Uptake em Meio 10% SFB (%)
H ₂ TE3PyPCL ₄	19,8	22,5	33,9	30,9	---
[Zn(T3EPyP)]Cl ₄	2,2	2,1	2,2	3,48	0
H ₂ (3EPy) ₈ PzCl ₈	58,2	44,4	35,0	20,0	7
[Zn(3EPy) ₈ Pz]Cl ₈	45,5	34,4	33,3	27,6	10,6

A variação da concentração do SFB no meio celular demonstrou comportamentos opostos para as porfirinas e porfirazinas, sendo que as porfirinas tendem a ter uma diminuição

da absorbância com o meio celular contendo maiores concentrações de SFB e as porfirazinas tendem a ter esse efeito com menores concentrações de SFB. A Figura 44 mostra os espectros de absorção na região do UV-Vis em meio celular suplementado com 10% de SFB após 24 horas de incubação dos compostos. Verifica-se que a $H_2TE3PyPCl_4$ está sofrendo um efeito semelhante ao que foi relatado para o ABDA (Figura 38, pág. 50), devido a semelhança espectral e também está ocorrendo uma agregação, pois a banda Soret está alargada. A $[Zn(T3EPy)]Cl_4$ praticamente não tem mudança espectral e as porfirazinas tem o mesma característica espectral, porém, sofrendo um efeito hipocrômico.

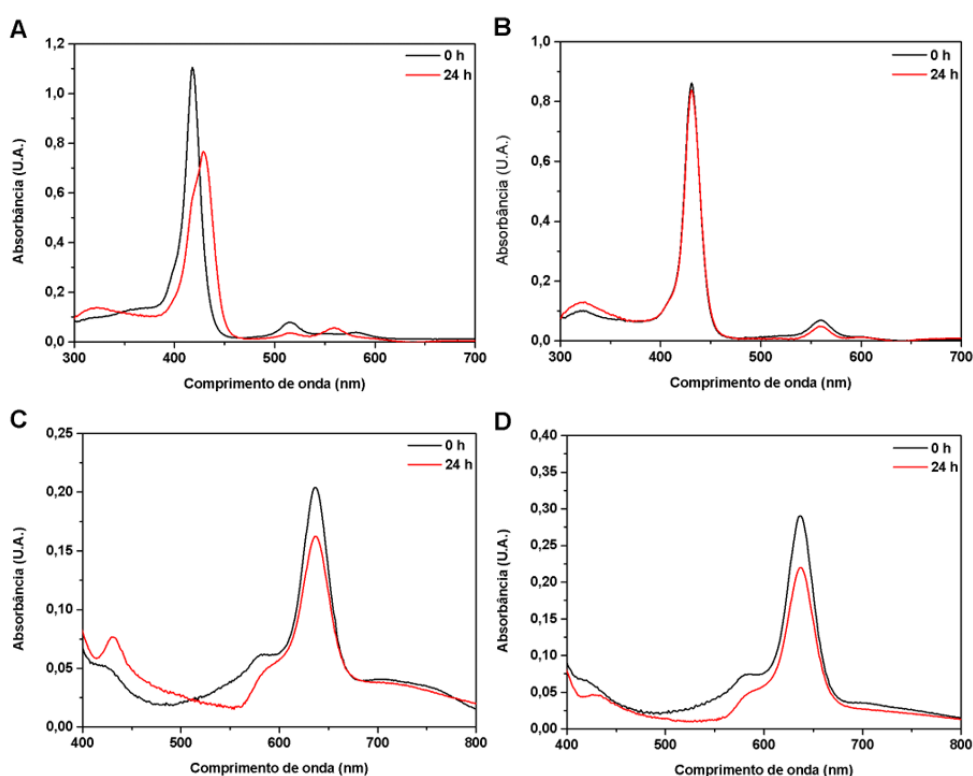


Figura 44 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos compostos A: $H_2TE3PyPCl_4$; B: $[Zn(E3PyP)]Cl_4$; C: $H_2(3EPy)_8PzCl_8$; D: $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ após 24 horas solubilizados no meio celular suplementado com 10% de SFB.

Como há uma divergência entre os compostos em relação ao meio celular mais adequado para utilização e a ideia deste trabalho é relatar os resultados nas mesmas condições experimentais, optou-se em utilizar nos experimentos de incorporação e viabilidade celular, o meio celular contendo 10% de SFB, por ele ser amplamente utilizado em estudos biológicos.^{62,68,69,70}

A Figura 57 (pág. 86, Apêndice G) mostra um gráfico que demonstra a razão da incorporação celular de acordo com o tempo para a $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$, verificou-se que não ocorreram mudanças significativas na incorporação celular conforme o

tempo aumenta. Não foi possível determinar a incorporação da $H_2TE3PyPCl_4$, pois houve agregação da solução controle, onde a banda Soret alargou e, conseqüentemente, teve uma diminuição da absorbância. Assim, baseou-se no trabalho de Ezzeddine e colaboradores (2013) para definir o tempo de incubação dos fotossensibilizadores para os experimentos de viabilidade celular, sendo que em seu trabalho, foi verificado para as metaloporfirinas de zinco(II) com os substituintes alquilpiridil, que a incubação dos compostos por 24 horas resultou em melhores resultados de viabilidade celular.⁶² Portanto, neste presente trabalho, também optou-se por deixar os FS por 24 horas de incubação antes da irradiação com LED.

4.3.2 Ensaios de citotoxicidade

A viabilidade celular dos compostos de interesse em células B16F1 pode ser visto na Figura 45. Para controle, deixou-se 26 poços nas extremidades das placas apenas com células em meio celular, e as porcentagens de viabilidade celular dos compostos foram calculadas considerando a média das absorbâncias dos controles como 100%. Nas concentrações utilizadas neste experimento (0,01 à 10 μM), nenhum composto demonstrou toxicidade no escuro, sendo um resultado desejado para o desenvolvimento de um FS. A fototoxicidade foi vista apenas para a $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$ (Figura 45B) nas concentrações de 5 e 10 μM , resultando em um IC_{50} de 7,8 μM .

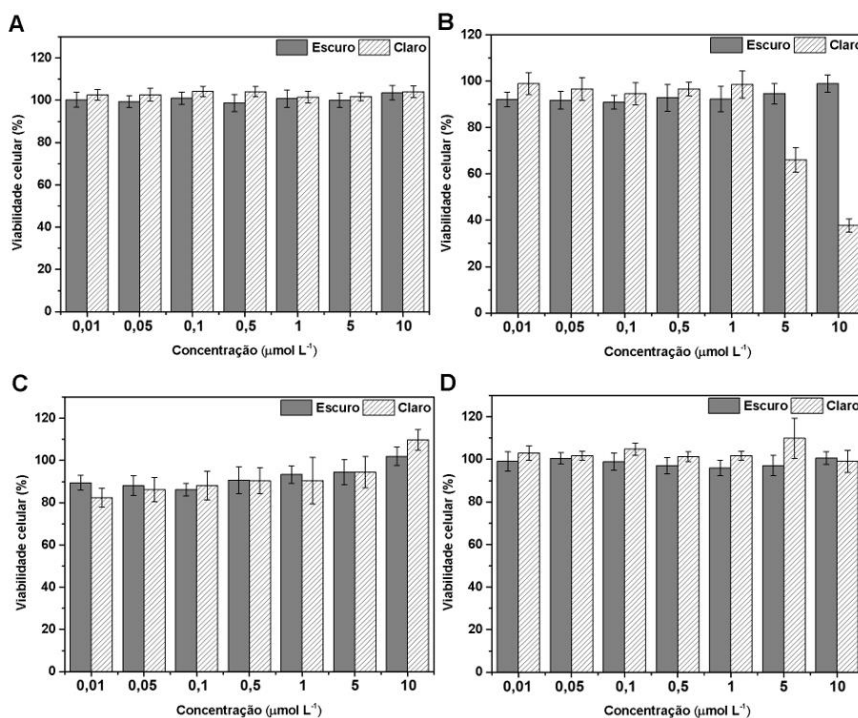


Figura 45 - Viabilidade celular em células B16F1 dos compostos A: $H_2TE3PyPCl_4$; B: $[Zn(TE3PyP)]Cl_4$; C: $H_2(3EPy)_8PzCl_8$; D: $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ em concentrações na faixa de 0,01 à 10 μM , sob irradiação de LEDs 625 ± 5 nm por uma hora ($23 J cm^{-2}$).

Como foi verificado que as porfirazinas não produzem $^1\text{O}_2$ em água, compreende-se a inexistência de uma fototoxicidade no claro, mas como não estava descartada a hipótese das porfirazinas produzirem ERO pelo mecanismo tipo I, achou-se necessário realizar esses experimentos de viabilidade celular para melhor compreendê-las. Portanto, após os resultados obtidos, pode-se afirmar que as porfirazinas não foram eficazes como FS para a célula B16F1.

É plausível obter o resultado que está sendo observado para a $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$, pois a porfirina tem uma absorção extremamente baixa na região em que o LED utilizado emite. Porém, a $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ também tem essa característica e mesmo assim apresentou fototoxicidade, indicando que existem outros fatores que podem estar influenciando na atividade dos FS. Assim, acredita-se que é necessário realizar mais experimentos para compreender melhor o mecanismo desses compostos no meio biológico, como por exemplo, de sublocalização celular, interação com a membrana plasmática, entre outros.

Há diversos trabalhos de fototoxicidade celular utilizando porfirinas catiônicas com o substituinte alquilpiridil. Ezzeddine e colaboradores (2013) demonstraram que as metaloporfirinas de zinco(II) hexilpiridil são mais eficientes que as metilpiridil em células de adenocarcinoma de cólon humano (LS174T) e células de câncer de mama (MCF7) sob irradiação de luz branca, devido a maior incorporação celular provindo pelo tamanho da cadeia lipofílica. Também foi verificado uma tendência dos compostos 4-alquilpiridil apresentarem uma maior fototoxicidade que os compostos 2- e 3-alquilpiridil.⁶² Viana e colaboradores (2015) verificaram que a metaloporfirina de zinco(II) com o substituinte 2-etilpiridil, apresenta viabilidade celular de aproximadamente 65% a 10 μM em células de fibroblastos (ATCC® CRL-163™) sob irradiação em $460 \pm 20 \text{ nm}$.⁷¹ Andrade e colaboradores (2018) mostraram que essa mesma metaloporfirina de zinco(II) sob irradiação de LED $455 \pm 20 \text{ nm}$, apresenta baixa fototoxicidade em Macrófagos J774.A1 (ATCC® TIB-67™) e células Vero (ATCC® CCL-81™), e alta fototoxicidade em macrófagos peritoneais.⁷⁰ Como esses trabalhos utilizaram células diferentes, não é plausível fazer comparações diretas com as porfirinas desenvolvidas neste presente trabalho, mas pode-se dizer que alquilpiridilporfirinas tem muito potencial como FS para diversos tipos de câncer.

Ainda são vistos poucos relatos de fototoxicidade de porfirazinas semelhantes à deste presente trabalho, sendo que isso é justificado pela síntese de novas porfirazinas ser algo mais recente. Machacek e colaboradores (2016) mostraram que uma porfirazina catiônica da classe tetra-3,4-pirido a 3,8 nM sob irradiação acima de 570 nm ($22,3 \text{ J cm}^{-2}$), foi capaz de diminuir a viabilidade celular para 17% em células HeLa.¹²³ Viola e colaboradores (2017) mostraram que uma porfirazina octacatiônica 2,3-pirazino com o substituinte 2-metilpiridil tem um IC_{50} de $30 \pm 10 \text{ nM}$ em células de melanoma maligno (C8161) e de $55 \pm 8 \text{ nM}$ em carcinoma epinocelular oral (CA-1) quando irradiada em 660 nm (45 J cm^{-2}).¹⁰¹ Dessa forma, pode-se

dizer que porfirazinas tem um grande potencial como FS e que as porfirazinas sintetizadas neste presente trabalho podem ser eficientes em outras linhagens de células, algo que pode vir a ser explorado no futuro.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Foi possível obter e caracterizar os compostos de interesse $H_2T3EPyPCL_4$, $[Zn(T3EPyP)]Cl_4$, $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$. Com exceção da $H_2T3EPyPCL_4$ que já é relatada na literatura, os demais compostos são inéditos, inclusive o intermediário $H_2(3Py)_8Pz$.

Os rendimentos das reações foram satisfatórios e condizentes com o que se encontra na literatura para trabalhos similares, a $H_2(3Py)_8Pz$ foi a única que apresentou um menor rendimento, devido a baixa taxa de conversão do reagente fumaronitrila em maleonitrila.

As caracterizações por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e RMN 1H foram essenciais para elucidar a estrutura e pureza dos intermediários e compostos de interesse. Sabe-se que as porfirinas alquilpiridil tendem a ter moléculas de água em sua estrutura, assim, a análise de CHN auxiliou na determinação das fórmulas moleculares $H_2T3EPyPCL_4 \cdot 15H_2O$ e $[Zn(T3EPyP)]Cl_4 \cdot 18H_2O$, sendo que a análise termogravimétrica corroborou com valores próximos aos determinados. A caracterização por MALDI-TOF MS do intermediário $H_2(3Py)_8Pz$ e das porfirinas, sustentou a estrutura proposta anteriormente por RMN 1H .

Como as porfirazinas $H_2(3EPy)_8PzCl_8$ e $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ foram obtidas em pequena quantidade, optou-se por não realizar as demais caracterizações relatadas, para que se tivesse composto suficiente para os estudos de citotoxicidade, visto que eles não são estáveis em solução aquosa por muito tempo, sendo necessário produzir uma nova solução a cada experimento biológico.

Nos experimentos de Φ_F , verificou-se que todos os compostos de interesse têm um baixo valor de Φ_F em água, sendo uma característica interessante para FS, pois é um possível indicativo que há uma preferência pela geração da espécie no estado tripleto ao invés da ocorrência do fenômeno de fluorescência, mas para confirmar essa suposição, seria necessário a determinação do Φ_T , algo que não foi possível realizar neste trabalho.

Para a quantificação do Φ_Δ dos compostos de interesse, foi necessário desenvolver um sistema de irradiação e a metodologia a ser aplicada. Inicialmente utilizou-se uma fita de LED RGB multicolorida para o processo de irradiação, mas não se obteve resultados satisfatórios. Assim, migrou-se para a utilização de lasers monocromáticos, tornando possível validar a metodologia com a obtenção de um valor de Φ_Δ do rosa bengala em metanol semelhante ao já relatado na literatura.

As porfirinas mostraram ter uma produção de 1O_2 razoável em meio aquoso, enquanto as porfirazinas são ineficazes nesse meio. Como o ABDA altera o meio aquoso, necessitou-se estudar o efeito ocasionado por essa sonda de 1O_2 nos compostos de interesse. Foi visto

que ocorrem interações entre o ABDA e os compostos de interesse, que ocasionam em mudanças espectrais significativas.

Para fazer comparações entre as classes de compostos, foi necessário determinar o Φ_{Δ} em acetonitrila, sendo verificado que as porfirinas tem um Φ_{Δ} muito maior que as porfirazinas e que os compostos contendo zinco apresentam valores maiores de Φ_{Δ} quando comparado a sua respectiva base livre.

Nos testes biológicos com as células B16F1, não foi possível verificar uma tendência de incorporação celular dos compostos de interesse. Dessa forma, prosseguiu-se para os ensaios de citotoxicidade utilizando um tempo de 24 horas de incubação. Apenas a $[\text{Zn}(\text{T3EPyP})]\text{Cl}_4$ mostrou uma fototoxicidade, tendo um valor de IC_{50} aceitável para um FS. De modo geral, pode-se dizer que esses estudos biológicos ainda serão explorados no futuro, com o intuito de compreender melhor os fenômenos que ocorrem.

Pretende-se fazer a caracterização da $\text{H}_2(\text{3EPy})_8\text{PzCl}_8$ e $[\text{Zn}(\text{3EPy})_8\text{Pz}]\text{Cl}_8$ por MALDI-TOF MS e análise termogravimétrica, determinar o Φ_{Δ} dos compostos em água na presença de surfactante e na presença de azida de sódio, determinar do Φ_F dos compostos em acetonitrila, estudar a interação dos compostos com lipossomos e fazer experimentos de citotoxicidade com células B16F1 e células HaCaT, utilizando o meio RPMI 1640 sem indicador, comparando o resultado da irradiação em LED vermelho e verde.

6 REFERÊNCIAS

- [1] American Cancer Society, 06 de novembro, 2020, Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/what-is-cancer.html>>. Acesso em: 25 de Janeiro de 2022.
- [2] World Health Organization, 21 de setembro, 2021, Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2022.
- [3] WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World Cancer Report**, Lyon, 2020.
- [4] STIVAROU, T.; PATSAVOUDI, E. Extracellular Molecules Involved in Cancer Cell Invasion, **Cancers**, vol. 7, p. 238-265, 2015.
- [5] SUNG, H. et all. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 71, p. 209-249, 2021.
- [6] World Health Organization, Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2022.
- [7] BRAY, F. et all. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study, **The Lancet Oncology**, vol. 13, p. 790-801, 2012.
- [8] HAMPTON, T. Targeted cancer therapies lagging: better trial design could boost success rate, **Journal of the American Medical Association**, vol. 296, p.1951-1952. 2006
- [9] BERGH J. Quo vadis with targeted drugs in the 21st century?, **Journal of Clinical Oncology**. vol.27, p. 2-5, 2009.
- [10] FOJO T.; Grady C. How much is life worth: cetuximab, non-small cell lung cancer, and the \$440 billion question, **Journal of the National Cancer Institute**, vol.101, p.1044-1048, 2009.
- [11] American Cancer Society, 02 de outubro, 2019, Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/surgery/risks-of-cancer-surgery.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2021.
- [12] American Cancer Society, 01 de maio, 2020, Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2021.

- [13] American Cancer Society, 10 de dezembro, 2020, Disponível em:<<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/effects-on-different-parts-of-body.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2021.
- [14] American Cancer Society, 27 de dezembro, 2019, Disponível em:<<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/what-is-immunotherapy.html>>. Acesso em: 24 de abril de 2021.
- [15] AGOSTINIS, P. et all. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update, **A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 61, p. 250-281, 2011.
- [16] ABRAHAMSE, H., HAMBLIN, M. R., New Photosensitizers for Photodynamic Therapy, **Biochemical Journal**, vol. 473, p. 347-364, 2016.
- [17] CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, vol. 1, p. 279–293, 2004.
- [18] ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. vol.7, p. 61-75, 2010.
- [19] DETTY, M.R.; GIBSON, S.L.; WAGNER, S.J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 47, p.897-915, 2004.
- [20] CHEN, C. et all. Recent Advances in Developing Photosensitizers for Photodynamic Cancer Therapy, **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, vol. 20, p. 414-422, 2017.
- [21] CELLI, J. P. et all. Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization, **Chemical Reviews**, vol. 110, n. 5, p. 2795-2838, 2010.
- [22] ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, vol. 96, p. 1-8, 2009.
- [23] GILBERT, A.; BAGGOTT, J. E. Essentials of molecular photochemistry, CRC Press, 1991.
- [24] ORMOND, A. B; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy, **Materials**, vol. 6, p. 817-840, 2013.

- [25] TASSO, T. T. et al. Photobleaching efficiency parallels the enhancement of membrane damage for porphyrazine photosensitizers, **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 39, p. 15547-15556, 2019.
- [26] RONZANI, F. Photosensitized oxidation reactions: transient reactive species and mechanisms at interfaces, 2013. (Doutorado), Universidade de Pau, França.
- [27] RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas, *Química Nova*, vol. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.
- [28] NONELL, S.; FLORS, C. Singlet Oxygen Applications in Biosciences and Nanosciences, *European Society for Photobiology*, vol. 13, 2016.
- [29] DYSART, J. S; PATTERSON, M. S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro, **Physics in Medicine and Biology**, vol. 50, p. 2597-2616, 2005.
- [30] GEROLA, A. P. et al. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 232, p. 14-21, 2012.
- [31] FERNANDEZ, J. M.; BILGIN, M. D.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, vol.37, p. 131-140, 1997.
- [32] LANZILOTTO, A. et al. Porphyrin-polymer nanocompartments: singlet oxygen generation and antimicrobial activity, **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, vol. 23, p. 109-122, 2018.
- [33] THOMAS, A. P. meso-Tetrakis(p-sulfonatophenyl)N-Confused Porphyrin Tetrasodium Salt: A Potential Sensitizer for Photodynamic Therapy, **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 55, p. 5110–5120, 2012.
- [34] ADARSH, N.; AVIRAH, R. R.; RAMAIAH, D. Tuning Photosensitized Singlet Oxygen Generation Efficiency of Novel Aza-BODIPY Dyes, **Organic Letters**, vol. 12, p. 5720-5723, 2010.
- [35] ENTRADAS, T.; WALDRONA, S.; VOLKA, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments, **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, vol. 204, p. 111787, 2020.

- [36] BONACIN, J. A. et al. Singlet Oxygen Quantum Yields ($\Phi\Delta$) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 20, p. 31-36, 2009.
- [37] MORIYAMA, L. T. Ablação de resinas compostas com laser de Er: YAG sob diferentes fluxos de água, 2006 (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [38] STRATEN, D. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions, **Cancers**, vol. 9, p. 19; 2017.
- [39] ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, vol. 1, p. 27-42, 2004.
- [40] ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives, **Pharmaceutical Research**, vol.17, p.1447–1455, 2000.
- [41] DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic Therapy, **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- [42] KIM, J.; JO, Y.; NA, K. Photodynamic therapy with smart nanomedicine, **Archives of Pharmacal Research**, vol. 43, p. 22-31, 2020.
- [43] XIANG, M. et al. A Review of Light Sources and Enhanced Targeting for Photodynamic Therapy, **Current Medicinal Chemistry**, vol. 28, p. 6437-6457, 2021.
- [44] JUNG, A. C. et al. Antitumor Immune Response Triggered by Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Where Are We?, **Pharmaceutics**, vol. 13, p. 1788, 2021.
- [45] MOREIRA, L. M.; MORAES, P. C. G.; MENDONÇA, J. P. F. Hemoglobina Extracelular Gigante de *Glossoscolex paulistus*: um extraordinário sistema supramolecular hemoprotéico, **Química Nova**, vol. 34, p. 119-130, 2011.
- [46] FLEISCHER, E. B. The Structure of Porphyrins and Metalloporphyrins, **Accounts of chemical research**, vol. 3, p. 105-112, 1970.
- [47] KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. Medical Aspects of Porphyrins, *The Porphyrin Handbook*, vol. 14, 2003.
- [48] DOLPHIN. D. 1993 Syntex Award Lecture Photomedicine and photodynamic therapy, **Canadian Journal of Chemistry**, vol. 72, p. 1005-1013, 1994.
- [49] KRÁL, V. et al. Quo vadis porphyrin chemistry?, **Physiological Research**, vol. 55, p. S3-S26, 2006.

- [50] FLEISCHER, E. B. $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetra-(4-pyridyl)-porphine and Some of its Metal Complexes **Inorganic Chemistry**, vol. 1, p. 493-495, 1962.
- [51] SUGATA, S.; YAMANOUCI, S.; MATSUSHIMA, Y. meso-Tetrapyridylporphins and Their Metal Complexes. Syntheses and Physico-Chemical Properties. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 25, p. 884-889, 1977.
- [52] TORRENS, M. A.; STRAUB, D. K.; EPSTEIN, L. M. Moessbauer studies on oxo-bridged iron(III) porphines, **Journal of the American Chemical Society**, vol. 94, p. 4160, 1972.
- [53] NERI, B. P.; WILSON, G. S. Electrochemical reduction of some tetrapyridylporphines, **Analytical Chemistry**, vol. 45, p. 442-445, 1973.
- [54] LITTLE, R. G. et al. The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins, **Journal of Heterocyclic Chemistry**, vol. 12, p. 343-349, 1975.
- [55] KALYANASUNDARAM, K. Photochemistry of Water-Soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyridyl- and Tetrakis(N-Methylpyridinium¹)porphyrins, **Inorganic Chemistry**, vol. 23, p. 2453-2459, 1984.
- [56] Pasternack, R. F.; Sutin, N.; Turner, D. H. Some Very Rapid Reactions of Porphyrins in Aqueous Solution, **Journal of the American Chemical Society**, vol. 98, p. 1908-1913, 1976
- [57] HAMBRIGHT, P.; GORE, T.; BURTON, M. Synthesis and Characterization of New Isomeric Water-Soluble Porphyrins. Tetra(2-7V-methylpyridyl)porphine and Tetra(3-TV-methylpyridyl)porphine, **Inorganic Chemistry**, vol. 15, n. 9, 1976.
- [58] PRASEUTH, D. et al. Photocleavage of dna in the presence of synthetic water-soluble porphyrins, **Photochemistry and Photobiology**, vol. 44, n. 6, p. 717-724, 1986.
- [59] VERLHAC, J. B.; GAUDEMER, A.; KRALJIC, I. Water-soluble porphyrins and metalloporphyrins as photosensitizers in aerated aqueous solutions. I. Detection and determination of quantum yield of formation of singlet oxygen, **New Journal of Chemistry**, vol. 8, p. 401-406, 1984.
- [60] TANIELIAN, C.; WOLFF, C. Porphyrin-Sensitized Generation of Singlet Molecular Oxygen: Comparison of Steady-State and Time-Resolved Methods, **Journal of Physical Chemistry A**, vol. 99, p. 9825-9830, 1995.
- [61] PEREIRA, G. F. M.; TASSO, T. T. From cuvette to cells: How the central metal ion modulates the properties of phthalocyanines and porphyrazines as photosensitizers, **Inorganica Chimica Acta**, vol. 519, p. 120271, 2021.

- [62] EZZEDDINE, R. et al. Effect of Molecular Characteristics on Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Phototoxicity of Zn(II) N-Alkylpyridylporphyrins, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 288, NO. 51, pp. 36579–36588, 2013.
- [63] ALENEZI, K. et al. Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, vol. 17, p. 154-159, 2017.
- [64] BATINIC-HABERLE, I. et al. Relationship among Redox Potentials, Proton Dissociation Constants of Pyrrolic Nitrogens, and in Vivo and in Vitro Superoxide Dismutating Activities of Manganese(III) and Iron(III) Water-Soluble Porphyrins, **Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 4011-4022, 1999.
- [65] BENOVA, L. et al. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 402, p.159-165, 2002.
- [66] SPASOJEVIC, I. et al. Rotational Isomers of N-Alkylpyridylporphyrins and Their Metal Complexes. HPLC Separation, ¹H NMR and X-ray Structural Characterization, Electrochemistry, and Catalysis of O₂ Disproportionation, *Inorganic Chemistry*, vol. 41, p. 5874-5881, 2002.
- [67] TOVMASYAN, A. G. et al. Methoxy-derivatization of alkyl chains increases the in vivo efficacy of cationic Mn porphyrins. Synthesis, characterization, SOD-like activity, and SOD-deficient E. coli study of meta Mn(III) N-methoxyalkylpyridylporphyrins, **Dalton Transactions**, vol. 40, p. 4111–4121, 2011.
- [68] ODEH, A. M. et al. Targeting Mitochondria by Zn(II)NAlkylpyridylporphyrins: The Impact of Compound Sub-Mitochondrial Partition on Cell Respiration and Overall Photodynamic Efficacy, **Plos One**, vol. 9, 2014.
- [69] AL-MUTAIRI, D. A. et al. Inactivation of metabolic enzymes by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin, **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1770, p. 1520-1527, 2007.
- [70] ANDRADE, C. G. et al. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*, **Photochemical & Photobiological Sciences**, vol. 17, p. 482–490, 2018.
- [71] VIANA, O. S. et al. Comparative Study on the Efficiency of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers, **Molecules**, vol. 20, p. 8893-8912, 2015.

- [72] FUCHTER, M. J., et al, Porphyrazines: Designer Macrocycles by Peripheral Substituent Change, **Australian Journal of Chemistry**, vol. 61, p. 235–255, 2008.
- [73] RODRÍGUEZ-MORGADE, M. S., STUZHIN, P. A., The chemistry of porphyrazines: an overview, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, vol. 8, p. 1129-1165, 2004.
- [74] ANDERSON, M. E.; BARRETT, A. G. M.; HOFFMAN, B. M. Super-Charged Porphyrazines: Synthesis and Physical Properties of Octacationic Tetraazaporphyrins, **Inorganic Chemistry**, vol. 38, p. 6143-6151, 1999.
- [75] DONZELLO, M. P., et al. Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with Externally Appended Pyridine Rings. 15. Effects of the Pyridyl Substituents and Fused Exocyclic Rings on the UV–Visible Spectroscopic Properties of Mg(II)–Porphyrazines: A Combined Experimental and DFT/TDDFT Study, **Inorganic Chemistry**, vol. 53, p. 8009-8019, 2014.
- [76] SCISCIONE, F. et al. Octakis(2-pyridyl)porphyrazine and Its Neutral Metal Derivatives: UV–Visible Spectral, Electrochemical, and Photoactivity Studies, **Inorganic Chemistry**, vol. 56, p. 5813–5826, 2017.
- [77] SCISCIONE, F. et al. Photoactivity of New Octacationic Magnesium(II) and Zinc(II) Porphyrazines in a Water Solution and G-Quadruplex Binding Ability of Differently Sized Zinc(II) Porphyrazines, **Inorganic Chemistry**, vol. 56, p. 12795-12808, 2017.
- [78] MAIA, C. G. C. Otimização da síntese da meso-tetraquis(2-piridil)porfirina e estudos de Mn e Fe-porfirinas como modelos biomiméticos da enzima catalase, 2015. (Mestrado em Química), Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa.
- [79] SHI, D. F. Quadruplex-Interactive Agents as Telomerase Inhibitors: Synthesis of Porphyrins and Structure-Activity Relationship for the Inhibition of Telomerase, **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 44, p. 4509-4523, 2001.
- [80] WHEELHOUSE, R. T.; HURLEY, L. H. Porphyrin compounds as telomerase inhibitors, The International Patent System, 1998.
- [81] LOMOVA, T. N.; BEREZIN, B. D. Porphyrin Complexes with p, d, and f Metals in High Oxidation States: Structures, Electronic Absorption, and IR Spectra, **Russian Journal of Coordination Chemistry**, v.27, p. 85-104, 2001.
- [82] GOUTERMAN, M. Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin, *Journal of Chemical Physics*, vol. 30, n. 5, p. 1139-1160, 1959.
- [83] SEIDEL, R. W. et al. On the structure of unsolvated free-base 5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin, **Journal of Molecular Structure**, vol. 985, p.307–315, 2011.

- [84] FULMER, G. R. et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist, **Organometallics**, vol. 29, p. 2176–2179, 2010.
- [85] BATINIC-HABERLE, I. et al. A Potent Superoxide Dismutase Mimic: Manganese b-Octabromo-meso-tetrakis-(N-methylpyridinium-4-yl) Porphyrin, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 343, p. 225-233, 1997.
- [86] WANG, C. et al. Fast Catalytic Hydroxylation of Hydrocarbons with Ruthenium Porphyrins, *Inorganic Chemistry*, vol. 45, p. 4769-4782, 2006.
- [87] SPYROULIAS, G. A. et al. Comparative Study of Structure-Properties Relationship for Novel α -Halogenated Lanthanide Porphyrins and Their Nickel and Free Bases Precursors, as a Function of Number and Nature of Halogens Atoms, **Inorganic Chemistry**, vol. 41, p. 2648-2659, 2002.
- [88] PINTO, V. H. A. et al. Thermal stability of the prototypical Mn porphyrin-based superoxide dismutase mimic and potent oxidative-stress redox modulator Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin chloride, MnTE-2-PyP⁵⁺, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 73, p. 29-34, 2013.
- [89] KOS, I. et al. Lipophilicity of potent porphyrinbased antioxidants: comparison of ortho and meta isomers of Mn(III) N-alkylpyridylporphyrins, **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 47, p. 72-78, 2009.
- [90] KOS, I. et al. High lipophilicity of meta Mn(III) N-alkylpyridylporphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimics compensates for their lower antioxidant potency and makes them equally effective as ortho analogues in protecting SOD-deficient E. coli, **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 52, p. 7868-7872, 2009.
- [91] BATINIC-HABERLE, I. et al. Manganese(III) meso-tetrakis(ortho-N-alkylpyridyl)porphyrins. Synthesis, characterization, and catalysis of O₂^{•-} dismutation, **Dalton Transactions**, p. 2689-2696, 2002.
- [92] PARIDA, M. R. et al. Tunable Photophysical Processes of Porphyrin Macrocycles on the Surface of ZnO Nanoparticles, **Journal of Physical Chemistry A**, vol. 119, n. 5, p. 2614-2621, 2015.
- [93] SALTSMAN, I.; BOTOSHANSKY, M.; GROSS, Z. Facile synthesis of ortho-pyridyl-substituted corroles and molecular structures of analogous porphyrins, *Tetrahedron Letters*, vol. 49, p. 4163-4166, 2008.

- [94] SALKER, A. V.; GOKAKAKAR, S. D. Solar assisted photo-catalytic degradation of Amido Black 10B over cobalt, nickel and zinc metalloporphyrins, **Journal of Physical Sciences**, vol. 4, n. 6, p. 377-384, 2009.
- [95] REBOUÇAS, J. S.; CARVALHO, M. E. M. D.; IDEMORI, Y. M. Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, selfcoordinating aggregation properties, and catalytic studies, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, vol. 6, p. 50-57, 2002.
- [96] NIYOMURA, O. et all. One-pot synthesis of indolizine derivative and its application as multi-dentate ligand, **Heterocycles**, Vol. 75, n. 2, p. 297-304, 2008.
- [97] YEH, H. et all. Derivative of α -Dicyanostilbene: Convenient Precursor for the Synthesis of Diphenylmaleimide Compounds, E-Z Isomerization, Crystal Structure, and Solid-State Fluorescence, **Journal of Organic Chemistry**, vol. 69, p. 6455-6462, 2004.
- [98] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 31 de março de 1999, Disponível em: <<https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/landingpage?sdbno=9984>> Acesso em 09 de Janeiro de 2022.
- [99] TASSO, T. T.; FURUYAMA, T.; KOBAYASHI, N. Dinitriles Bearing AIE-Active Moieties: Synthesis, E/Z Isomerization, and Fluorescence Properties, **Chemistry-A European Journal**, vol. 21, p. 4817-4824, 2015.
- [100] IZQUIERDO, M. A. et all. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy, **Journal of Materials Chemistry B**, vol. 3, p. 1089-1096, 2015.
- [101] VIOLA, E. et all. Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with externally appended pyridine rings. 17. Photosensitizing properties and cellular effects of Zn^{II} octacationic and Zn^{II}/Pt^{II} hexacationic macrocycles in aqueous media: Perspectives of multimodal anticancer potentialities. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, vol. 169, p. 101-109, 2017.
- [102] WILLIAMS. A. T. R.; WINFIELD. S.A.; MILLER, J. N. Relative fluorescence quantum yields using computer controlled luminescence spectrometer, *Analyst*, vol. 108, p. 1067, 1983.
- [103] DHAMI, S. et all. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers of reabsorption effect? **Photochemistry and Photobiology**, vol. 61, p. 341, 1995.
- [104] DEDA, D. K. et all. Correlation of photodynamic activity and singlet oxygen quantum yields in two series of hydrophobic monocationic porphyrins, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, vol. 16, p. 55-63, 2012.

- [105] GHAZAL, B. et al. Phthalocyanines and Tetrapyrazinoporphyrines with Two Cationic Donuts: High Photodynamic Activity as a Result of Rigid Spatial Arrangement of Peripheral Substituents, **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 60, p. 6060-6076, 2017.
- [106] 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 Chemistry A**, vol. 22, p. 113-262, 1993.
- [107] REDMOND, R. W.; GAMLIN, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, **Photochemistry and Photobiology**, vol. 70, p. 391-475, 1999.
- [108] TANIELIAN, C.; GOLDBERGER, L.; WOLFF, C. Production and quenching of singlet oxygen by the sensitizer in dye-sensitized photo-oxygenation, **Journal of Photochemistry**, vol. 25, p.117-125, 1984.
- [109] SPILLER, W. et al. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, vol. 2, p. 145-158, 1998.
- [110] STRACKE, F.; HEUPEL, M.; THIEL, E. Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 126, p. 51-58, 1999.
- [111] GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, vol. 65, p. 45-80, 2005.
- [112] WEINKAUF, J. R. et al. Substituent and solvent effects on the hyperporphyrin spectra of diprotonated tetraphenylporphyrins, **Journal of Physical Chemistry A**, vol. 107, p. 3486-3496, 2003.
- [113] ZAKAVI, S. et al. Effects of Core and/or Peripheral Protonation of meso-Tetra(2-, 3-, and 4-pyridyl)Porphyrin and meso-Tetra(3-methylpyridyl)Porphyrin on Their UV-vis Spectra, **Journal of Spectroscopy**, 2013.
- [114] ZAKAVI, S.; GHARAB, N. G. Interaction of para-substituted meso-tetraphenylporphyrins and meso-tetra(n-propyl)porphyrin with weak and strong carboxylic acids: A UV-Vis spectroscopic study, **Polyhedron**, vol.26, p.2425-2432, 2007.
- [115] LUDVIKOVA, L. et al. Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: a comprehensive kinetic analysis, **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 18, p. 16266-16273, 2016.

- [116] SKUPIN-MRUGALSKA, P. Cationic porphyrines with morpholinoethyl substituents – Syntheses, optical properties, and photocytotoxicities, *Dyes and pigments*, vol. 197, p. 109937, 2022.
- [117] NYOKONG, T.; ANTUNES, E. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines, ***Coordination Chemistry Reviews***, vol. 251, p. 1707-1722, 2007.
- [118] DARWENT, J. R. et al. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen, ***Coordination Chemistry Reviews***, vol. 44, p. 83-126, 1982.
- [119] TSUBONE, T. M. et al. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage, ***Scientific Reports***, vol. 7, n.6734, 2017.
- [120] TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effects, ***Journal of Physical Chemistry A***, vol. 100, p. 6555-6560, 1996.
- [121] GOTTFRIED, V. et al. Photosensitizers in organized media: singlet oxygen production and spectral properties, ***Photochemistry and Photobiology***, vol. 48, n. 2, p. 157-163, 1988.
- [122] KIMEL, S. et al. Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins. and phthalocyanines, ***Photochemistry and Photobiology***, vol. 50, n. 2, p. 175-183, 1989.
- [123] MACHACEK, M. et al. Tetra(3,4-pyrido)porphyrines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers, ***Journal of Medicinal Chemistry***, vol. 59, p. 9443-9456, 2016.
- [124] LAVI, A.; JOHNSON, F. M.; EHRENBERG, B. Wavelength dependence of the fluorescence and singlet oxygen quantum yields of new photosensitizers, ***Chemical Physics Letters***, vol. 231, p. 144-150, 1994.
- [125] SCHMIDT, R.; SEIKEL, K.; BRAUER, H. D. Determination of the Phosphorescence Quantum Yield of Singlet Molecular Oxygen ($^1\Delta_g$) in Five Different Solvents, ***Journal of Physical Chemistry***, vol. 93, p. 4507-4511, 1989.
- [126] ZENKEVICH, E. et al. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, vol. 33, p. 171-180, 1996.
- [127] CASTRO, K. A. D. F. et al. Comparison of the Photodynamic Action of Porphyrin, Chlorin, and Isobacteriochlorin Derivatives toward a Melanotic Cell Line, *ACS Applied Bio Materials*, vol. 4, p. 4925-4935, 2021.

[128] OLIVEIRA, C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency, *Free Radical Biology & Medicine*, vol.51, p. 824-833, 2011.

[129] ISAK, S. J; EYRING, E. M. Cresyl violet chemistry and photophysics in various solvents and micelles, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, vol. 64, p. 343-358, 1992.

[130] GOMES, A. T. P. C., et al. Photodynamic effect of glycochlorin conjugates in human cancer epithelial cells, ***RSC Advances***, vol. 5, p. 33496–33502, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sistema de irradiação de fitas de LED RGB multicolorido.

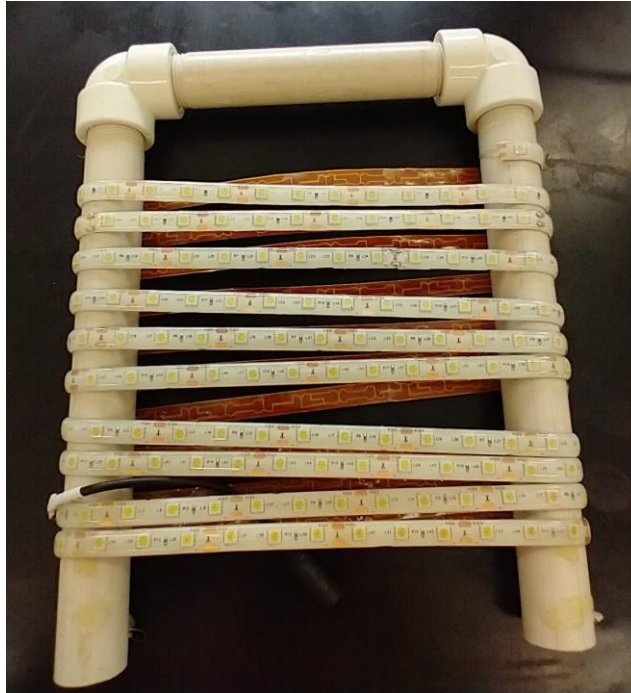


Figura 46 - Sistema de irradiação de fitas de LED RGB multicolorido.

APÊNDICE B – Sistema de LED vermelho para irradiação de placas celulares.



Figura 47 - Sistema de irradiação com 24 LEDs de 3 W de potência cada, com comprimento de onda na faixa de 620-630 nm. Possui ajuste de altura e potência, possibilitando 6 configurações diferentes de operação para a irradiação de placas celulares. A irradiância do arranjo de LEDs, foi medida em um potenciômetro FieldMate da marca Coherent, no comprimento de onda máximo de emissão.

APÊNDICE C – Reações complementares na síntese da Dinitrila

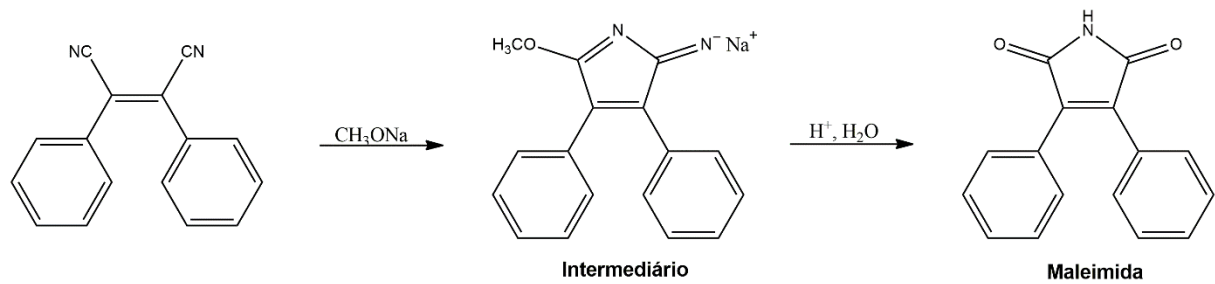


Figura 48 - Esquema da reação de obtenção do produto de ciclização intramolecular (intermediário) e maleimida.

APÊNDICE D - Validação da metodologia de Φ_{Δ} utilizando um sistema de LED

Os primeiros experimentos de Φ_{Δ} realizados neste trabalho, foram feitos utilizando o arranjo de LEDs (Figura 46, pág. 76, Apêndice A) no sistema mostrado na Figura 49 (pág. 79). O trabalho de Bonacin e colaboradores (2009) foi utilizado como referência para desenvolver a metodologia e a realização dos cálculos de Φ_{Δ} .³⁶



Figura 49 - Sistema de irradiação de LED para experimento de Φ_{Δ} .

Avaliou-se o decaimento da absorbância em 410 nm da banda do DPBF na presença da $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ utilizando as absorbâncias de 0,4; 0,6; 0,8 e 1 U.A., em que os espectros de absorção na região do UV-Vis foram integrados de 455 a 610 nm (faixa de emissão do laser) para obter um valor de área (Figura 50, pág. 80). Repetiu-se o experimento nas mesmas condições para a referência H_2TPP .

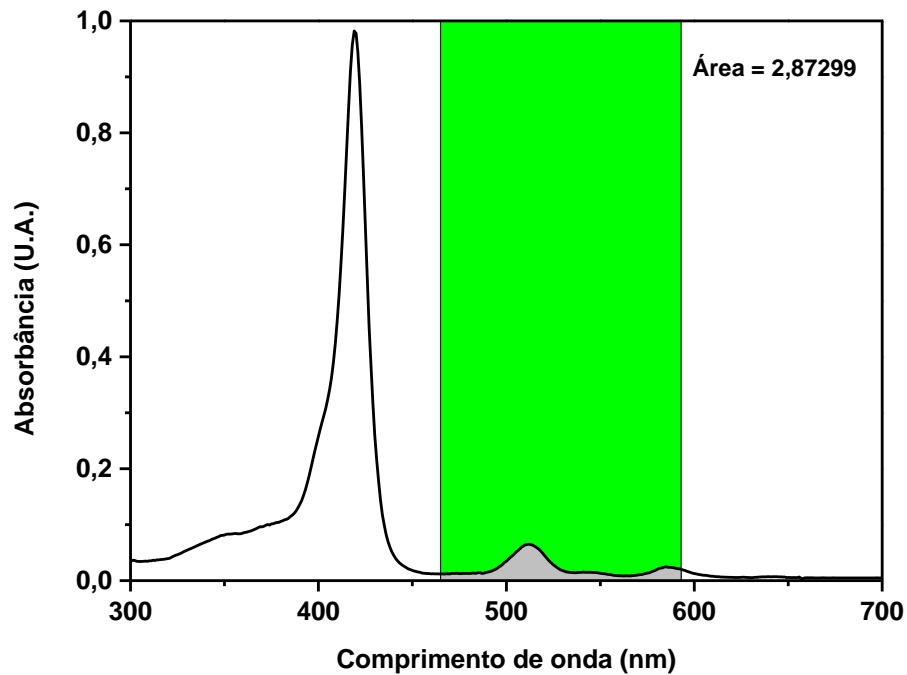


Figura 50 - Espectro de absorção na região do UV-Vis da $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ ($3,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em acetonitrila com a área correspondente da emissão do laser verde sendo integrada.

Após plotar os gráficos de absorbância de DPBF em 410 nm *versus* tempo de irradiação para cada experimento, pegou-se o coeficiente angular da equação da reta, também denominado de constante de decaimento (k^{-1}), juntamente com os valores de área e plotou-se outro gráfico (Figura 51, pág. 81), sendo feita uma interpolação linear para se obter a equação da reta desse novo gráfico.

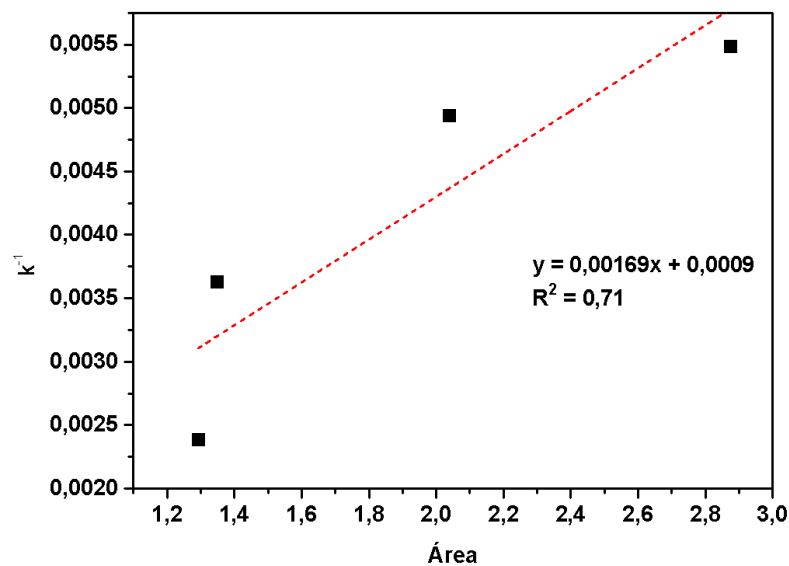


Figura 51 - Correlação entre as constantes de decaimento e áreas dos espectros de absorção para o experimento de Φ_{Δ} para a $\text{H}_2\text{T3EPyPCl}_4$ em acetonitrila.

O valor do coeficiente angular (CA) obtido para o composto de interesse e para a referência, foi utilizado para os cálculos de Φ_{Δ} , conforme mostrado na Equação 3.

$$\Phi_{\Delta \text{ composto}} = \frac{CA_{\text{composto}} \times \Phi_{\Delta \text{ referência}}}{CA_{\text{referência}}} \quad (\text{Equação 3})$$

A Tabela 7 mostra os valores de Φ_{Δ} obtidos para a $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ em acetonitrila. Esses valores indicam que a metodologia não foi reproduzível, pois analisando a Figura 51 (pág. 81), os pontos obtidos não seguem uma linearidade, em que apenas algumas replicatas obtidas tiveram um R^2 acima de 0,95. Com isso, verifica-se que o erro do CA e o desvio padrão (DP) do valor de Φ_{Δ} são relativamente altos, mostrando que a metodologia não é confiável.

Tabela 7 - Valores de Φ_{Δ} para a $\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$ em acetonitrila utilizando o sistema de LED.

Composto	Φ_{Δ}							Média	DP
$\text{H}_2\text{TE3PyPCl}_4$	0,59	0,34	0,32	0,44	0,43	0,33	0,48	0,42	0,1

APÊNDICE E – Gráficos para obtenção de k^{-1} no experimento de validação da metodologia de Φ_{Δ} .

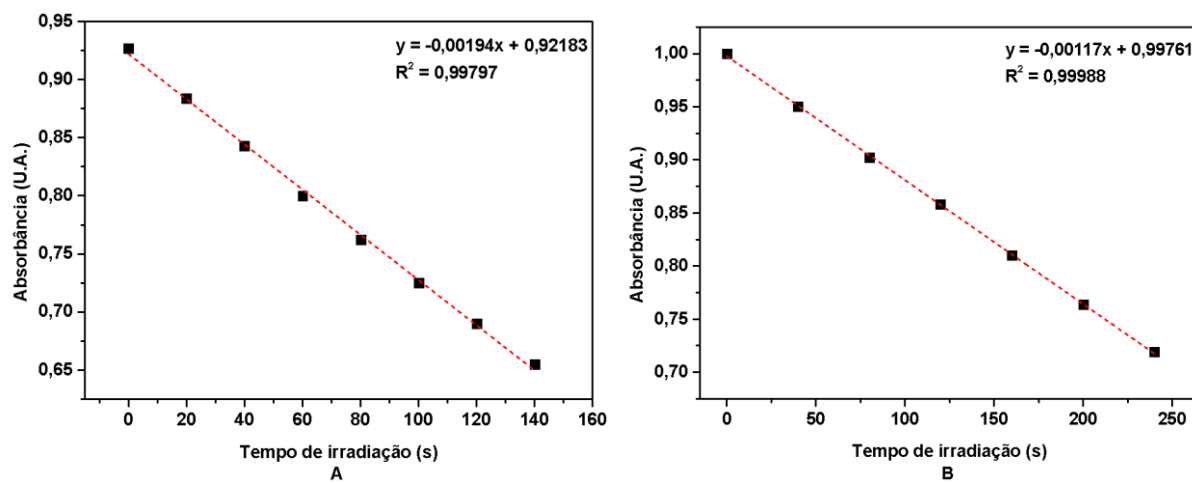


Figura 52- Gráfico entre as absorvâncias do DPBF em 410 nm em relação ao tempo de irradiação para o experimento A: rosa bengala; B: azul de metileno.

APÊNDICE F – Espectros e gráficos referentes aos experimentos de Φ_{Δ} .

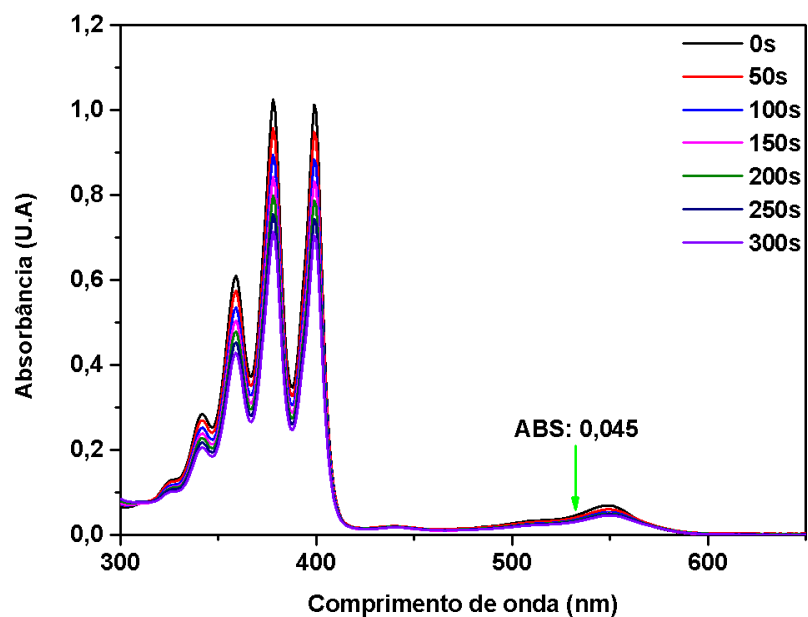


Figura 53 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do ABDA com o rosa bengala em água, sob irradiação do laser verde (seta verde).

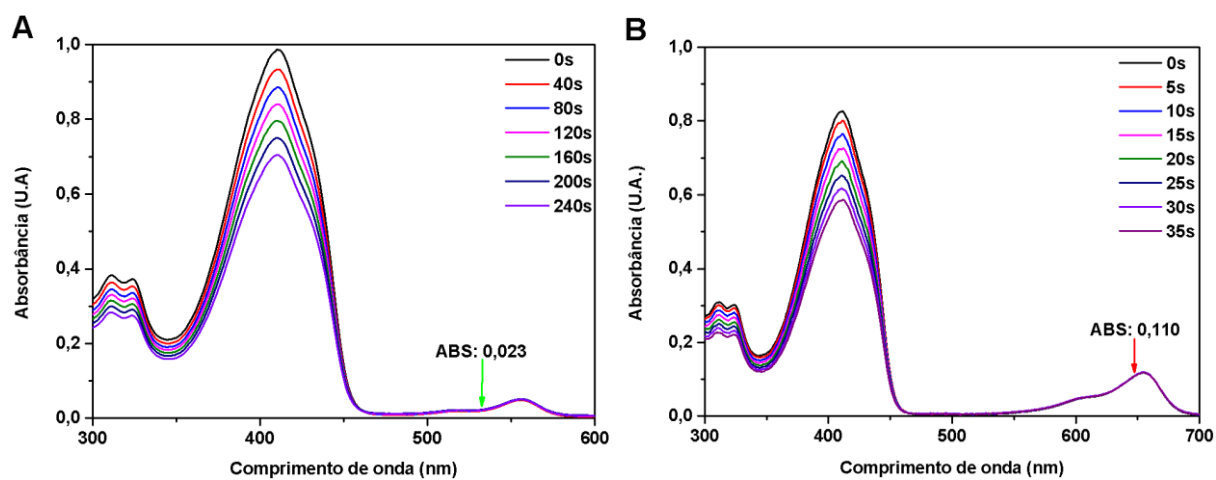


Figura 54 - Espectro de absorção na região do UV-Vis de decaimento do DPBF com A: rosa bengala em acetonitrila, sob irradiação do laser verde (seta verde); B: azul de metileno em acetonitrila, sob irradiação do laser vermelho (seta vermelha).

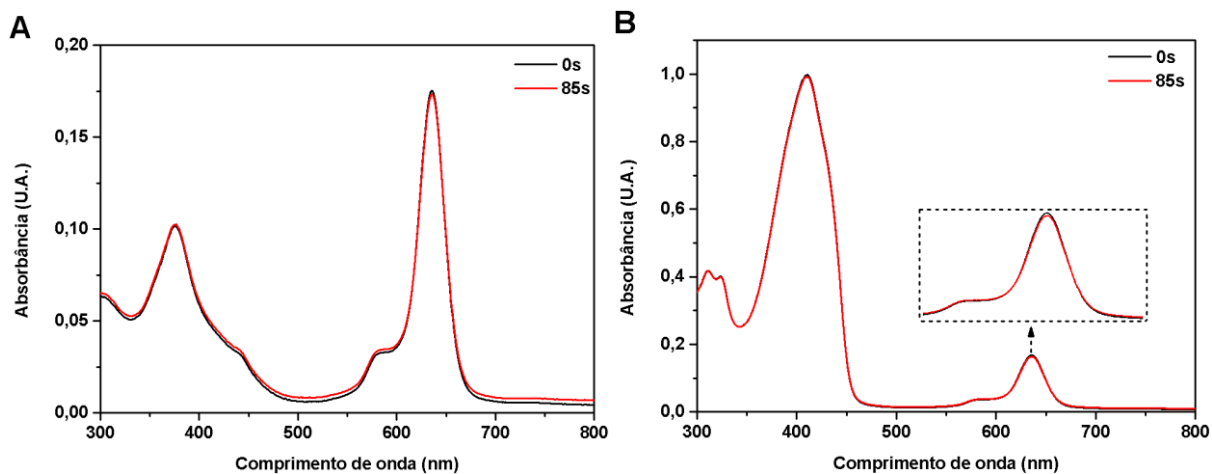


Figura 55 - Espectros de absorção na região do UV-Vis da $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$ reproduzindo o experimento de Φ_{Δ} em acetonitrila, A: sem DPBF e irradiação; B: com DPBF e sem irradiação.

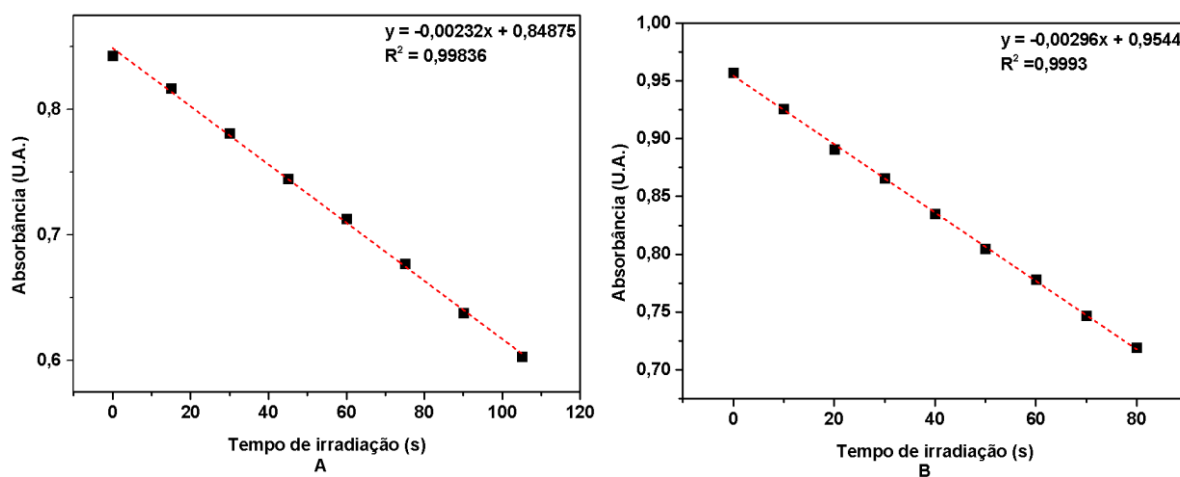


Figura 56 - Gráfico entre absorbância e tempo de irradiação de A: $H_2(3EPy)_8PzCl_8$; B: $[Zn(3EPy)_8Pz]Cl_8$.

APÊNDICE G – Gráfico referente ao experimento de incorporação celular.

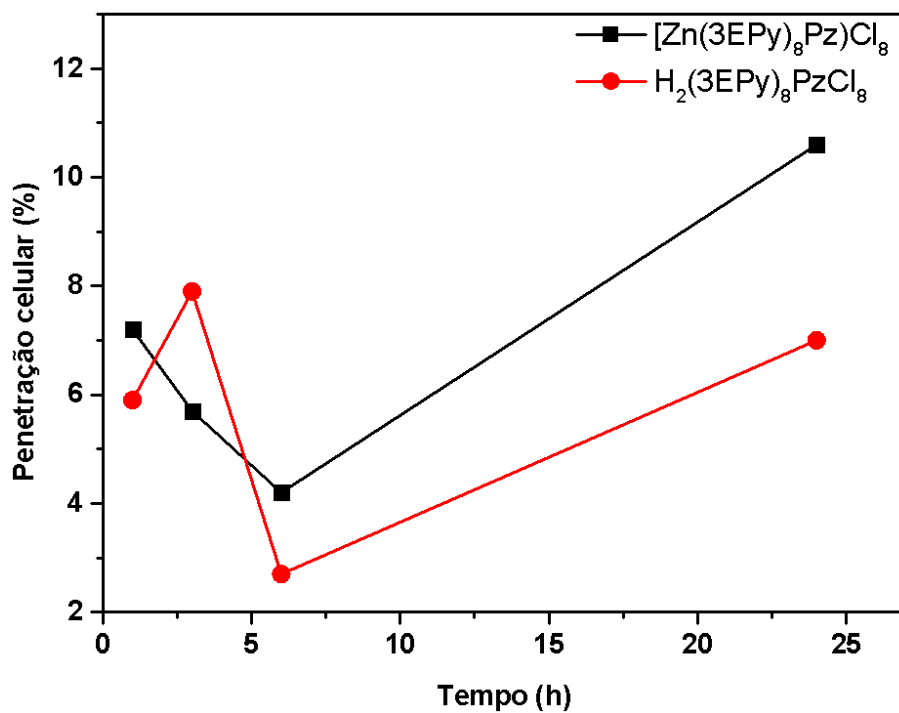


Figura 57 - Gráfico entre a penetração celular de acordo com o tempo de incubação para a H₂(3EPy)₈PzCl₈ e [Zn(3EPy)₈Pz]Cl₈.