



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Thiago Vargas Acunha

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO FOTOFÍSICO DE
MESO-TRANS-(PENTAFLUOROFENIL)CORRÓIS E AVALIAÇÃO
DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS**

Santa Maria, RS
2021

Thiago Vargas Acunha

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO FOTOFÍSICO DE *MESO-TRANS*-
(PENTAFLUOROFENIL)CORRÓIS E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM
BIOMOLÉCULAS**

Tese, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Santa Maria, RS
2021

Acunha, Thiago
Síntese, Caracterização, Estudo Fotofísico de Meso-trans
(pentafluorofenil)corróia e Avaliação da Interação com
Biomoléculas / Thiago Acunha.- 2021.
159 p. ; 30 cm

Orientador: Bernardo Almeida Iglesias
Coorientador: Bárbara Tirloni
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2021

1. Corróis 2. Fotofísica 3. DNA 4. HSA I. Almeida
Iglesias, Bernardo II. Tirloni, Bárbara III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFPA. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

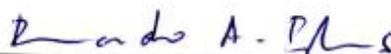
Declaro, THIAGO ACUNHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thiago Vargas Acunha

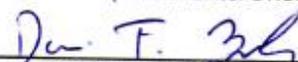
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO FOTOFÍSICO DE *MESO-TRANS*-
(PENTAFLUOROFENIL)CORRÓIS E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM
BIOMOLÉCULAS

Tese, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Aprovado em 15 de Janeiro de 2021:



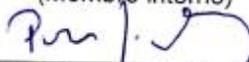
Bernardo Almeida Iglesias, Doutor (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Davi Fernando Back, Doutor (UFSM)
(Membro interno)



Roberta Cargnelutti, Doutor (UFSM)
(Membro interno)



Pablo José Gonçalves, Doutor (UFG)
(Membro externo)



Fabiano Severo Rodembusch, Doutor (UFRGS)
(Membro externo)

Santa Maria, RS
2021

Resumo

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO FOTOFÍSICO DE *MESO-TRANS*- (PENTAFLUOROFENIL)CORRÓIS E AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

AUTOR: Thiago Vargas Acunha
ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Este trabalho tratou da síntese do 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – [**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**] e do 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – [**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**], partindo dos precursores benzaldeído e 1-pirenocarboxaldeído, respectivamente, além do 5-(pentafluorofenil)dipirrometano. Estas moléculas foram caracterizadas através de diferentes técnicas como análise elementar CHN%, espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis, ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹⁹F e COSY 2D ¹H-¹H, espectrometria de massas de alta-resolução, voltametria cíclica, bem como seus rendimentos quânticos de geração de oxigênio singlete, fotodegradação e fluorescência. Também foi avaliada a capacidade dos corróis em interagir com biomoléculas tais como a albumina de soro humano (HSA) e DNA. Ao serem comparados a outros corróis na literatura, o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** apresentaram satisfatórios rendimentos quânticos de oxigênio singlete e elevada fotoestabilidade, características estas que os tornam potenciais agentes em aplicações biológicas como interação com proteínas e DNA. Diante destes fatos, interações com as biomoléculas foram realizadas através de ensaios de espectroscopia de fluorescência e de absorção eletrônica na região do UV-vis e determinou-se que **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** apresentaram elevadas constantes de associação (*K_a*) em 37 °C, os quais foram 7,00 x 10³ L mol⁻¹ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e 1,11 x 10⁴ L mol⁻¹ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), e ocorrem espontaneamente, uma vez que foi constatado que a variação da energia livre de Gibbs para os corróis foi negativo ($\Delta G < 0$). A interação entre corrol e DNA também foi investigada. Por espectroscopia eletrônica na região do UV-vis obteve-se, como constantes de ligação (*K_b*), 1,49 x 10⁵ L mol⁻¹ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e 1,05 x 10⁶ L mol⁻¹ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), valores estes que estão acima das constantes de ligação encontradas na literatura. Por espectroscopia de fluorescência, a constante de Stern-Volmer (*K_{sv}*) foi utilizada para determinar a capacidade interativa dos corróis com o DNA. Os valores de *K_{sv}* determinados foram: 1,36 x 10⁴ L mol⁻¹ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e 1,59 x 10⁴ L mol⁻¹ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**). Também, com o auxílio de estudos teóricos de *docking* molecular, foi possível estimar a posição preferencial dos corróis ao interagirem com as biomoléculas. Para os dois corróis, as pontuações de *docking* indicaram o sulco menor como sítio preferencial do DNA e o subdomínio IIA, para o HSA. Por fim, a principal interação entre corróis e DNA/HSA é por forças de van der Waals.

Palavras-chave: Corróis, Fotofísica, DNA e HSA.

Abstract

Synthesis, Characterization, Photophysical studies of *Meso-trans*-(pentafluorophenyl)corroles and Evaluation of Biomolecules Interaction

AUTHOR: Thiago Vargas Acunha
ADVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

This study treated the synthesis of 5,15-bis(pentafluorophenyl)-10-(phenyl)corrol – [**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**] and 5,15-bis(pentafluorophenyl)-10-(pyrenil)corrol – [**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**], starting from the precursors benzaldehyde and 1-pyrenecarboxaldehyde, respectively, in addition to the 5-(pentafluorophenyl)dipyrromethane. These molecules were characterized by different techniques such as elemental CHN analysis, UV-vis electronic absorption spectroscopy, ¹H, ¹⁹F and COSY 2D ¹H-¹H nuclear magnetic resonance, high-resolution mass spectrometry, cyclic voltammetry, as well as its singlet oxygen generation, photodegradation and emission fluorescence. The ability of the corroles to interact with biomolecules such as human serum albumin (HSA) and DNA was also evaluated. When compared to other corroles in the literature, **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** and **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** presented satisfactory singlet oxygen quantum yields and high photostability, characteristics that make them potential agents in biological applications such as interaction with proteins and DNA. In view of these facts, interactions with biomolecules were performed through emission fluorescence and UV-vis absorption assays and it was determined that **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** and **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** presented high association constants (K_a) at 37 °C, which were $7.00 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) and $1.11 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), and occur spontaneously, once it was found that the variation of Gibbs free-energy for the corroles was negative ($\Delta G < 0$). The interaction between corrole and DNA was also investigated. By UV-vis electronic spectroscopy, $1.49 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) and $1.05 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**) values were obtained as binding constants (K_b) and $1.05 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), values that are above the binding constants found in the literature. By steady-state emission fluorescence spectroscopy, the Stern-Volmer constant (K_{sv}) was used to determine the interactive ability of the corroles with DNA. The K_{sv} values determined were: $1.36 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) and $1.59 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**). Also, theoretical studies by molecular docking, it was possible to estimate the preferential position of the corroles when interacting with the biomolecules. For both corroles, the docking scores indicated the minor groove as the preferred site of DNA and the subdomain IIA for the HSA. Finally, the main interaction between corroles and DNA/HSA is by van der Waals forces.

Keywords: Corroles, Photophysics, DNA e HSA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Bernardo Almeida Iglesias pela sua orientação, prestatividade, conhecimento e amizade ao longo destes anos;

Agradeço aos colegas de laboratório que estiveram presentes durante o mesmo período tanto para auxílios relacionados ao doutorado quanto para outros temas recorrentes do dia a dia;

Agradeço aos professores e colaboradores que participaram deste trabalho: Prof. Klaus (UFMG) pelas medidas de EPR, Prof. Luiz Antônio (UFJF) pelos cálculos teóricos TD-DFT e ao Otávio Augusto Chaves (SENAI-RJ) pelos cálculos de modelagem molecular e ensaios fotobiológicos com DNA e HSA;

Agradeço à minha companheira Danusa pelo incentivo, companheirismo e amizade sempre que precisei de seu apoio;

Agradeço ao CNPq pelo fornecimento da minha bolsa de estudos durante o período que necessitei e

Agradeço a UFSM pela possibilidade de eu aprofundar os meus conhecimentos por meio de instalações, professores e conhecimento apropriados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural dos corróis sintetizados nesta tese. _____	21
Figura 2: Representações estruturais de porfirina e corrol e suas posições. _____	24
Figura 3: Representações de tautômeros em corróis do tipo base-livre. _____	25
Figura 4: Perfil característico de absorção eletrônica em UV-Vis de um corrol base-livre _____	37
Figura 5: Diagrama de Jablonski simplificado, destacando os processos de emissão e seus respectivos tempos pelos quais a energia pode ser dissipada. _____	39
Figura 6: Exemplo dos perfis espectroscópicos de seis diferentes corróis. _____	40
Figura 7: Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio. _____	42
Figura 8: Espectros de UV-visível do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor , em CH ₂ Cl ₂ e DMSO. _____	49
Figura 9: Ensaio de agregação dos corróis em diferentes solventes (DMSO e DCM), sendo (A) e (B) H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e, (C) e (D), H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor . Ensaio em DMSO são em A e C, e DCM são em B e D. ____	53
Figura 10: Espectros de absorção eletrônica do DPBF em DMSO, na presença dos corróis, sob irradiação com luz vermelha (660 nm), sendo (A) H₃Ph(C₆F₅)₂Cor , (B) H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor e (C) H₃Ph₃Cor . _____	54
Figura 11: Espectros de EPR do TEMPOL em função da iluminação do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor . Cada cor corresponde a uma medida de EPR, sendo o tempo zero a ausência de irradiação. _____	57
Figura 12: Concentração dos adutos de spin de TEMP em função da irradiação branca e vermelha. ____	57
Figura 13: a) Espectro do aduto de spin de PBN experimental e simulado após irradiação com luz branca. b) Comparação entre concentrações de adutos de spin para os corróis. _____	58
Figura 14: Espectro de EPR (linha preta) de adutos de DMPO sob irradiação com luz branca de soluções de H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor em DMSO, na presença de DMPO (0,3 mol L ⁻¹). Simulações espectrais de EPR do aduto de spin DMPO*/•OOH (azul) e DMPO* (linha rosa). O espectro em vermelho é a soma de ambos os espectros. _____	60
Figura 15: Espectros de absorção eletrônica do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor , em DMSO. ____	61
Figura 16: Espectros de emissão dos corróis em seus respectivos solventes após excitação na banda Soret. _____	63
Figura 17: Voltamograma cíclico do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor (a) e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor (b), ambos em solução de DCM contendo 0,1 mol L ⁻¹ de hexafluorofato de tetrabutilamônio (TBAPF ₆) como eletrólito, utilizando taxa de escaneamento de 100 mV s ⁻¹ . _____	66
Figura 18: Representação do HSA com seus respectivos domínios e subdomínios. _____	69
Figura 19: Espectros de emissão do HSA na presença de corrol. _____	70
Figura 20: Espectros de dicroísmo circular de α -hélice e β -folha. _____	73
Figura 21: Representação simplificada da espectroscopia de dicroísmo circular. _____	73
Figura 22: Representação estrutural do DNA e suas cavidades. _____	75
Figura 23: Principais modos de interação observados entre DNA e espécie química. _____	76
Figura 24: Espectros de UV-vis do HSA (linha preta), corróis (linha vermelha) HSA:corrol (linha azul) e espectro subtraído (HSA:corrol) – (corrol) (linha verde) em solução de PBS (pH = 7.4) em 37 °C. [HSA] = 1.00 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e [corrol] = 2.78 × 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ . _____	83

Figura 25: Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos corróis à 37 °C, em DMSO. _____	84
Figura 26: Gráfico de $[\text{corrol}] \times (F_0/F)$ para obter-se as constantes de Stern-Volmer nas diferentes temperaturas analisadas. _____	85
Figura 27: Gráfico de termos da equação de Stern-Volmer adaptado para interação entre HSA e corróis em 16, 23, 30, 37 e 44 °C. _____	85
Figura 28: Gráfico da equação modificada de Van't Hoff para interação entre HSA e corróis em 16, 23, 30, 37 e 44 °C. _____	87
Figura 29: Espectros de fluorescência sincronizada da interação entre corróis e HSA. $[\text{HSA}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{corróis}] = 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,74; 2,09; 2,44$ e $2,78 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. _____	88
Figura 30: Espectros de dicroísmo circular do HSA (UV distante) na ausência e na presença de diferentes proporções dos corróis. $[\text{HSA}] = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. _____	90
Figura 31: Espectros de dicroísmo circular do HSA (UV próximo) na ausência e na presença de diferentes proporções dos corróis. $[\text{HSA}] = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. _____	90
Figura 32: Resultados de docking molecular para a interação HSA:corrol dentro dos subdomínios IIA (sítio I), IIIA (sítio II) e IB (sítio III). Resíduos de aminoácidos selecionados estão representados como bastões em marrom, enquanto o H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e o H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor estão em amarelo e rosa, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio (branco), nitrogênio (azul-escuro), flúor (azul-claro) e oxigênio (vermelho). _____	93
Figura 33: Espectros de absorção eletrônica dos corróis após adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4. _____	97
Figura 34: Espectros de emissão dos corróis após sucessivas adições de soluções de CT-DNA. _____	99
Figura 35: Espectros de fluorescência resultantes da interação entre HSA e H₃Ph(C₆F₅)₂Cor , em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). $[\text{CT-DNA}] = 2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{AO}] = [\text{DAPI}] = [\text{MG}] = 2,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{corrol}] = 0$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. _____	100
Figura 36: Espectros de fluorescência resultantes da interação entre HSA e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor , em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). $[\text{CT-DNA}] = 2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{AO}] = [\text{DAPI}] = [\text{MG}] = 2,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{corrol}] = 0$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. _____	101
Figura 37: Resultados de docking molecular para a interação DNA:corrol. Resíduos de nucleotídeos estão representados como bastões em marrom, enquanto o H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor são nas cores amarelo e rosa, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio (branco). _____	102
Figura 38: Espectros de massa do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor . _____	106
Figura 39: Espectro de ¹ H-RMN do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	107
Figura 40: Espectro de ¹ H-RMN do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	107
Figura 41: Espectro de COSY 2D ¹ H- ¹ H do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	108
Figura 42: Espectro de COSY 2D ¹ H- ¹ H do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	108
Figura 43: Espectro de ¹⁹ F-RMN do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	109
Figura 44: Espectro de ¹⁹ F-RMN do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor em CDCl ₃ . _____	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros espectroscópicos dos corróis, relacionando as transições eletrônicas (λ (nm); ϵ ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)) em diferentes solventes. _____	51
Tabela 2: Coeficiente de correlação (R^2) e concentração (mol L^{-1}) dos corróis em diferentes solventes. _____	53
Tabela 3: Parâmetros fotofísicos para determinação do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$. _____	55
Tabela 4: Comparativo entre rendimentos quânticos de $^1\text{O}_2$ do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor com corróis da literatura. _____	56
Tabela 5: Parâmetros fotofísicos para determinação do rendimento quântico de fotodegradação. _____	62
Tabela 6: Parâmetros fotofísicos utilizados para cálculo do rendimento quântico de fluorescência. _____	64
Tabela 7: Comparativo entre rendimentos quânticos de fluorescência do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor com outros corróis. _____	65
Tabela 8: Potenciais redox do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor em solução de DCM (E versus EPH). _____	66
Tabela 9: Processos associados aos parâmetros termodinâmicos _____	72
Tabela 10: Parâmetros de associação para a interação entre HSA e corróis em cinco temperatura e pH = 7,4. _____	86
Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos para a interação entre HSA e corróis em cinco temperatura e pH = 7,4. _____	87
Tabela 12: Conteúdo de α -hélice restante (%) para o HSA (em tampão PBS) após contato com H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor , em 37 °C. _____	90
Tabela 13: Pontuação de docking molecular para interação do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor com o HSA. _____	91
Tabela 14: Resultados de docking molecular para a interação entre H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e HSA. _____	94
Tabela 15: Resultados de docking molecular para a interação entre H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor e HSA. _____	95
Tabela 16: Constante de ligação (K_b) do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor comparados aos da literatura. _____	98
Tabela 17: Constantes de Stern-Volmer obtidos para os corróis após interação com DNA, em DMSO, à 37 °C. Os possíveis desvios dos valores obtidos foram omitidos para melhor visualização. _____	100
Tabela 18: Pontuação de docking molecular para interação do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor e do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor com o DNA. _____	103
Tabela 19: Resultados de docking molecular para a interação entre DNA e corróis. _____	103
Tabela 20: Resultado das análises elementares de CHN (%) das amostras _____	105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Exemplo geral da reação de formação de uma corrol do tipo trans-A ₂ B e de um corrol do tipo A ₃ . _____	18
Esquema 2: Representação geral da metodologia sintética de Gross, Galili e Saltsman. _____	27
Esquema 3: Representação geral da metodologia sintética de Gryko _____	28
Esquema 4: Representação geral da metodologia sintética de Koszarna e Gryko. _____	30
Esquema 5: Síntese do H₃Ph(C₆F₅)₂Cor. _____	32
Esquema 6: Síntese do H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor. _____	33
Esquema 7: Mecanismo proposto para síntese dos meso-trans-(pentafluorofenil)corróis. _____	34
Esquema 8: Representação da reação entre DPBF e ¹ O ₂ . _____	43
Esquema 9: Spin traps TEMP, PBN e DMPO reagindo com ¹ O ₂ , •OH e •O ₂ ⁻ , respectivamente. _____	44
Esquema 10: Formação do radical metila a partir do DMSO e radical hidroxila. _____	58

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação de Lambert-Beer. _____	36
Equação 2: Rendimento quântico de fluorescência [13]. _____	41
Equação 3: Rendimento quântico de oxigênio singlete [48]. _____	43
Equação 4: Rendimento quântico de fotodegradação. _____	45
Equação 5: Determinação da constante de Stern-Volmer [38]. _____	70
Equação 6: Determinação da constante de associação (K_a). _____	71
Equação 7: Equação modificada de van't Hoff _____	72
Equação 8: Equação da Variação da Energia Livre de Gibbs. _____	72
Equação 9: Determinação do dicróismo molar residual (MRE). _____	74
Equação 10: Determinação da porcentagem de mudanças na α -hélice em 208 nm. _____	74
Equação 11: Determinação da porcentagem de mudanças na α -hélice em 222 nm. _____	74
Equação 12: Determinação da constante de ligação (K_b). _____	77
Equação 13: Equação para correção de filtro interno de emissão do HSA. _____	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (ordem de aparição)

DDQ - 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona
TFA - Ácido trifluoroacético
DPM – Dipirrometano
DMF – N,N'-dimetilformamida
THF – Tetrahidrofurano
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital
UV-vis – Espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
DPBF – 1,3-difenilisobenzofurano
EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica
TEMP - 2,2,6,6-tetrametilpiperidina
PBN - α -fenil-N-terc-butil-nitrona
DMPO - N-óxido de 5,5-dimetilpirrolina
DMSO – Dimetilsulfóxido
DCM – Diclorometano
EPH – Eletrodo Padrão de Hidrogênio
ATP – Adenosina Trifosfato
CPL – Luz Circularmente Polarizada
RCPL – Luz Circularmente Polarizada à Direita
LCPL – Luz Circularmente Polarizada à Esquerda
MRE – Dicroísmo Molar Residual
EB – Brometo de Etídio
MG – Verde de Metila
DAPI - 4',6'-(diamidino)-2'-(fenil)indol
AO – Alaranjado de Acridina
DFT – Teoria Funcional da Densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVOS GERAIS	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. ASPECTOS GERAIS	24
3.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	24
3.2. METODOLOGIAS DE SÍNTESE	26
3.2.1 Síntese de Gross e colaboradores	26
3.2.2. Síntese de Paolesse e colaboradores	27
3.2.3. Síntese de Gryko	28
3.2.4. Síntese de Kozarna e Gryko	29
4. SÍNTESES DOS CORRÓIS	32
4.1. SÍNTESE DO 5,15-BIS(PENTAFLUOROFENIL)-10-(FENIL)CORROL	32
4.2. SÍNTESE DO 5,15-BIS(PENTAFLUOROFENIL)-10-(PIRENIL)CORROL	33
4.3. MECANISMO DAS SÍNTESES	34
5. PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E FOTOFÍSICAS	36
5.1. REVISÃO DA LITERATURA	36
5.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	36
5.1.2. Espectroscopia de fluorescência	37
5.1.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO)	41
5.1.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})	44
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.2.1. Absortividade molar e teste de agregação	45
5.2.2. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) via decomposição do DPBF	46
5.2.3. Geração de espécies reativas de oxigênio via EPR.	47
5.2.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})	47
5.2.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	48
5.2.6. Voltametria cíclica	48
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	49

5.3.1.1. Absortividade molar (ϵ)	49
5.3.1.2. Teste de agregação	51
5.3.2. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) via fotodegradação do DPBF	54
5.3.3. Geração de espécies reativas de oxigênio via EPR	56
5.3.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})	60
5.3.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	62
5.3.6. Voltametria Cíclica	65
6. INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS	68
6.1. REVISÃO DA LITERATURA	68
6.1.1. Interação com HSA	68
6.1.2. Interação com DNA	74
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	78
6.2.1. Ensaio de interação com HSA	78
6.2.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	78
6.2.1.2. Espectroscopia de fluorescência no estado fundamental	78
6.2.1.3. Espectroscopia de dicroísmo circular	80
6.2.2. Ensaio de interação com DNA	80
6.2.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	80
6.2.2.2. Espectroscopia de fluorescência	81
6.2.3. Estudo das interações com biomoléculas via docking molecular	81
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	82
6.3.1. Interação com HSA	82
6.3.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	82
6.3.1.2. Espectroscopia de fluorescência	83
6.3.1.3. Fluorescência sincronizada	88
6.3.1.4. Espectroscopia de dicroísmo circular	89
6.3.1.5. Interação com HSA: estudo de docking molecular	90
6.3.2. Interação com DNA	96
6.3.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível	96
6.3.2.2. Espectroscopia de fluorescência	98
6.3.2.3. Interação com DNA: estudo de docking molecular	101
7. MICROANÁLISES E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	105
7.1. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN%)	105
7.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRMS) ACOPLADA A IONIZAÇÃO QUÍMICA POR PRESSÃO ATMOSFÉRICA (APCI)	105

7.3. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H	107
7.4. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR COSY 2D ^1H - ^1H	108
7.5. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{19}F	109
8. CONCLUSÕES	111
9. ARTIGOS PUBLICADOS	114
10. REFERÊNCIAS	116



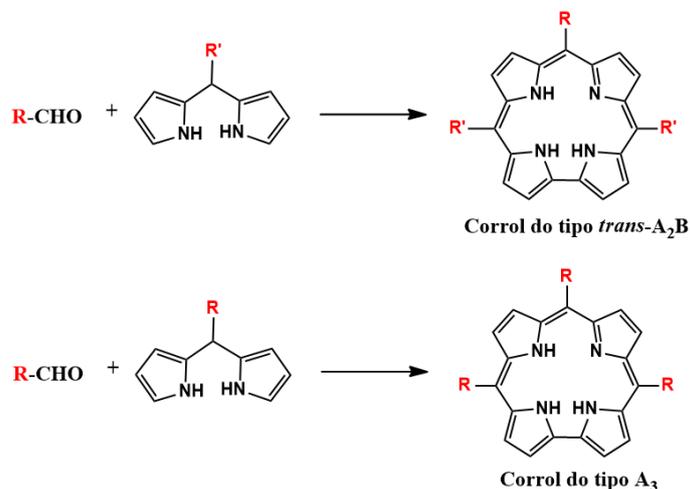
Capítulo 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

Corróis são moléculas formadas por unidades de pirrol e semelhantes a seus análogos porfirínicos. Sua diferença estrutural encontra-se na ausência de um carbono *meso* nos corróis, o que ocasiona em uma ligação direta entre duas unidades de pirrol [1]. Esta ligação modifica a simetria molecular do corrol (C_{2v}) em relação a porfirina (D_{4h}) [2]. Assim como as porfirinas, os corróis são compostos aromáticos devido as suas conjugações formadas por elétrons π , permitindo que eles também sejam utilizados em reações orgânicas como reações de substituição eletrofílica/nucleofílica, nitração, sulfonação, entre outras [3].

A síntese destes compostos baseia-se na utilização de pirrol e aldeídos em diferentes proporções estequiométricas. Entre os principais produtos, os corróis do tipo *trans*- A_2B e do tipo A_3 são os mais conhecidos na literatura (onde A e B são os substituintes) (Esquema 1). Para tais resultados, pode-se utilizar como reagentes aldeídos contendo grupos funcionais diversos e unidades de pirrol, ou mesmo dipirrometanos substituídos. A reação de oxidação para a aromatização do intermediário formado ocorre utilizando-se agentes oxidantes, mais usualmente o 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona (DDQ) ou tetra-cloro-*p*-benzoquinona (*p*-cloranil), transformando o corrol em uma molécula aromática [1, 4, 5].

Esquema 1: Exemplo geral da reação de formação de uma corrol do tipo *trans*- A_2B e de um corrol do tipo A_3 .



De maneira geral, os corróis apresentam propriedades fotofísicas (fluorescência, geração de espécies reativas de oxigênio e fotoestabilidade) que os tornam potenciais moléculas para interações com biomoléculas como o DNA e proteínas como albuminas de soro humano (HSA) e de soro bovino (BSA), as quais desempenham funções essenciais no organismo.

Devido a capacidade transportadora de agentes químicos do HSA, ela credencia-se como um dos principais alvos de pesquisas envolvendo biomoléculas. A interação entre HSA e corróis pode ser investigada por técnicas espectroscópicas de emissão fluorescente e de absorção na região do UV-Vis [6, 7, 8].

A interação entre corróis e DNA pode ocorrer através de, principalmente, ligações covalentes (coordenação) ou por interações não-covalentes (intercalação ou via sulcos) [9]. Para o modo covalente, se faz necessário a presença de íons metálicos com orbitais disponíveis para ocorrer a coordenação. Já o modo não-covalente é investigado a partir da utilização de competidores por sítios de interação, como os corantes alaranjado de acridina (intercalação de bases nitrogenadas), verde de metila (sulco maior do DNA) e 4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI (sulco menor do DNA) [9, 10].

Nesta tese, com o objetivo de avaliar seu comportamento fotofísico em solução e potencial aplicação em ensaios interativos com biomoléculas, foram sintetizados *meso-trans*-(pentafluorofenil)corróis. Desta forma, com o auxílio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, as amostras foram devidamente caracterizadas. Para determinação de suas potencialidades interativas com DNA e HSA, utilizou-se como modelo os parâmetros termodinâmicos e constantes fotofísicas, além de cálculos teóricos por modelagem molecular (*molecular docking*) que permitem prever o modo preferencial de interação.

Para melhor entendimento, esta tese está dividida em capítulos, sendo o capítulo 5 destinado aos conceitos e resultados fotofísicos das moléculas sintetizadas e, o capítulo 6, aos conceitos e resultados de ensaios da interação do DNA e HSA com os corróis. O capítulo 5 está publicado em *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2020**, 22, 16965-16977. Já o capítulo 6 está publicado em *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* (DOI: 10.1142/S1088424620500534).



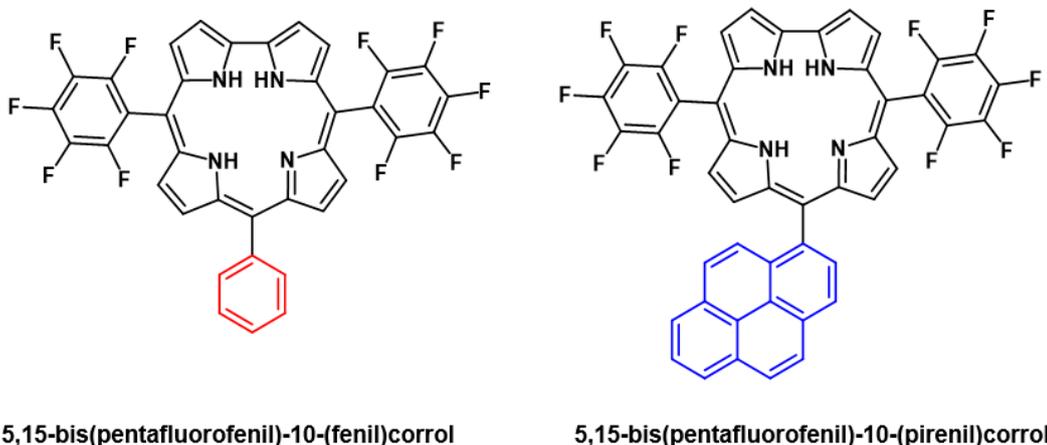
Capítulo 2 - Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar *meso-trans*-(pentafluorofenil)corróis, utilizando como materiais de partida o 5-(pentafluorofenil)dipirrometano [5-(C₅F₆)DPM] e aldeídos aromáticos como benzaldeído e 1-pirenocarboxaldeído, para formar respectivamente, 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol e o 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol (Figura 1).

Figura 1: Representação estrutural dos corróis sintetizados nesta tese.



2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Sintetizar o 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol - **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, inédito na literatura;
- II. Sintetizar o 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol - **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, inédito na literatura;
- III. Caracterizar as espécies sintetizadas via análises elementar (CHN%), espectrometria de massas de alta resolução acoplada a ionização química por pressão atmosférica (HRMS-APCI), ressonância magnéticas nuclear (RMN) de ¹H, ¹⁹F e COSY 2D ¹H-¹H, espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis e espectroscopia de fluorescência molecular;

- IV. Quantificar os parâmetros fotofísicos como rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}), rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) e rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD}); avaliar, também, a capacidade dos corróis em produzir outras espécies reativas de oxigênio pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR);
- V. Avaliar a interação dos corróis sintetizados com biomoléculas como albumina de soro humano (HSA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio de parâmetros obtidos experimentalmente como a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), a constante cinética biomolecular de Stern-Volmer (k_q), de Ligação (K_b), de Associação (K_a), além dos termos termodinâmicos como variação da energia livre de Gibbs (ΔG), de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS);
- VI. Determinar, por meio de cálculos teóricos de modelagem molecular, os sítios preferenciais de interação do HSA e DNA com os respectivos corróis e
- VII. Estimar, a partir das informações obtidas, se os corróis apresentam propriedades que as habilitem para estudos mais aprofundados sobre interações com biomoléculas.



Capítulo 3 - Aspectos Gerais

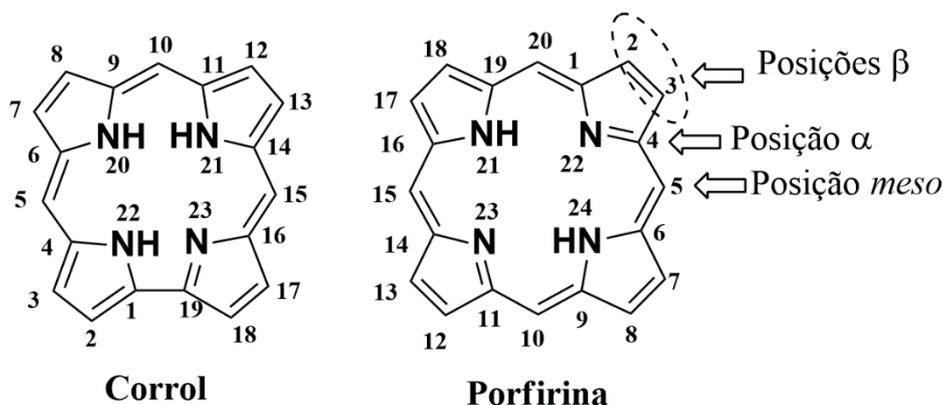
3. ASPECTOS GERAIS

3.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

Assim como as porfirinas, os corróis apresentam macrociclo tetrapirrólico formados por quatro moléculas de pirrol, porém a diferença estrutural entre elas está na ausência de um carbono *meso* em sua estrutura, o que ocasiona em uma ligação direta entre dois pirróis (Figura 2), e, por consequência, há um encurtamento da distância entre eles sendo, aproximadamente, 1,433 Å, ao passo que esta distância é, em porfirinas, aproximadamente, 1,799 Å (considerando a presença do carbono *meso*) [1, 11].

Individualmente, as unidades de pirrol são estruturalmente planares, mas aos formarem o anel macrocíclico, a ausência de um carbono *meso* impede que o corrol torne-se completamente planar devido as distorções necessárias para que haja uma ligação C-C efetiva entre dois pirróis [11, 12]. Contudo, detalhes como estes conferem características distintas ao seu análogo porfirínico como propriedades eletrônicas [13], fotofísicas [14] e biológicas [15].

Figura 2: Representações estruturais de porfirina e corrol e suas posições.

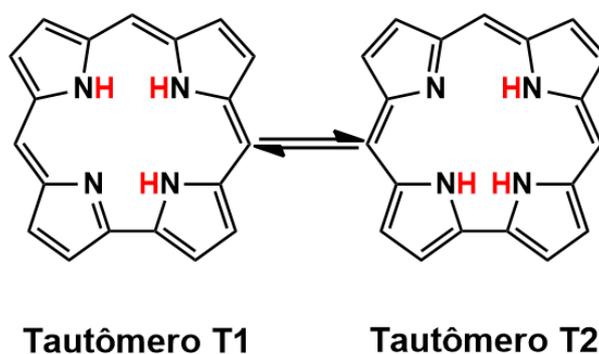


Fonte: Próprio autor.

Outra particularidade observada em corróis é a possibilidade de a molécula existir na forma de tautômeros (Figura 3) quando estiver na forma base-livre. Isto é causado pela inexistência de um carbono em sua estrutura, resultando em uma menor simetria (C_{2v}) quando comparada a das porfirinas (D_{4h}), permitindo que

existam três hidrogênios em vez de dois na cavidade de molécula [2], já que a energia necessária para formação de tautômeros é menor para corrol ($2,45 \text{ kcal mol}^{-1}$) [16] do que para porfirina (17 kcal mol^{-1}) [17]. Além das diferenças estruturais supracitadas, a presença de diferentes substituintes nas posições *meso* do macrociclo pode proporcionar diferentes características aos corróis como, por exemplo, grau de acidez, propriedades eletrônicas e eletroquímicas [18].

Figura 3: Representações de tautômeros em corróis do tipo base-livre.



Fonte: Ivanova, Y. B., et al. *The Journal of Physical Chemistry*, **2012**, 116, 10683-10694.

A química de coordenação em corróis é peculiar. O anel macrocíclico dos corróis apresenta um ambiente propício à quelação de cátions metálicos de pequeno raio iônico, pois os quatro nitrogênios podem atuar como bases de Lewis, tornando o corrol um ligante tetradentado [19]. Além disso, outras características podem facilitar a coordenação como: (i) a presença de três hidrogênios ionizáveis na cavidade do anel podendo conduzir o corrol a uma molécula tri-aniônica, e (ii) possuir uma cavidade menor do que de uma porfirina e, caso haja a desprotonação, haverá uma maior densidade eletrônica nesta região tornando o corrol um bom σ -doador, permitindo o corrol coordenar íons metálicos em elevados estados de oxidação [19,20, 21].

Os corróis também obedecem a Regra de Hückel ($4n + 2$ elétrons π) para moléculas aromáticas já que possuem um sistema altamente conjugado [22]. A aromaticidade confere alta estabilidade a este tipo de estrutura, além de permitir que sistemas assim possam participar de diferentes tipos de reação envolvendo

moléculas aromáticas como substituição eletrofílica/nucleofílica, nitração e sulfonação [23].

3.2. METODOLOGIAS DE SÍNTESE

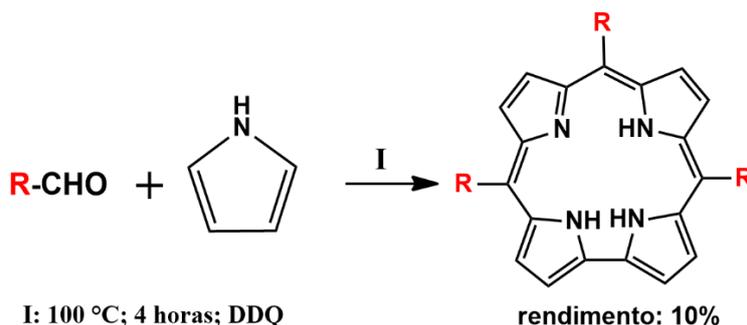
3.2.1 Síntese de Gross e colaboradores

As metodologias sintéticas atualmente utilizadas baseiam-se na síntese de porfirinas proposta por Rothmund (1935) [24].

Tendo conhecimento de que o benzaldeído é capaz de formar porfirinas *meso*-aril-substituídas e de que porfirinas substituídas com grupos pentafluorados (C_6F_5) podem coordenar íons metálicos capazes de atuar como catalisadores para oxidação de hidrocarbonetos [25], Gross, Galili e Saltsman (1999) produziram diferentes corróis *meso*-substituídos tendo estes aldeídos como materiais de partida em quantidades equimolares de pirrol, na ausência de solvente [1].

Estas reações sucederam-se por quatro horas em uma temperatura de 100°C e, para obter a aromaticidade do macrociclo, o produto foi oxidado com 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona (DDQ) em atmosfera ambiente (Esquema 2) [1]. A síntese de Gross e colaboradores possibilitou a formação de corróis com um único tipo de substituinte, conhecidos como corróis tri-substituídos do tipo A_3 . Entretanto, porfirinas correspondentes também foram obtidas na mesma rota sintética com, aproximadamente, 8% de rendimento.

Esquema 2: Representação geral da metodologia sintética de Gross, Galili e Saltsman.



Fonte: Gross, Z., Galili, N., & Saltsman, I. *Angewandte Chemie International Edition*, **1999**, 38, 1427-1429.

3.2.2. Síntese de Paolesse e colaboradores

Diferindo ligeiramente do que Gross, Galili e Saltsman fizeram, Paolesse e colaboradores (2001) conseguiram determinar que a formação de corrol é influenciada pela razão molar entre pirrol e aldeído aromático, já que foi possível obter o produto desejado em quantidades consideráveis quando a razão foi 3:1 (pirrol:aldeído) na presença de ácido acético sob condição de refluxo [26]. Além disso, quando o aldeído apresentava grupos retiradores de elétrons, como o NO_2 , pôde-se obter um rendimento próximo a 22% dependendo da posição do substituinte no respectivo aldeído, além de evitar a formação da porfirina na mesma rota de síntese.

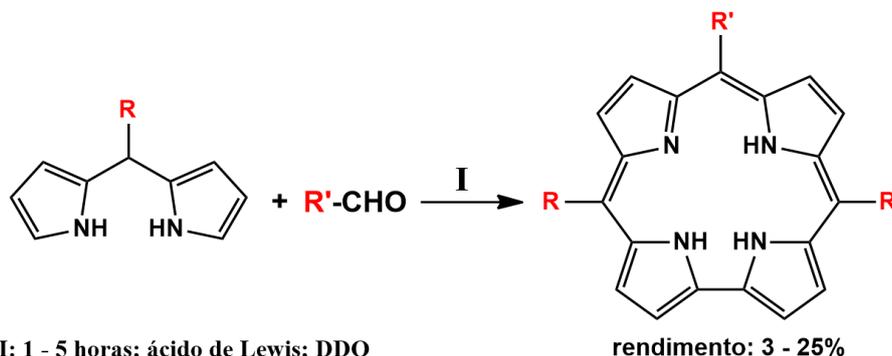
A presença deste tipo de substituinte, segundo os autores, aumenta a reatividade do aldeído. Entretanto, quando aldeídos aromáticos possuíam substituintes nas posições 2 e 6 do anel aromático, o rendimento foi quase nulo independente do substituinte, tendo como causa possível o efeito estérico que impede a efetiva aproximação entre os reagentes durante o processo de formação do macrociclo. Outro fato observado foi de que a presença do agente oxidante tetra-cloro-*p*-benzoquinona (*p*-cloranil) reduziu o tempo reacional sem alteração do rendimento do corrol, isto podendo ser atribuído ao poder oxidante desta quinona [27, 28].

3.2.3. Síntese de Gryko

A síntese proposta por Gross e colaboradores apenas obteve corróis tri-substituídos do tipo A₃ porque usava apenas um único aldeído. Uma metodologia apresentada por Gryko, em 2001 [29], consistiu na obtenção de corróis *trans*-substituídos do tipo A₂B utilizando aldeídos aromáticos e dipirrometano, ambos substituídos, como materiais de partida (Esquema 3).

Esta metodologia teve como base a síntese de porfirinas *trans*-substituídas do tipo A₂B₂ relatada por Littler, Ciringh e Lindsey (1999) [30]. O objetivo desta pesquisa não foi apenas sintetizar corróis *trans*-substituídos, mas também descobrir quais foram as melhores condições experimentais para este fim. Para isto, parâmetros como concentração de reagentes, tipo de solvente, força do ácido de Lewis, tempo reacional e tipo de substituinte nos materiais de partida foram avaliados. Nestas reações, foi utilizada a DDQ como agente oxidante.

Esquema 3: Representação geral da metodologia sintética de Gryko.



Fonte: Gryko, D. T. & Jadach, K. *The Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66, 4267-4275.

Após as reações, os autores chegaram as seguintes conclusões: (i) a reação com maiores quantidades de reagentes, tendo como contrapartida baixas quantidades de ácido trifluoroacético (TFA) como ácido de Lewis, favoreceu a formação de corróis e suprimiu a obtenção de porfirina e (ii) as melhores condições reacionais foram com CH₂Cl₂ como solvente, [DPM]:[aldeído] = 2:1, [TFA] = 1,3 mmol L⁻¹ (para DPM com impedimentos estéricos) ou [TFA] = 0,26 mmol L⁻¹ (para a maioria dos DPM), 5 horas de reação e à temperatura ambiente.

Todas as sínteses supracitadas obtiveram rendimentos satisfatórios na faixa de 3 a 25% quando se tratou de corróis, porém, uma das principais dificuldades em se obter o produto desejado foi a formação de muitos subprodutos da reação como oligocondensados de pirrol, adutos formados entre a DDQ e o dipirrometano e também aldeídos que possuem reatividades similares ao produto desejado [31].

3.2.4. Síntese de Kozarna e Gryko

Um relato importante ocorreu em 2004, quando Kral e colaboradores utilizaram as diferentes solubilidades de pirrol e aldeído em água para se obter dipirrometanos [32]. Os autores também citaram, sem detalhamento, que a presença de metanol foi capaz de reduzir a formação de oligo-condensados durante a síntese.

A partir destas contribuições, Kozarna e Gryko (2006) testaram uma nova metodologia para sintetizar corróis dos tipos A_3 e *trans*- A_2B em duas etapas utilizando aldeídos e pirróis a partir de uma mistura de H_2O e $MeOH$ contendo HCl como catalisador [33]. A primeira etapa sintética consistiu na formação do anel macrocíclico na sua forma reduzida e a segunda, na oxidação do anel para conferir aromaticidade à molécula (Esquema 4).

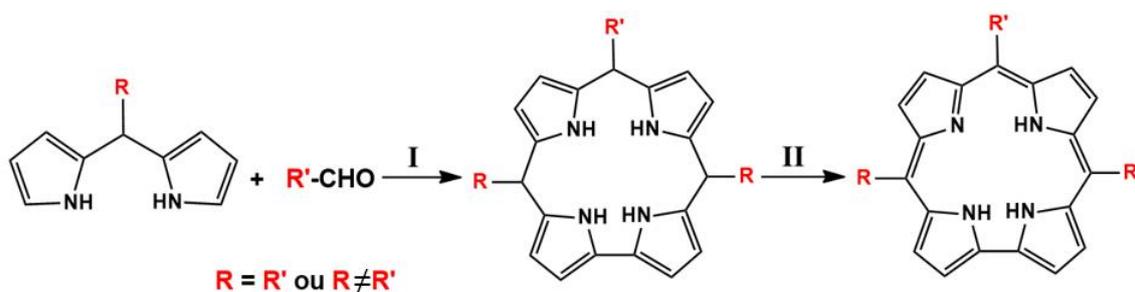
Para a síntese dos corróis, diversas condições reacionais foram utilizadas para verificar qual o melhor rendimento. Sendo assim, a razão entre aldeído e pirrol, a concentração do HCl (ácido de Lewis), a razão entre água e metanol, tempo reacional, agente oxidante, além de testar outro co-solvente foram avaliados.

As conclusões obtidas, de maneira geral, para esta metodologia foram:

- A razão entre aldeído e pirrol mais eficiente foi 1:2 (aldeído:pirrol);
- A concentração do ácido de Lewis não influenciou no rendimento do produto;
- A razão entre H_2O e $MeOH$ que apresentou melhor rendimento (21%) foi 1:1 (v:v);
- A utilização de outros co-solventes (*i*-PrOH, CH_3CN , DMF e THF) decresceu o rendimento para quase nulo;

- O tempo reacional pouco influenciou no rendimento: 19% após 16 horas e 21% após 3 horas e
- A utilização do agente oxidante *p*-cloranil em vez de DDQ fez o rendimento aumentar de 21 para 32%.

Esquema 4: Representação geral da metodologia sintética de Koszarna e Gryko.



I: H₂O:MeOH (1:1); HCl; 1 hora

II: *p*-cloranil; CHCl₃ ou CH₂Cl₂; 24 horas

rendimento: 5 - 50%

Fonte: Koszarna, B. & Gryko, D. T. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 71, 3707-3717.



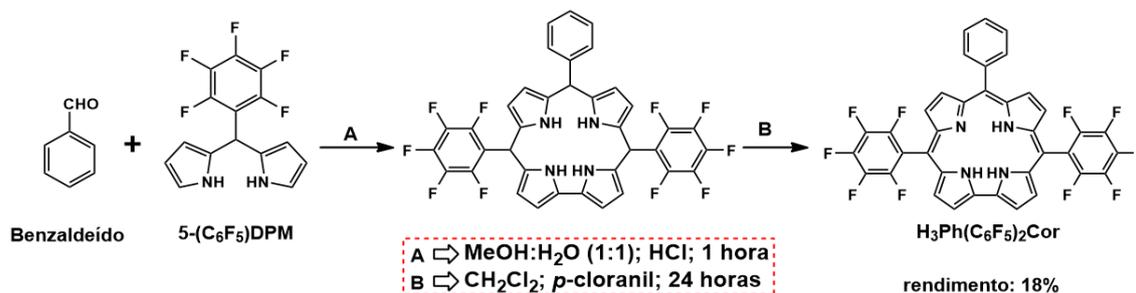
Capítulo 4 - Sínteses dos Corróis

4. SÍNTESES DOS CORRÓIS

O 5,10,15-tri(fenil)corrol ($\text{H}_3\text{Ph}_3\text{Cor}$) utilizado nesta tese foi obtido comercialmente pela Frontier Scientific® (Logan, Utah, EUA). A síntese dos corróis descritas abaixo foram baseadas na metodologia sintética de Gryko e Koszarna (2006) [5].

4.1. SÍNTESE DO 5,15-BIS(PENTAFLUOROFENIL)-10-(FENIL)CORROL

Esquema 5: Síntese do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$.



Procedimento:

Etapa A: em um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionou-se 0,30 mmol (94 mg) de 5-(pentafluorofenil)dipirrometano **5-(C₆F₅)DPM**. Em seguida, adicionou-se 50 mL MeOH para solubilizar o **5-(C₆F₅)DPM**. Após, adicionou-se 0,15 mmol (16,00 μL) de benzaldeído. Por fim, adicionou-se 2,50 mL de ácido clorídrico (12 mol L⁻¹) diluídos em 50 mL de H₂O destilada. Deixou-se a reação ocorrer por uma hora à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada uma extração do produto em funil de separação de 500 mL utilizando CH₂Cl₂. O produto separado no solvente orgânico foi transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL, seguido da evaporação do solvente.

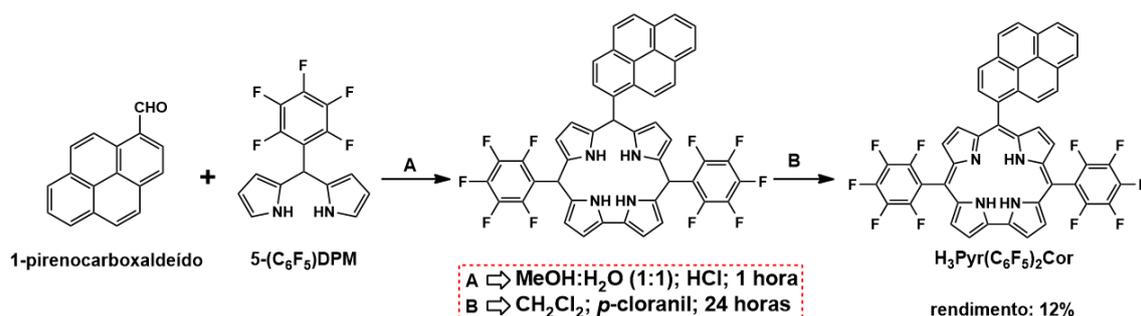
Etapa B: adicionou-se 250 mL de CH₂Cl₂ ao balão reacional e, em seguida, adicionou-se 0,45 mmol (111 mg) de *p*-cloranil, deixando reagir por 24 horas.

Após o período reacional, o produto foi purificado através de cromatografia em coluna e, posteriormente, por placa preparativa, ambas em sílica gel. A mistura de solventes utilizada para eluição foi Hexano:CH₂Cl₂ (2:1) em ambas as separações. Obteve-se um produto de coloração púrpura. O rendimento foi

de, aproximadamente, 18% (19 mg). **RMN de ^1H** (600 MHz, CDCl_3): δ 7,77 (m, 3H, H_a), 8,19 (m, 2H, H_b), 8,57 (bs, 2H, $\text{H}_{3,17}$), 8,70 (s, 4H, H_β), 9,13 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, $\text{H}_{2,18}$). **RMN de ^{19}F** (596 MHz, CDCl_3): $-161,78$ (m, 4F, F_{meta}), $-152,85$ (bs, 2F, F_{para}), $-137,84$ (m, 4F, F_{orto}). Espectros de RMN estão no capítulo 8 (Anexos).

4.2. SÍNTESE DO 5,15-BIS(PENTAFLUOROFENIL)-10-(PIRENIL)CORROL

Esquema 6: Síntese do $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$.



Procedimento:

Etapa A: em um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionou-se 0,30 mmol (94 mg) de 5-(pentafluorofenil)dipirrometano **5-(C_6F_5)DPM**. Em seguida, adicionou-se 50 mL de MeOH para solubilizar o **5-(C_6F_5)DPM**. Após, adicionou-se 0,15 mmol (34 mg) de 1-pirencarboxaldeído. Por fim, adicionou-se 2,50 mL de ácido clorídrico (12 mol L^{-1}) diluídos em 50 mL de H_2O destilada. Deixou-se a reação ocorrer por uma hora à temperatura ambiente. Após este período, realizou-se a extração do produto em funil de separação de 500 mL utilizando CH_2Cl_2 . O produto separado no solvente orgânico foi transferido em um balão de fundo redondo de 500 mL, seguido da evaporação do solvente.

Etapa B: adicionou-se 250 mL de CH_2Cl_2 ao balão reacional e, em seguida, adicionou-se 0,45 mmol (111 mg) de *p*-cloranil, deixando reagir por 24 horas.

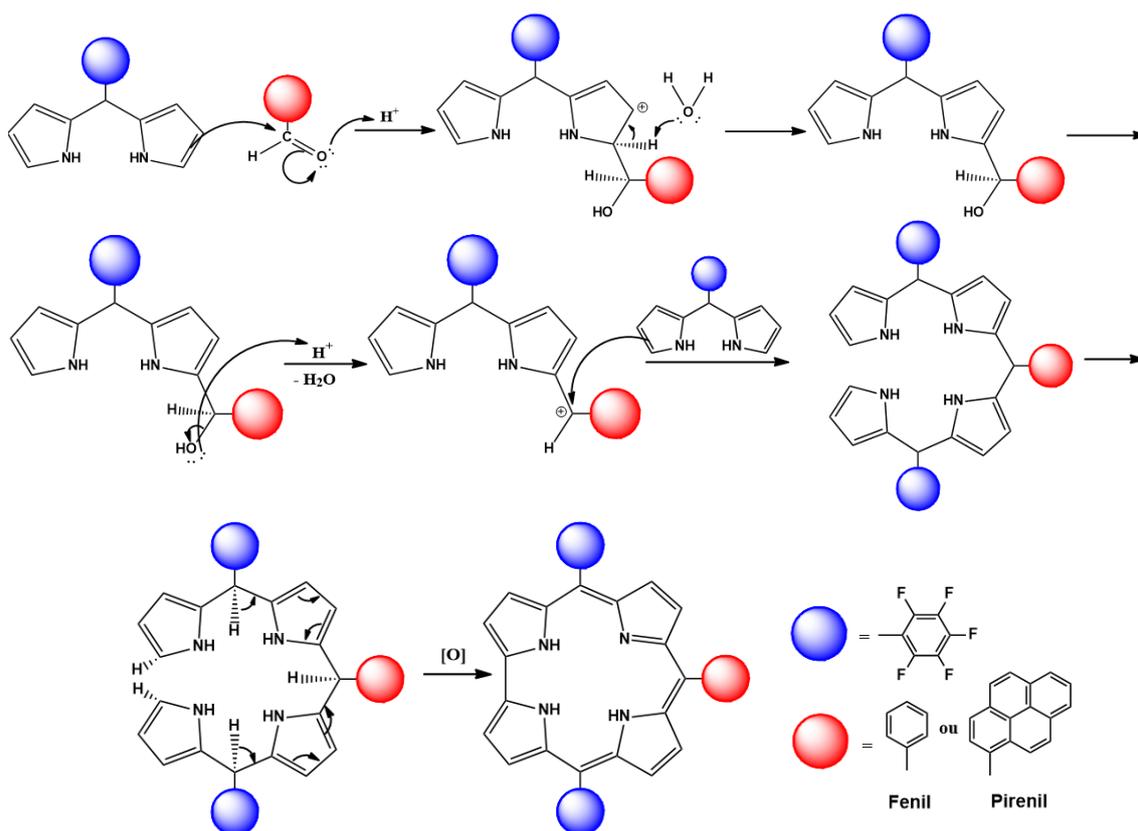
Após o período reacional, o produto foi separado através de cromatografia em coluna e, posteriormente, por placa preparativa, ambas em sílica gel. A mistura de solventes utilizada para eluição foi Hexano: CH_2Cl_2 (2:1) em ambas as separações. Obteve-se um produto de coloração púrpura. O rendimento foi de, aproximadamente, 12% (15 mg). **RMN de ^1H** (600 MHz, CDCl_3): δ 7,48 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_d), 7,73 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_e), 8,08 (t, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_c), 8,13

(d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_f), 8,35 (dd, 4H, $J_1 = 12,0$ Hz e $J_2 = 6,0$ Hz, H_i , H_b e $H_{3,17}$), 8,40 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H_g), 8,53 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H_a), 8,59 (s, 4H, H_β), 8,73 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_j), 9.15 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, $H_{2,18}$). **RMN de ^{19}F** (596 MHz, CDCl_3): -165,78 (m, 4F, F_{meta}), -156,86 (bs, 2F, F_{para}), -141,85 (m, 4F, F_{orto}). Espectros de RMN estão no capítulo 8 (Anexos).

4.3. MECANISMO DAS SÍNTESES

O mecanismo proposto para as sínteses dos respectivos corróis está representado no esquema a seguir.

Esquema 7: Mecanismo proposto para síntese dos *meso-trans*-(pentafluorofenil)corróis.



Fonte: Próprio autor.



Capítulo 5 - Estudo fotofísico dos Porróis

5. PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E FOTOFÍSICAS

5.1. REVISÃO DA LITERATURA

5.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

De maneira geral, se um fóton possuir energia correspondente a variação de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, poderá haver uma transição eletrônica e elevar uma espécie do estado fundamental para seu estado excitado [34]. A absorvidade molar (ϵ) é uma propriedade de uma espécie que indica o quanto de radiação eletromagnética é capaz de ser absorvida por um mol daquela substância em um respectivo comprimento de onda [35], a qual varia entre 0 e $10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Transições eletrônicas com $\epsilon > 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ são absorções de maior intensidade, e quando o $\epsilon < 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, estas absorções serão menos intensas [34].

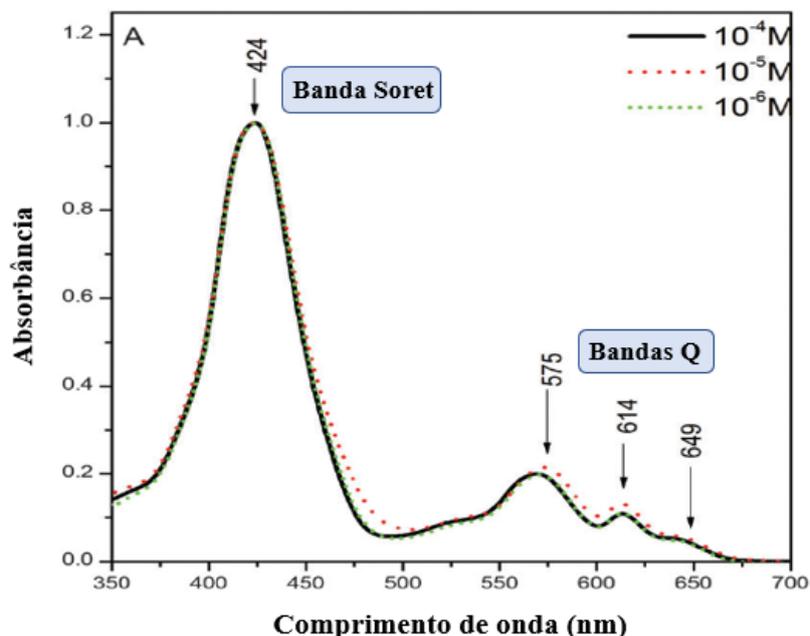
Os espectros de UV-Visível apresentam, em forma de bandas eletrônicas, estas transições, as quais podem ter suas absorvidades molares calculadas a partir da equação de Lambert-Beer (Equação 1), na qual “A” é a absorbância, “ ϵ ” é a absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), “b” é o caminho óptico (cm^{-1}) e “c”, a concentração (mol L^{-1}) da espécie química [34].

Equação 1: Equação de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon bc$$

Qualquer corrol, seja do tipo base-livre ou coordenado por íons metálicos, apresenta transições eletrônicas características no espectro de absorção eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível. Estas bandas podem ser explicadas pela Teoria dos Quatro Orbitais de Fronteira, proposta por Gouterman (1961) [36], uma vez que as transições se originam de elétrons π presentes tanto em porfirinas quanto em corróis.

Figura 4: Perfil característico de absorção eletrônica em UV-Vis de um corrol base-livre.



Fonte: Bursa, B., et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2016**, 18, 7216-7228

No espectro de absorção eletrônica de um corrol base-livre não-substituído, observa-se bandas eletrônicas de diferentes intensidades. Entre 500 a 700 nm, há um conjunto de transições eletrônicas conhecidas como bandas Q, e há outra entre 400 e 430 nm, a banda Soret (Figura 4) [37]. Baseado na teoria de Gouterman, elas correspondem a transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ entre os orbitais HOMO e HOMO - 1 e LUMO e LUMO + 1 da molécula [36].

5.1.2. Espectroscopia de fluorescência

Quando uma espécie é elevada ao seu estado excitado pela absorção de fótons, a tendência termodinâmica é de que essa espécie libere parte desta energia e retorne ao seu estado fundamental [35].

Entre os processos de dissipação de energia, observados no diagrama de Jablonski simplificado (Figura 5), o relaxamento vibracional ocorre primeiro através de colisões entre moléculas do solvente e da amostra, transferindo parte desta energia para o solvente, com conseqüente aumento da temperatura do

meio [34]. A dissipação também pode ocorrer por vibração intramolecular, conhecido como conversão interna e acontece entre os diferentes estados excitados da molécula [38].

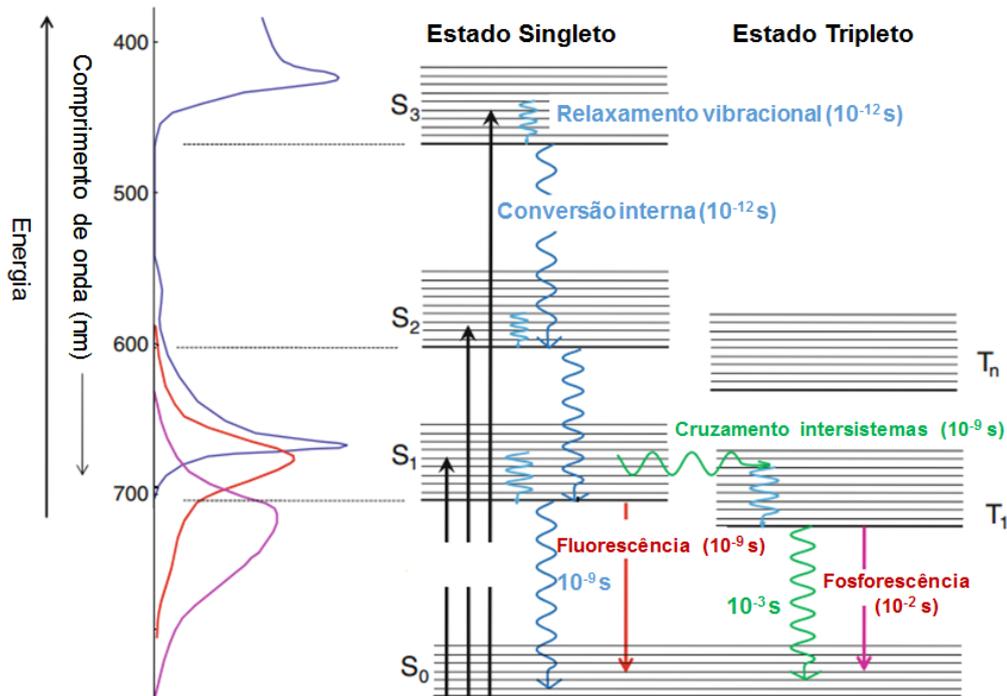
Se um elétron retornar diretamente do estado S_1 ao estado S_0 dos seus respectivos níveis energéticos, pode haver a emissão luminescente conhecido como fluorescência.

Porém, através de um cruzamento intersistemas, a espécie pode alcançar outro estado, no caso, o estado tripleto. Os estados singleto e tripleto referem-se à multiplicidade de *spin* dos elétrons [39].

No estado singleto, todos os elétrons estão emparelhados (*spin* $+1/2$ e *spin* $-1/2$) e a molécula, pela regra da multiplicidade de *spin* ($2S+1$), apresentará número quântico de *spin* igual a 1. Já no estado tripleto, os elétrons desemparelhados apresentam-se com mesmo *spin* ($+1/2$), e pela mesma regra, um momento quântico de *spin* igual a 3 é obtido [39, 40].

Para atingir o estado tripleto, os dois estados necessitam ter energias semelhantes e que possam sobrepor-se efetivamente. Isto pode ser alcançado por efeito de algum campo magnético presente. A presença de uma perturbação intramolecular conhecida como acoplamento *spin*-órbita pode causar a sobreposição destes estados [35].

Figura 5: Diagrama de Jablonski simplificado, destacando os processos de emissão e seus respectivos tempos pelos quais a energia pode ser dissipada.



Fonte: Abdel-Kader, M. H. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. Primeira Ed., 2014, 312.

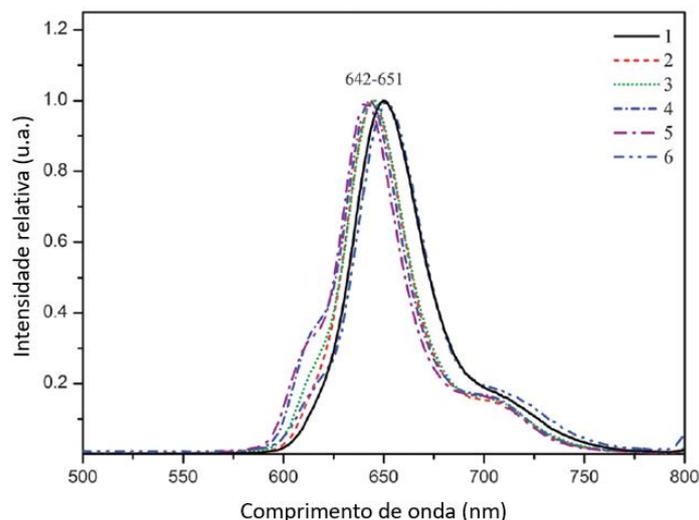
O acoplamento *spin*-órbita é um efeito relativístico que pode ser visualizado pela ação do campo magnético observado pelo elétron enquanto orbita ao redor de um núcleo carregado. Este campo magnético pode induzir a uma mistura dos estados singlete e tripleto com a consequente inversão do *spin* de um de seus elétrons desemparelhados, quando estiver no seu estado excitado. O acoplamento *spin*-órbita é mais pronunciado com a presença de átomos com alta densidade eletrônica, chamado de *efeito do átomo pesado*.

Após o cruzamento intersistemas, novos relaxamentos vibracionais acontecem e a transição entre $T_1 \rightarrow S_0$ ocorre com emissão fosforescente em tempos de vida mais longos que a fluorescência devido a inversão de *spin* necessária para retorno ao estado fundamental [38, 41].

Tratando-se de corróis, duas bandas de emissão são visualizadas na região do vermelho (600 – 800 nm) quando excitadas em qualquer uma de suas bandas de absorção eletrônica (Figura 6) [13]. Transições estas que podem corresponder aos diferentes tautômeros (T_1 e T_2) existentes para este tipo de

molécula [42], sendo a emissão entre 600 a 650 nm correspondente a transição entre níveis energéticos de $S_1 \rightarrow S_0$, e aquela entre 700 e 750 nm sendo da transição do nível energético S_1 para o nível vibracional de menor energia do S_0 . Porém, a emissão de T1 é cerca de trinta vezes mais intensa que de T2, sendo, desta forma, o espectro do tautômero predominante [42].

Figura 6: Exemplo dos perfis espectroscópicos de seis diferentes coróis.



Fonte: Bursa, B., et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2015**, 17, 7411-7423.

Se houver emissão fluorescente, a molécula pode ter seu rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) calculado. Este cálculo envolve a comparação com um padrão. Conhecendo-se parâmetros como rendimento quântico de fluorescência de uma amostra padrão (ϕ_p), a integral das áreas de fluorescência (I), a absorvância (A) relativa aos respectivos λ de excitação e o índice de refração dos solventes (n) utilizados, é possível calcular o rendimento quântico de fluorescência de uma espécie química [13]. Estes parâmetros são relacionados na Equação 2, no qual o subscrito “p” corresponde aos valores relativos a uma amostra padrão.

Equação 2: Rendimento quântico de fluorescência [13].

$$\Phi_F = \Phi_p \frac{I}{I_p} \frac{(1 - 10^{-A})_p}{(1 - 10^{-A})} \frac{\eta^2}{(\eta_p)^2}$$

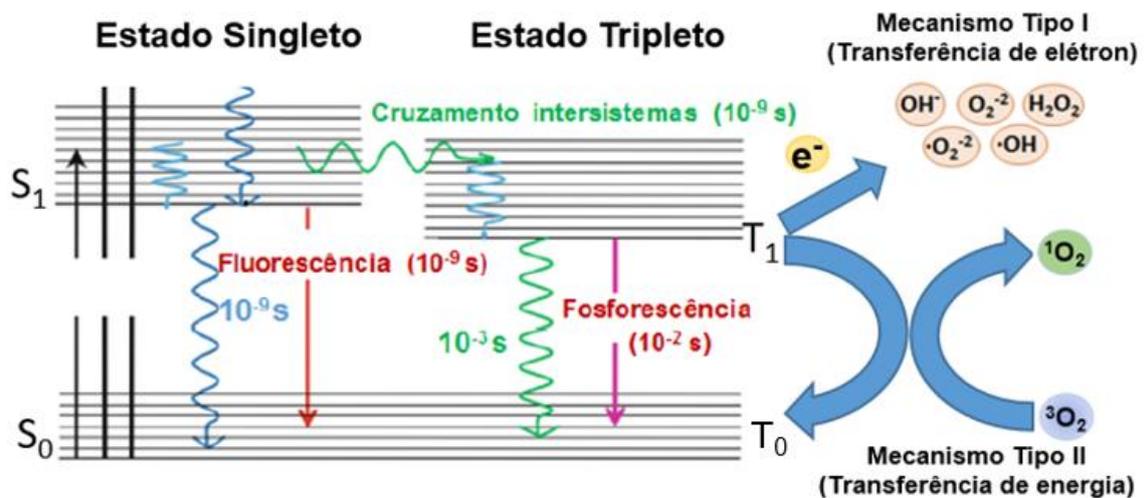
5.1.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

A presença de oxigênio no meio o qual a molécula alcançou o estado tripleto pode evidenciar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são altamente reativas sobre substratos biológicos. Classicamente, há dois mecanismos pelos quais as ERO podem ser geradas: mecanismo Tipo I e mecanismo Tipo II (Figura 7).

No mecanismo do tipo I, o fotossensibilizador (Fs) no estado tripleto, pode interagir diretamente com o substrato **RH** (molécula ou membrana) e uma transferência de elétron produzirá um substrato oxidado (**R•**) e um fotossensibilizador na forma reduzida (**FsH**). O substrato radicalar produzido pode, então, reagir com o oxigênio para formar espécies reativas de oxigênio. Neste mecanismo, podem ser geradas espécies como ânions peróxido (O_2^-) e hidroxil (OH^-), radicais superóxido ($\bullet O_2^-$) e hidroxil ($\bullet OH$), além de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [43, 44, 45].

O mecanismo do tipo II envolve a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular no estado tripleto e formação de oxigênio singlete (1O_2). O oxigênio molecular, então, é excitado do seu estado fundamental tripleto ($^3\Sigma_g^-$) para um dos seus dois estados singlete, $^1\Delta_g$ de energia 95 kJ mol^{-1} e $^1\Sigma_g^+$ de energia 158 kJ mol^{-1} , sendo o primeiro mais estável (maior tempo de vida) pois necessita de inversão de *spin* para retornar ao estado tripleto [45, 46, 47].

Figura 7: Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio.

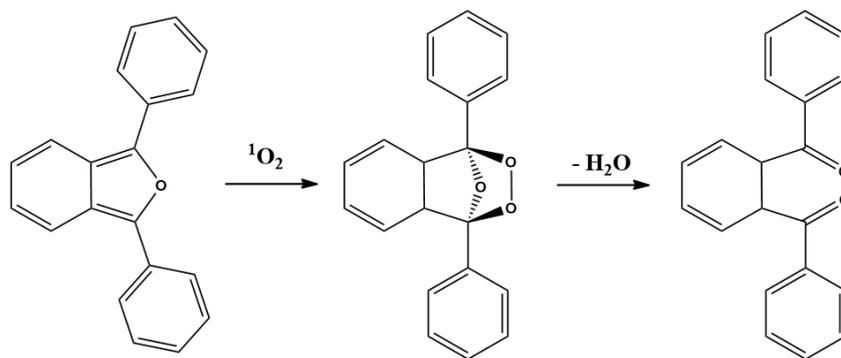


Fonte: Adaptado de Abdel-Kader, M. H. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. Primeira Ed., 2014, 312.

Espécies, como o oxigênio singlete, podem ser determinadas de diferentes formas:

Determinação direta: mede-se a luminescência do ¹O₂ gerado em, aproximadamente, 1270 nm, referente à transição eletrônica do estado ¹Δ_g → ³Σ_g⁻ entre os níveis vibracionais menos energéticos de cada estado [48, 49].

Determinação indireta via DPBF: avalia-se a foto-oxidação de um substrato presente no meio, servindo como sequestrador da própria espécie reativa [48]. O 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) é a molécula mais utilizada para este fim. A reação com o oxigênio singlete gera a 1,2-dibenzilbenzina (Esquema 8). O monitoramento desta foto-oxidação pode ser realizado por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis, pois o DPBF apresenta uma transição em 418 nm e, ao ser oxidado, esta banda sofre uma supressão de intensidade (hipocromismo) e uma nova transição, em 700 nm, geralmente é observada. Nesta metodologia, o φ_Δ pode ser medido através da Equação 3.

Esquema 8: Representação da reação entre DPBF e $^1\text{O}_2$.

Fonte: Adaptado de Pradeepa, S. M., et al. *Inorganica Chimica Acta*, **2015**, 428, 138-146.

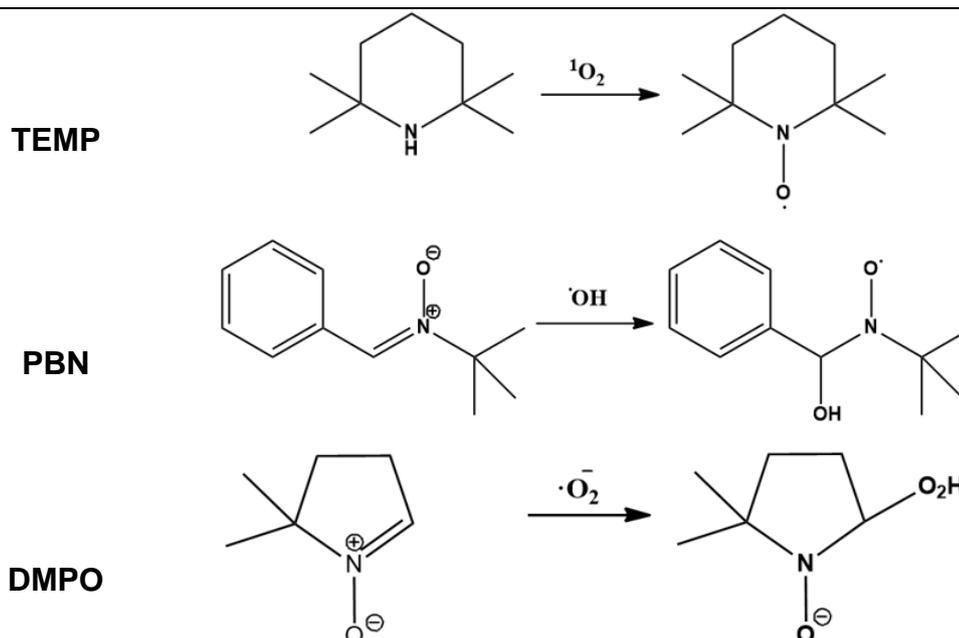
Equação 3: Rendimento quântico de oxigênio singlete [48].

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta p} \frac{k}{k_p} \frac{(1 - 10^{-A})_p}{(1 - 10^{-A})} \frac{\eta}{\eta_p}$$

Na qual “ k ” é a constante cinética de foto-oxidação ($\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$), “ A ” é a absorvância mínima no comprimento de onda estudado e “ η ” é o índice de refração do solvente utilizado. O subscrito “ p ” corresponde a valores relativos a uma molécula utilizada como amostra padrão.

Determinação indireta via EPR: de maneira simplificada, a ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês *Electronic Paramagnetic Resonance*) tem a capacidade de detectar elétrons desemparelhados de espécies químicas, como é o caso do $^1\text{O}_2$ e das espécies radiculares. Desta forma, pelo fato de as espécies reativas de oxigênio apresentarem um tempo de vida muito curto (10^{-12} s) [50], opta-se por sequestradores de *spin* (*spin traps*), cujos formam adutos (adutos de *spin*) detectáveis por serem mais estáveis [51]. O *spin-trap* utilizado para o oxigênio singlete é o TEMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina), o qual transforma-se em TEMPO (N-óxido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) ao formar-se o aduto de *spin*. O EPR também é particularmente útil quando se trata de determinar espécies produzidas pelo mecanismo tipo I. Desta forma, para a formação do aduto de *spin* utiliza-se como *spin trap* moléculas como o α -fenil-N-terc-butil-nitrona (PBN) e o N-óxido de 5,5-dimetilpirrolina (DMPO), sensíveis para o radical hidroxila e o ânion superóxido, respectivamente (Esquema 9).

Esquema 9: *Spin traps* TEMP, PBN e DMPO reagindo com $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{O}_2^-$, respectivamente.



Fonte: Janzen, E. G. & Blackburn, B.J. *Journal of the American Chemical Society*, 1968, 90, 5909-5910.

A quantificação destas espécies pode ser realizada mediante utilização de soluções de concentrações conhecidas dos adutos de *spin* a serem determinados, as quais também são analisadas por EPR sob mesmas condições das amostras e comparadas entre si após o ensaio [52].

5.1.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})

O rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD}) é um parâmetro fotofísico importante porque em função dele pode-se afirmar se a molécula mantém suas propriedades físicas e químicas após a excitação por radiação eletromagnética. Neste ponto de vista, espécies fotoestáveis podem permanecer mais tempo sob irradiação sem se degradarem e, conseqüentemente, mantêm suas características fotofísicas por mais tempo [53].

Clinicamente, moléculas deste tipo são mais utilizadas em terapia fotodinâmica, porém é preciso ter cuidado ao escolher uma espécie como fármaco pois uma elevada estabilidade pode levar a dificuldade de eliminação

pelo organismo. Desta forma, uma molécula que seja suficientemente fotoestável e passível de ser eliminada pelo organismo sem efeitos indesejáveis ainda é um desafio para aplicações medicinais [54, 55].

O ensaio de fotodegradação é realizado por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis e envolve a irradiação do fotossensibilizador por radiação eletromagnética e observa-se mudanças espectroscópicas durante o ensaio. Acredita-se que os principais causadores da fotodegradação sejam as espécies reativas de oxigênio geradas pelo próprio fotossensibilizador [53].

Existem algumas maneiras pelas quais o rendimento quântico de fotodegradação pode ser determinado. Uma das mais simples (Equação 4) consiste em conhecer a quantidade de moléculas fotodegradadas no ensaio de fotodegradação e o número de fótons que foram absorvidos ao fim do procedimento [56]. O número de fótons absorvido é calculado na equação de Einstein, no qual calcula a energia de um fóton em um respectivo comprimento de onda e a energia fornecida pela fonte de luz utilizada no experimento.

Equação 4: Rendimento quântico de fotodegradação.

$$\Phi_{FD} = \frac{\text{moléculas fotodegradadas}}{\text{fótons absorvidos}}$$

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos em grau analítico de maneira comercial, sem purificação prévia.

5.2.1. Absortividade molar e teste de agregação

As análises para absortividade molar (ϵ) e teste de agregação foram realizados utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV2600 e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico utilizando dois solventes: diclorometano (CH_2Cl_2) e dimetilsulfóxido (DMSO).

Absortividade molar (ϵ): adicionou-se 10,00 μL do respectivo corrol à 2,00 mL de solvente para se obter o primeiro espectro. Os cálculos das absortividades molares foram realizados após uma média de dez espectros. Avaliou-se,

também, o efeito do solvente nas transições eletrônicas. Para isto, foram escolhidos o DCM e o DMSO. O momento de dipolo (μ) e constante dielétrica (ϵ_r) do DCM são $\mu = 1,80$ e $\epsilon_r = 9,10$. Já para o DMSO são $\mu = 3,96$ e $\epsilon_r = 46,6$ [57]. O ϵ foi obtido utilizando-se a Equação 1.

Teste de agregação: adicionou-se 5,00 μL da solução estoque do respectivo corrol à 2,00 mL de solvente para obter o primeiro espectro. Para os próximos espectros, novas alíquotas de 5,00 μL foram adicionadas à solução presente na cubeta. A adição do corrol repetiu-se até totalizar 20 espectros. Ensaios desenvolvidos em diferentes solventes (CH_2Cl_2 e DMSO) foram realizados para avaliar suas possíveis influências nos espectros de absorção eletrônica

5.2.2. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ) via decomposição do DPBF

Esta metodologia foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV2600 e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. Para determinação de rendimento quântico utilizou-se o 5,10,15-tri(fenil)corrol (**H₃Ph₃Cor**) como comparativo.

Foi realizada a metodologia indireta, utilizando uma solução estoque de DPBF ($3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em DMSO. Devido os corrols apresentarem transição eletrônica na mesma região da transição eletrônica do DPBF (418 nm), calibrou-se o primeiro espectro com a presença do corrol. Desta forma, na calibração foram utilizados 2,00 mL de DMSO mais 50,00 μL do respectivo corrol ($4,02 \times 10^{-4}$ para o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** e $4,72 \times 10^{-4}$ para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**). Adicionou-se, então, 50,00 μL da solução estoque de DPBF à cubeta para obter o primeiro espectro na ausência de irradiação. Em seguida, irradiou-se a solução na cubeta com luz monocromática (100 mW) no vermelho (660 nm) por dez segundos e obteve-se o próximo espectro. Sob condição de irradiação, foram obtidos dez espectros de UV-visível, compreendendo um total de 100 segundos de irradiação (10 segundos por espectro). O mesmo procedimento foi realizado com o **H₃Ph₃Cor** para avaliar o efeito dos átomos de flúor no resultado. O ϕ_Δ foi calculado usando a Equação 3, utilizando como padrão a ftalocianina de zinco, **ZnPc** ($\phi_\Delta = 0,67$, em DMSO, $k = 0,0506 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e "A" = 0,010) [58].

5.2.3. Geração de espécies reativas de oxigênio via EPR.

As medidas de EPR foram realizadas em Spectrometro Miniscope MS 400 de acordo com os parâmetros: frequência de micro-ondas de 9,40 GHz, energia da micro-onda de 10 Mw, amplitude da modulação de campo de 0,2 mT (miliTesla), e de campo central de 337 mT, tempo de escaneamento de 60 segundos. Para os experimentos de captura de *spin*, soluções estoque de DMSO contendo diferentes *spin traps* (TEMP, PBN ou DMPO) e na presença de um dos corróis (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** ou **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**) foram iluminadas por uma luz branca de lâmpada de LED ou uma luz vermelha filtrada desta luz branca. A radiação integrada medida sob condições experimentais para luz branca e vermelha foram 16 mW cm⁻² e 4,0 mW cm⁻², respectivamente, e foram calibradas com um medidor de potência Lasermate/D. Após diferentes tempos de iluminação, alíquotas de 50 µL da solução foram inseridas em capilares e determinadas por EPR dentro de um tubo de quartzo.

Para a captura de oxigênio singlete, utilizou-se o sequestrador TEMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidino) em concentração de 1,0 mol L⁻¹ em DMSO, juntamente com os respectivos corróis em concentrações de 57 µmol L⁻¹. Para o sequestro de espécies radiculares, usou-se PNB (N-terc-butil- α -fenilnitrona) para o radical hidroxila (\bullet OH) e o DMPO (óxido de N-5,5-dimetil-1-pirrolina) para o radical superóxido (\bullet O₂⁻) em concentrações de 0,1 mol L⁻¹ e 0,3 mol L⁻¹, respectivamente

5.2.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})

Esta metodologia foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV2600 e cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. Para determinação do rendimento quântico utilizou-se o 5,10,15-tri(fenil)corrol (**H₃Ph₃Cor**) como comparativo.

Adicionou-se 50,00 µL do corrol correspondente à 2,00 mL de DMSO e obteve-se o primeiro espectro. Em seguida, irradiou-se a solução na cubeta com luz branca (fluxo luminoso de 25 mW cm⁻²) por cinco minutos, obtendo-se, em seguida, o próximo espectro, e assim por diante. No total, irradiou-se a amostra por 60 minutos. O H₃Ph₃Cor também foi utilizado como padrão e analisado para avaliar a influência dos átomos de flúor na estabilidade do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e

H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor. A Equação 4 foi utilizada para determinar o rendimento quântico de fotodegradação. Além disso, utilizou-se a equação de energia proposta por Einstein ($E = \hbar c/\lambda$) para determinar a energia de um fóton em 426 nm (banda Soret). As constantes cinéticas de fotodegradação (k_{FD}) foram determinadas pelo plot de $\ln(A_0/A)$ (eixo Y) por tempo (eixo X), no qual o k_{FD} corresponde ao coeficiente angular da reta.

5.2.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

Os espectros de emissão para determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F), foram obtidos em espectrofotômetro Cary50 Eclipse Fluorescence com cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e abertura de fenda (slit) de 5,0 mm (emissão/excitação). Para estas análises, utilizou-se as soluções de **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** em DMSO e CH₂Cl₂.

Adicionou-se 10,00 μ L da solução estoque do respectivo corrol à 2,00 mL de solvente para obter o espectro de emissão ($\lambda_{excitação}$ = banda Soret) na faixa de 600 a 800 nm. O efeito sobre o rendimento quântico de fluorescência causado por solventes com constantes dielétricas e momentos de dipolo diferentes foi avaliado, sendo os solventes: CH₂Cl₂ ($\mu = 1,80$ e $\epsilon_r = 9,10$) e o DMSO ($\mu = 3,96$ e $\epsilon_r = 46,6$) [106]. O ϕ_F foi calculado com base na Equação 2, tendo como padrão o **H₃Ph₃Cor** ($\phi_F = 0,16$ em diclorometano ($\eta = 1,424$) e “I” = 5479,1999 e “A_{416 nm}” = 0,3752) [59].

5.2.6. Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram registrados em um sistema EcoChemie AutoLab PGSTAT 32N em temperatura ambiente em atmosfera de argônio em solução de diclorometano seco. Foi utilizado como eletrólito auxiliar o hexafluorofosfato de tetrabutílamônio (TBAPF₆) em concentração 0,1 mol L⁻¹. Estes experimentos de voltametria cíclica foram realizados empregando um sistema de três componentes padrão: um eletrodo de trabalho de platina, um eletrodo de fio de platina auxiliar e um eletrodo de *pseudo*-referência de fio de platina. Para monitorar o eletrodo de referência, o par redox Fc⁺/Fc

(ferroceno/íon ferrocenium) foi utilizado como uma referência interna ($E_{1/2} = 0,4$ V).

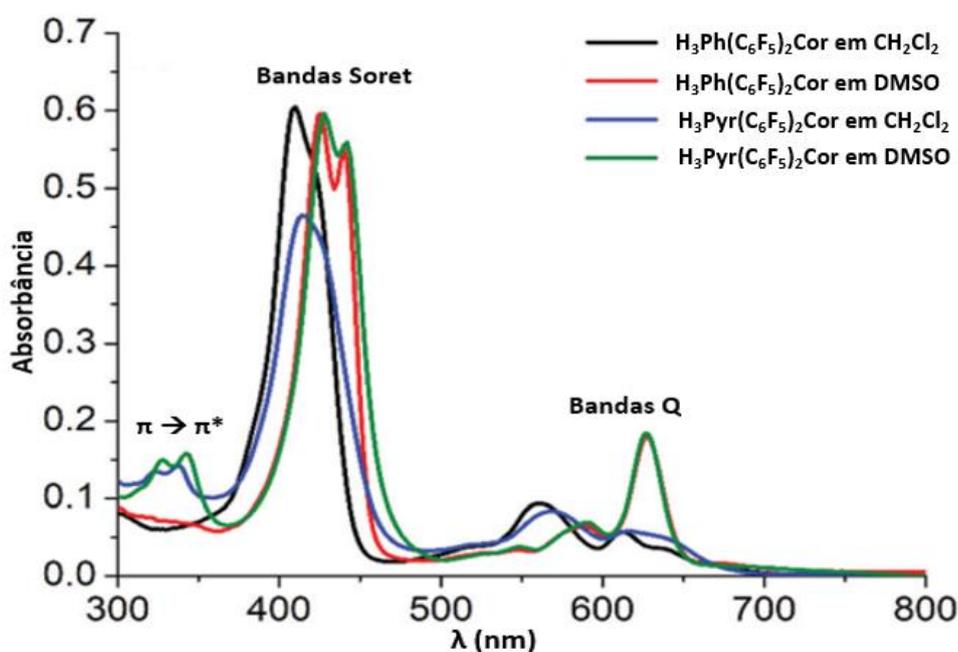
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

5.3.1.1. Absortividade molar (ϵ)

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis dos corróis sintetizados nos solventes escolhidos. Foi possível observar as transições eletrônicas referentes ao anel macrocíclico, entre 400 e 430 nm (banda Soret), confirmadas pelas absortividades molares acima de 10^5 L mol⁻¹ cm⁻¹. Entre 500 – 700 nm encontram-se as bandas Q. Estas transições confirmam a formação dos corróis. Também se nota no espectro do **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ proveniente do substituinte pirenil, próximos a 320 nm.

Figura 8: Espectros de UV-visível do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, em CH₂Cl₂ e DMSO.



A presença de solventes com propriedades diferentes causa mudanças tanto na posição das transições eletrônicas quanto em suas formas. Estas mudanças têm origem na estabilização que eles proporcionam à molécula. Tendo em vista que o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ apresentam ligações polarizadas (C-F e N-H), elas causam um certo tipo de polarização tanto em suas ligações quanto na molécula em si. Solventes polares podem interagir com a espécie química e estabilizá-las, principalmente, por meio de interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio ou do tipo dipolo-dipolo [34].

Sendo assim, o DMSO, por ser um solvente polar ($\mu = 3,96$), pode estar estabilizando através de uma destas situações, ocasionando uma diminuição da energia entre os orbitais HOMO e LUMO dos corróis e, conseqüentemente, deslocando as bandas eletrônicas do espectro para a região do vermelho (deslocamento batocrômico).

A aparência das bandas no DMSO também se destaca em comparação com as bandas nos demais solventes. Na região da banda Soret ocorrem duas transições eletrônicas e na região das bandas Q, a última transição apresenta maior absorbância que o comum em outros solventes. As principais explicações para isto estão na quantidade de tautômeros T1 e T2 em solução, a possibilidade de desprotonação dos nitrogênios pirrólicos ou ligações de hidrogênio entre corróis e solvente [37].

Os corróis, como já citado, apresentam-se principalmente em duas formas tautoméricas principais e, dependendo do tipo de solvente utilizado, a presença delas no espectro de absorção eletrônica torna-se mais pronunciado. Por mais que os tautômeros T1 e T2 sejam quase idênticos estruturalmente, as energias dos orbitais moleculares são levemente distintas entre si, sendo a forma T2 a mais energética e a forma T1, a menos energética. A mesma percepção ocorre com as bandas Q [42].

A desprotonação dos corróis é outro fator de relevância pois a menor cavidade interna dos corróis comparado ao das porfirinas induz a um direcionamento da ligação N-H para fora da cavidade. Desta forma, o corrol torna-se menos planar e faz com que os nitrogênios fiquem mais suscetíveis a desprotonação, efeito este que é potencializado pela presença de solventes altamente polares e que realizam ligações de hidrogênio [60].

A redução da planaridade do anel corróico também pode facilitar interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio com solventes polares, pois com os hidrogênios dispostos para fora da cavidade a aproximação e estabilização por algum solvente polar tende a acontecer. Estas interações não necessariamente ocasionarão a desprotonação do nitrogênio pirróico [108].

Para finalizar, a Tabela 1 compila os parâmetros espectroscópicos do corróis frente aos solventes utilizados.

Tabela 1: Parâmetros espectroscópicos dos corróis, relacionando as transições eletrônicas (λ (nm); ϵ (L mol⁻¹ cm⁻¹)) em diferentes solventes.

H₃Ph(C₆F₅)₂Cor						
Solvente	μ	ϵ_r	Transições eletrônicas (λ (nm); ϵ (L mol⁻¹ cm⁻¹))			
			$\pi \rightarrow \pi^*$	Banda Soret	Bandas Q	
CH ₂ Cl ₂	1,80	9,10	-----	410; 1,81 x 10 ⁵	560; 2,8 x 10 ⁴ 612; 1,8 x 10 ⁴	
DMSO	3,96	46,60	-----	426; 1,35 x 10 ⁵ 440; 1,26 x 10 ⁵	588; 1,5 x 10 ⁴ 628; 4,1 x 10 ⁴	
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor						
CH ₂ Cl ₂	1,80	9,10	324; 1,3 x 10 ⁴ 338; 1,4 x 10 ⁴	414; 4,7 x 10 ⁴	568; 8,0 x 10 ³ 616; 6,0 x 10 ³	
DMSO	3,96	46,60	328; 1,9 x 10 ⁴ 342; 2,1 x 10 ⁴	428; 7,8 x 10 ⁴ 442; 7,4 x 10 ⁴	590; 9,0 x 10 ³ 626; 2,3 x 10 ⁴	

5.3.1.2. Teste de agregação

Os ensaios de agregação visaram determinar quais as concentrações máximas que os corróis podem alcançar antes de começarem a agregar em solução. Moléculas que agregam em solução tendem a absorver menos radiação eletromagnética em um ensaio em espectroscopia de absorção eletrônica.

Tecnicamente, há duas maneiras principais pelas quais pode ocorrer uma agregação. A primeira ocorre quando as moléculas se dispõem de forma empilhada umas sobre as outras, literalmente (agregados H), e a outra quando

elas agregam de forma em que uma extremidade de uma molécula tende a agregar-se com a extremidade da molécula vizinha (agregados J). O modo prioritário de agregação vai depender do tipo de molécula, pois a principal interação intermolecular que ocorre é a força de van der Waals [61].

No entanto, é possível diferenciá-los no espectro de absorção eletrônica, uma vez que a formação de agregados H causam um deslocamento batocrômico (maiores comprimentos de onda) no espectro de absorção eletrônica, e os agregados J, um deslocamento hipsocrômico (menores comprimentos de onda) [62]. O teste foi realizado em CH_2Cl_2 . A Figura 9 apresenta os ensaios realizados nos dois solventes. A banda de absorção eletrônica sondada para este procedimento foi a banda Soret.

Foi possível observar que houve uma certa linearidade nos testes de agregação até uma concentração de $2,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Entretanto, o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** dissolvido em CH_2Cl_2 apresentou um pequeno desvio a partir de $1,71 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Não se constatou variação de linearidade acentuada em relação ao **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**.

Apesar das variações observadas em ensaios envolvendo o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, pode-se afirmar que este corrol não agrega em solução nas concentrações estudadas porque sua variação no comprimento de onda da banda Soret variou somente 2,0 nm desde seu primeiro espectro.

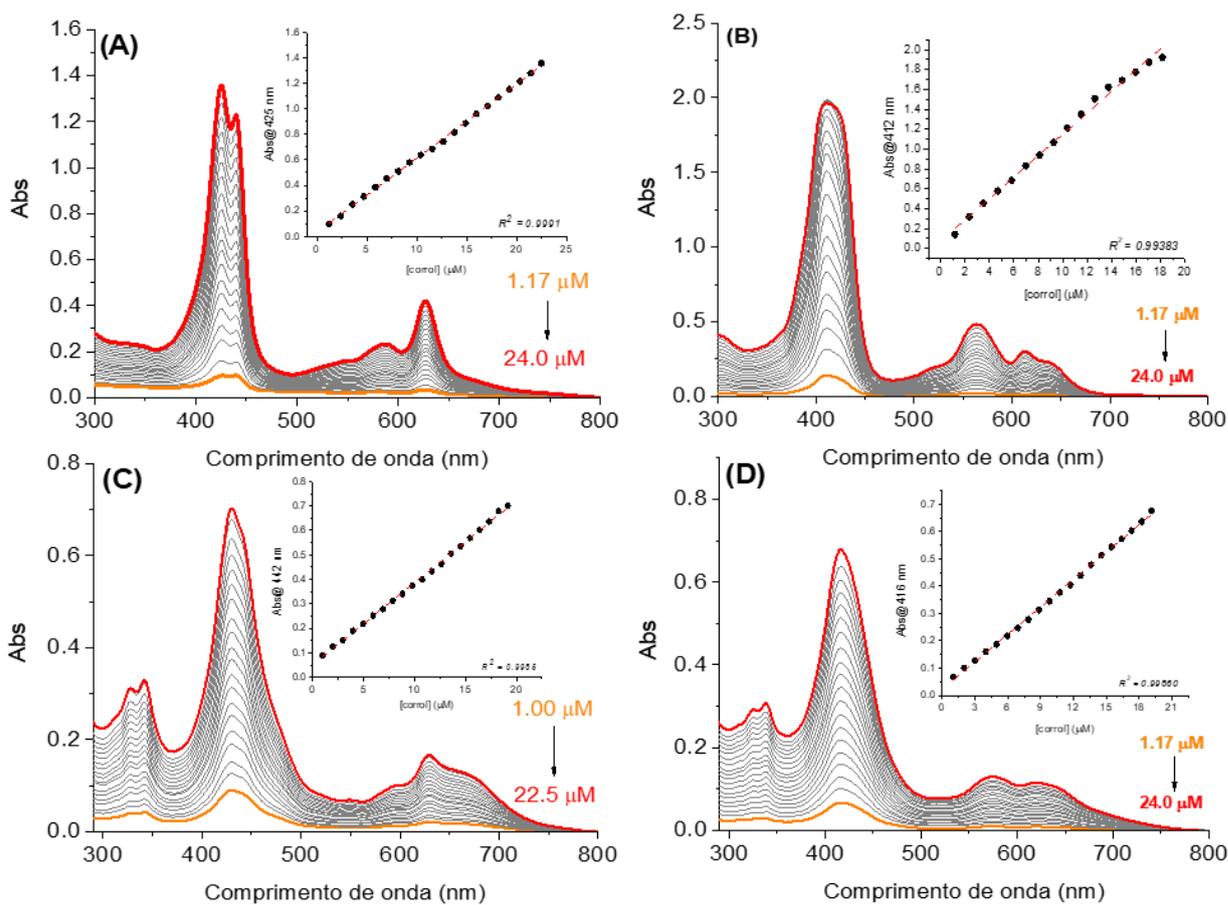
A mudança de substituinte entre os corróis também pode ter influenciado a linearidade dos resultados. Partindo da premissa de que solventes estabilizam as moléculas em solução a partir de uma solvatação [37], a solução com menor constante dielétrica utilizado – CH_2Cl_2 ($\epsilon_r = 9,10$) solvata o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** de modo menos eficiente porque a presença de dez átomos de flúor na estrutura torna a molécula em si mais polarizada. O mesmo efeito não é observado quando se trata do **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** já que a presença de um substituinte mais apolar (pirenil) atenua o efeito causado pelos átomos de flúor, sendo assim, melhor solvatado pelos solventes utilizados e evitando uma possível agregação.

Por fim, a Tabela 2 apresenta os coeficientes de determinação (R^2) nos respectivos solventes, além da máxima concentração (mol L^{-1}) observada antes de haver desvio quanto a linearidade. Utilizou-se a transição correspondente a banda Soret para calcular as concentrações máxima.

Tabela 2: Coeficiente de correlação (R^2) e concentração (mol L^{-1}) dos corróis em diferentes solventes.

		CH_2Cl_2	DMSO
$\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	R^2	0,9599	0,9991
	Concentração Limite	$1,71 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$
$\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	R^2	0,9986	0,9985
	Concentração Limite	$2,25 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$

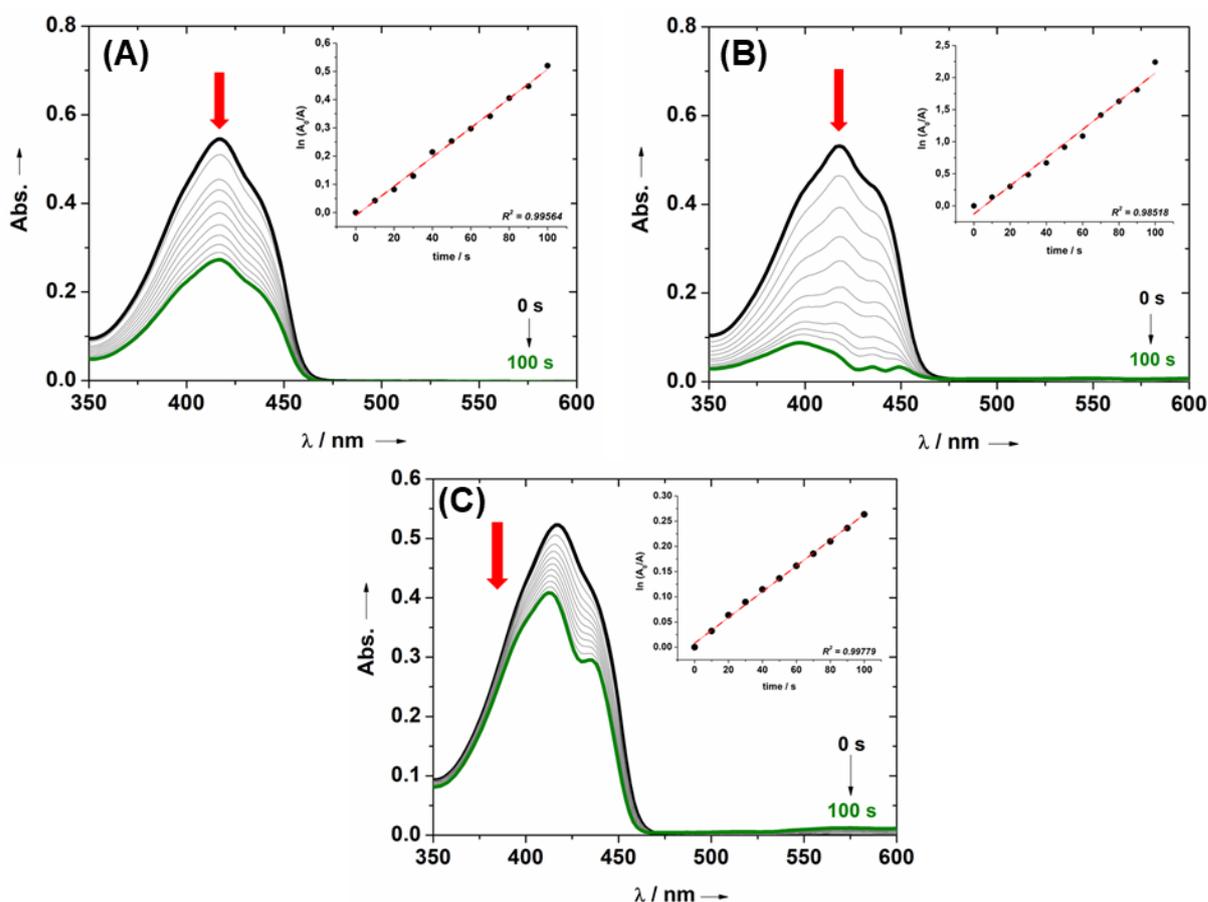
Figura 9: Ensaio de agregação dos corróis em diferentes solventes (DMSO e DCM), sendo (A) e (B) $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e, (C) e (D), $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$. Ensaio em DMSO são em A e C, e DCM são em B e D.



5.3.2. Rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) via fotodegradação do DPBF

Conforme citado no início deste capítulo, a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete partiu da oxidação do DPBF, em 418 nm. A Figura 10 apresenta os perfis espectroscópicos da espécie sequestradora de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na presença dos respectivos fotosensibilizadores sob irradiação de luz monocromática vermelha (660 nm) por 100 segundos, além do **H₃Ph₃Cor** usado como comparativo. A escolha pela ftalocianina de zinco(II) (ZnPc) como padrão foi justamente por apresentar uma estrutura eletrônica similar aos dos coróis sintetizados [108]. Sendo assim, a Tabela 3 apresenta os parâmetros fotofísicos utilizados para determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete das moléculas.

Figura 10: Espectros de absorção eletrônica do DPBF em DMSO, na presença dos coróis, sob irradiação com luz vermelha (660 nm), sendo (A) **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, (B) **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** e (C) **H₃Ph₃Cor**.



Como pode ser observado nos espectros de absorção eletrônica, tanto os corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** quanto o **H₃Ph₃Cor** produziram oxigênio singleto. Em comparação com o **H₃Ph₃Cor**, a presença dos átomos de flúor nos corróis aqui estudados provavelmente estabiliza e potencializa o cruzamento intersistemas por meio do acoplamento *spin*-órbita, uma vez que são grupos com alta densidade eletrônica. Relacionando os rendimentos quânticos das espécies analisadas, notou-se que o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** mostra-se mais eficiente na geração da espécie reativa de oxigênio que o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, e 2,56 vezes em relação ao **H₃Ph₃Cor**.

Tabela 3: Parâmetros fotofísicos para determinação do rendimento quântico de ¹O₂.

Molécula	k (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	(1-10 ^{-A})	η (DMSO)	R ²	ϕ_{Δ}
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor	0,3220	0,604	1,479	0,9977	0,32
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor	0,4877	0,461	1,479	0,9956	0,41
H₃Ph₃Cor	0,1729	0,122	1,479	0,9852	0,16
ZnPc (padrão)	0,0506	0,023	1,479	—	0,67

k : Constante cinética de supressão bimolecular; A: Absorbância; η : Índice de refração; R²: Coeficiente de correlação; ϕ_{Δ} : Rendimento quântico de ¹O₂.

Comparando-se os rendimentos quânticos de ¹O₂ do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, a única diferença estrutural entre elas é a presença dos substituintes pirenil e fenil, os quais modificam o resultado. Por ser um grupo mais conjugado e com mais orbitais moleculares do que o fenil, o substituinte pirenil pode estar dissipando com maior frequência a energia absorvida para o sentido S₁ → S₀ em vez de S₁ → T₁. O mesmo efeito não deve ocorrer com tanta constância para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** por apresentar um substituinte menor.

Entretanto, em relação à ftalocianina de zinco(II), os dois corróis apresentaram rendimentos quânticos abaixo do padrão. A ftalocianina de zinco(II) apresenta um íon metálico de alta densidade eletrônica (Zn^{II}, d¹⁰) coordenado na cavidade da ftalocianina. A presença do Zn^{II} eleva o rendimento quântico de ¹O₂ devido, principalmente, a alguns fatores: (i) o Zn^{II} apresenta

elevada densidade eletrônica, o que potencializa o efeito do cruzamento intersistemas [63, 64] e (ii) a coordenação por centros metálicos aumenta a planaridade e a rigidez do anel macrocíclico, permitindo que a molécula produza mais espécies de $^1\text{O}_2$. Desta forma, o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ da ZnPc apresenta-se maior do que o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e ao $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$.

Contudo, o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e o $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, em comparação com outros corróis da literatura, apresentam rendimentos quânticos satisfatórios (Tabela 4).

Tabela 4: Comparativo entre rendimentos quânticos de $^1\text{O}_2$ do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ com corróis da literatura.

Molécula	ϕ_Δ
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	0,32
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	0,41
Ftalocianina de zinco(II) – (ZnPc) ^a	0,67
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(4-metil-bipiridil)corrol ^a	0,47
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)-(piridil)gálio(III)corrol ^b	0,57

^a ref. [107], ^b ref. [65].

5.3.3. Geração de espécies reativas de oxigênio via EPR

A geração de espécies reativas de oxigênio é uma importante etapa para saber se os derivados tetrapirrólicos, como porfirinas e corróis, podem ser utilizados como fotosensibilizadores em, por exemplo, terapia fotodinâmica e fotoinativação de micro-organismos.

Para a primeira etapa, o TEMP, cujo é um *spin trap* específico para oxigênio singleto, foi usado em estudos de EPR. O espectro de EPR dos adutos de *spin* (Figura 11), ou seja, dos radicais TEMPOL, apresentam um típico espectro linear tripleto, o qual é causado por transições eletrônicas de *spin* envolvendo interações hiperfinas com o núcleo do ^{14}N . A dupla integração do espectro de EPR permite a quantificação dos adutos após a calibração deles com solução de TEMPOL e DMSO de soluções conhecidas de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Das curvas de quantificação dos adutos de *spin* (Figura 12) devido a captura do $^1\text{O}_2$ pelo TEMP, todas as curvas são descritas pela cinética de primeira-ordem e ambos os fotosensibilizadores mostram eficiências similares sobre iluminações com luz branca e vermelha, corroborando os resultados obtidos pela foto-oxidação do DPBF. Além disso, quando a iluminação é realizada somente sobre as bandas Q (luz vermelha), a concentração do aduto de *spin* total é, aproximadamente, 50 e 75%, das concentrações dos coróis quando comparados com irradiações feitas com luz branca, comprovando que quanto mais se absorve luz, mais oxigênio singlete é produzido.

Figura 11: Espectros de EPR do TEMPOL em função da iluminação do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$. Cada cor corresponde a uma medida de EPR, sendo o tempo zero a ausência de irradiação.

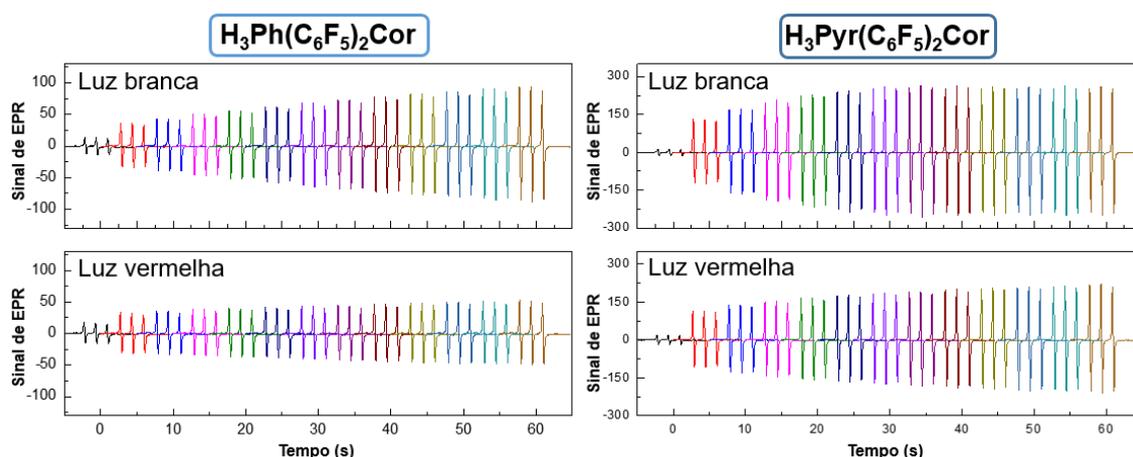
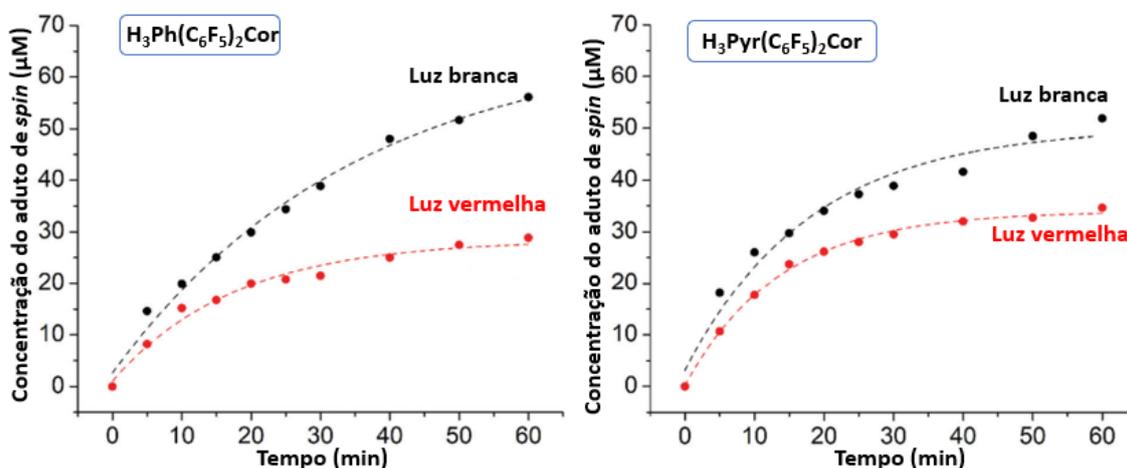


Figura 12: Concentração dos adutos de *spin* de TEMP em função da irradiação branca e vermelha.

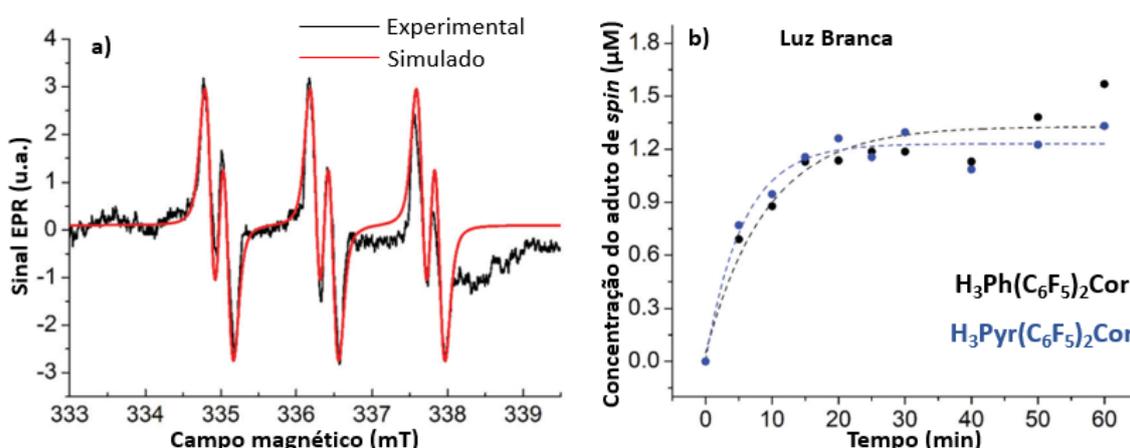


Com o objetivo de estudar se as outras espécies reativas de oxigênio são formadas, o *spin trap* PBN foi utilizado. Para exemplificar, na Figura 13a são apresentados dois espectros de EPR: em preto, o espectro experimental dos aduto de *spin* de PBN após a irradiação com luz branca da solução de **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** e, em vermelho, o espectro simulado com o *software* Easyspin®. Por estes espectros, é possível afirmar que o aduto de *spin* de PBN é formado com o radical metila (PBN* / •CH₃), proveniente da geração de radical hidroxila pelo corrol. O espectro deste aduto é caracterizado pelo espectro de linha tripleto resultante da interação hiperfina com o ¹⁴N, o qual é posteriormente dividida em dubletos para interação hiperfina com o ¹H na posição *beta* do corrol. O radical metila em DMSO é produzido de radicais hidroxila, de acordo com o esquema a seguir:

Esquema 10: Formação do radical metila a partir do DMSO e radical hidroxila.



Figura 13: a) Espectro do aduto de *spin* de PBN experimental e simulado após irradiação com luz branca. b) Comparação entre concentrações de adutos de *spin* para os corróis.



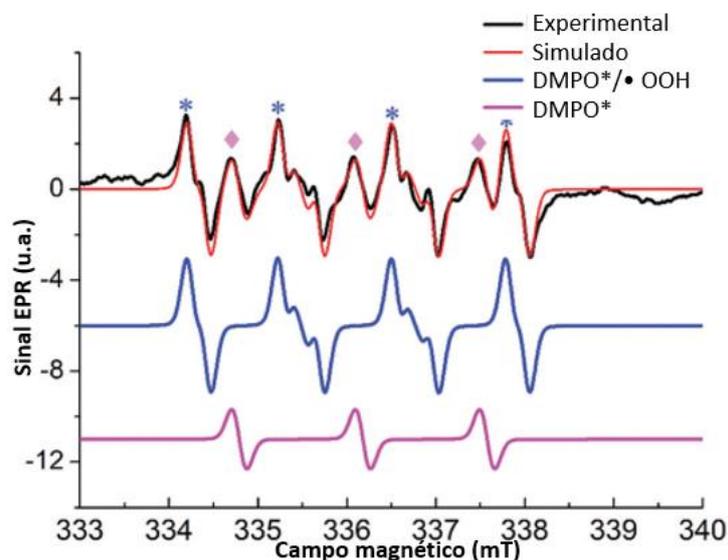
Na mesma figura (Figura 13b), também é realizado um comparativo entre as concentrações dos adutos de *spin* formados para os dois corróis sintetizados após irradiação com luz branca. Comparando as Figura 12 e Figura 13, notou-

se que a concentração de radicais hidroxila é, aproximadamente, 60 vezes menor que a geração de oxigênio singleto. Geralmente, este é o cenário para fotosensibilizadores porfirínicos, os quais tem a geração de oxigênio singleto como o mecanismo principal de geração de espécies reativas de oxigênio [45].

Para entender se a formação do radical hidroxila é formado pelo mecanismo tipo I ou, indiretamente, através da protonação do oxigênio singleto (mecanismo tipo II), experimentos com PBN (sequestrador de radical hidroxila) foram repetidos, agora na presença de iodeto de potássio (KI, 1,0 mol L⁻¹), conhecido como sequestrador de ¹O₂ [66]. Nestas condições, o aduto de *spin* do PBN com radical metila não foi formado, indicando que o oxigênio singleto é responsável pela formação do radical hidroxila, ou seja, ele é formado indiretamente através do mecanismo tipo II.

A formação do radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) durante a irradiação com luz branca foi identificada utilizando o *spin trap* DMPO em solução de **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** (0,3 mol L⁻¹), em DMSO. Dois diferentes adutos de *spin* de DMPO foram identificados após irradiação com luz branca: (a) DMPO* / $\bullet\text{OOH}$ e (b) DMPO*. Estes adutos foram identificados por simulações espectrais utilizando o *software* Easyspin[®]. O espectro do primeiro aduto é caracterizado pela interação do *spin* eletrônico $S = \frac{1}{2}$ com ¹⁴N e mais dois átomos de hidrogênio (linha azul na Figura 14) [67]. O segundo aduto (DMPO*) é representado por um tripleto. Este último é típico para interação do DMPO com ¹O₂. A repetição deste procedimento com o iodeto de potássio não apresentou alterações no espectro EPR (espectro azul), indicando que o radical superóxido é formado pelo mecanismo tipo II através de uma transferência de energia durante o cruzamento intersistemas, sendo coerente com o estudo de Wang e colaboradores [68].

Figura 14: Espectro de EPR (linha preta) de adutos de DMPO sob irradiação com luz branca de soluções de $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em DMSO, na presença de DMPO ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$). Simulações espectrais de EPR do aduto de *spin* $\text{DMPO}^*/\bullet\text{OOH}$ (azul) e DMPO^* (linha rosa). O espectro em vermelho é a soma de ambos os espectros.



5.3.4. Rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{FD})

Assim como nos ensaios para rendimento quântico de oxigênio singleto, nestes ensaios utilizou-se o $\text{H}_3\text{Ph}_3\text{Cor}$ como comparativo para avaliar a capacidade dos substituintes pentafluorofenil (C_6F_5) em estabilizar ou desestabilizar a molécula. A Figura 15 apresenta os perfis espectroscópicos das espécies analisadas quando submetidas a irradiações com luz branca ao longo do tempo (60 min).

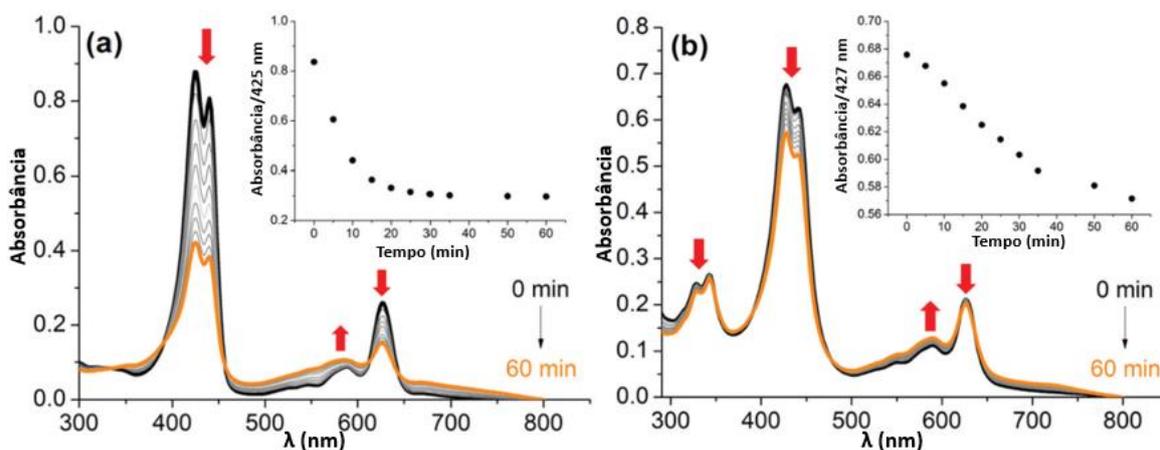
Comparando o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ ao $\text{H}_3\text{Ph}_3\text{Cor}$ (espectro omitido), pôde-se observar uma grande diferença em relação a fotoestabilidade das espécies. Os dois corróis pentafluorados apresentaram-se mais estáveis do que seu análogo, pois no 5,10,15-tri(fenil)corrol é possível observar um hipocromismo acentuado. Além disso, a molécula formou algum subproduto não identificado resultante da fotodegradação já que suas transições eletrônicas conhecidas sofreram, visualmente, modificações ao longo do ensaio. A explicação mais plausível de acordo com o perfil espectral observado pode ser a formação de espécies foto-oxidadas, possivelmente gerando espécies

poliméricas conjugadas, pela quebra da ligação C-C entre os pirróis do macrociclo.

Tendo em vista que a principal diferença entre as estruturas sintetizadas e o **H₃Ph₃Cor** é a presença de substituintes C₆F₅, ficou evidente a contribuição destes grupos para a estabilização do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**. O mesmo efeito ocorre quando estes substituintes estão presentes em outras espécies, como o 5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol [69] e *meso*-tetrakis(pentafluorofenil)platina(II)porfirina [70].

Observando os espectros de absorção eletrônica do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, constatou-se que houve apenas um hipocromismo das transições eletrônicas existentes, ou seja, diferentemente do que ocorreria com o **H₃Ph₃Cor**, não houve surgimento de novas bandas eletrônicas ou deslocamentos batocrômico ou hipsocrômico. Isto é um indício de que os corróis presentes em solução apenas foram fotodegradados sem o surgimento de um subproduto.

Figura 15: Espectros de absorção eletrônica do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e do **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, em DMSO.



A maior fotoestabilidade apresentada pelo **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** tem relação com a característica do substituinte pirenil. As transições eletrônicas observadas no espectro são correspondentes ao anel macrocíclico do corrol, e desta forma, sendo o pirenil um grupo doador de elétrons “mais eficiente” que o fenil, o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** torna-se mais estável frente à fotodegradação, resultando em

uma fotoestabilidade 5,42 vezes maior do que seu análogo e 9,51 vezes maior se comparado ao 5,10,15-tri(fenil)corrol.

Por fim, a Tabela 5 contém os parâmetros fotofísicos obtidos para determinação dos rendimentos quânticos de fotodegradação das espécies estudadas, além da constante cinética de fotodegradação (k), esta obtida através de um gráfico de tempo (eixo X) x $\ln(A_0/A)$ (eixo Y), no qual " k " é o coeficiente angular.

Tabela 5: Parâmetros fotofísicos para determinação do rendimento quântico de fotodegradação.

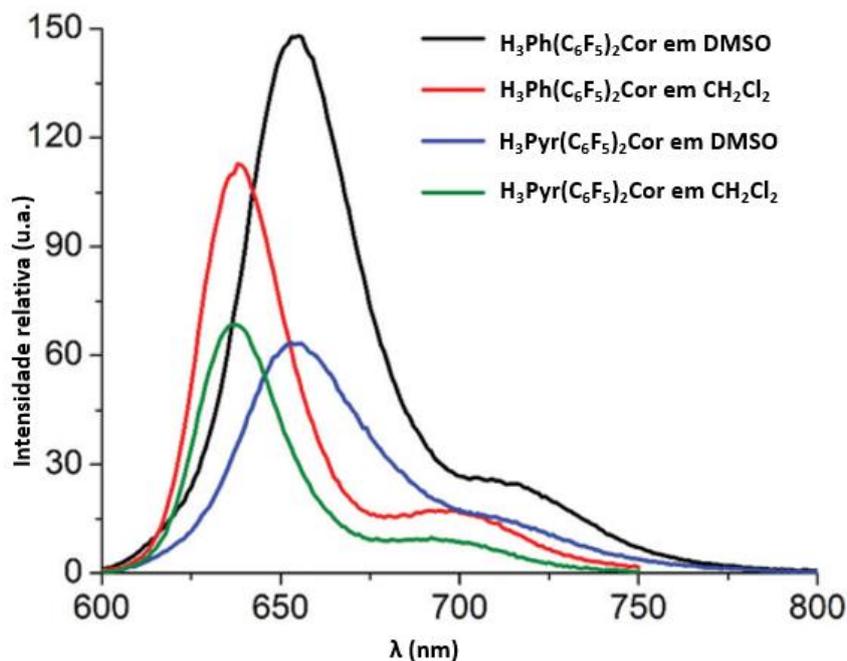
Molécula	[corrol] inicial (mol L ⁻¹)	[corrol] final (mol L ⁻¹)	k (S ⁻¹)	ϕ_{FD}
H ₃ Ph(C ₆ F ₅) ₂ Cor	1,15 x 10 ⁻⁵	5,55 x 10 ⁻⁶	1,64 x 10 ⁻²	0,11
H ₃ Pyr(C ₆ F ₅) ₂ Cor	9,78 x 10 ⁻⁵	8,68 x 10 ⁻⁶	2,70 x 10 ⁻³	0,02
H ₃ Ph ₃ Cor	1,54 x 10 ⁻⁵	4,99 x 10 ⁻⁶	1,91 x 10 ⁻²	0,20

k : Constante cinética de fotodegradação; ϕ_{FD} : Rendimento quântico de fotodegradação.

5.3.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

Os corróis estudados apresentaram emissão fluorescente nos dois solventes utilizados, e apesar de similares, seus perfis espectroscópicos diferem ligeiramente entre um solvente e outro (Figura 16). As emissões das moléculas provêm, basicamente, do anel macrocíclico porque é onde existem 18 elétrons π conjugados. Portanto, as emissões observadas estão atreladas às transições de elétrons de orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$.

Figura 16: Espectros de emissão dos corróis em seus respectivos solventes após excitação na banda Soret.



A diferença espectral entre os ensaios deve-se a presença dos tautômeros T1 e T2 em solução, o quais têm suas emissões potencializadas pelo tipo de solvente utilizado no ensaio. De acordo com a literatura, os dois tautômeros emitem fluorescência basicamente na mesma região, porém a emissão de T1 é dominante em relação ao T2, sendo, aproximadamente, 30 vezes mais intensa que seu análogo [47], sobrepondo, desta forma, a emissão de T2. Atribuem-se estas emissões a transições entre níveis vibracionais menos energéticos dos estados S_1 e S_0 [37, 47]. O mesmo comportamento foi observado em outros corróis da literatura [37, 71].

O perfil das emissões dos corróis em solventes diferentes apresentaram diferenças quanto às suas formas e energias. Assim como na espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Visível, as diferenças observadas estão relacionadas com a estabilidade que cada solvente fornece à molécula em seu estado excitado.

Teoricamente, ao alcançar o estado excitado (S_1), um fluoróforo apresenta maior momento de dipolo (μ) do que em seu estado fundamental. Um solvente polar, portanto, pode reorientar-se em torno da espécie de modo a estabilizar o estado excitado, uma vez que reduz a diferença energética entre estados S_1 e

S_0 [38]. Desta forma, emissões em solventes mais polares tendem a ocorrer em maiores comprimentos de onda, ou seja, com menores energias.

A tabela a seguir apresenta os parâmetros fotofísicos para determinação do rendimento quântico de fluorescência que incluem a integral da área de emissão (I), absorbância da espécie na banda Soret (A) e índice de refração dos solventes (η), utilizados na Equação 2.

Tabela 6: Parâmetros fotofísicos utilizados para cálculo do rendimento quântico de fluorescência.

H₃Ph(C₆F₅)₂Cor				
Solvente	I	A	η	ϕ_F
CH ₂ Cl ₂	7380,47	0,835	1,424	0,11
DMSO	4373,05	0,621	1,478	0,06
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor				
Solvente	I	A	η	ϕ_F
CH ₂ Cl ₂	2733,34	0,465	1,424	0,11
DMSO	2527,11	0,758	1,478	0,06

I: Integral da área de emissão; A: Absorbância, η : Índice de refração; ϕ_F : Rendimento quântico de fluorescência.

Em geral, os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência dos corróis estudados foram maiores em DMSO do que em CH₂Cl₂, já que um solvente mais polar tende a estabilizar melhor moléculas no estado excitado quando atingem um momento de dipolo mais elevado, facilitando a emissão de radiação fluorescente ao retornar para o estado fundamental. Por fim, a tabela a seguir apresenta um comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência dos corróis sintetizados nesta tese com outros relatados na literatura.

Tabela 7: Comparativo entre rendimentos quânticos de fluorescência do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e do $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ com outros corróis.

Molécula	Solvente	ϕ_F
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	DMSO	0,06
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	DMSO	0,06
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(4-nitro-fenil)corrol ^a	DMSO	< 0,001
5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol ^a	DMSO	0,48
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	CH_2Cl_2	0,11
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	CH_2Cl_2	0,11
5,10,15-tris(4-nitro-fenil)corrol ^b	CH_2Cl_2	0,03
5,10,15-tris(4-metóxi-fenil)corrol ^b	CH_2Cl_2	0,16

^a ref. [37]; ^b ref. [108]; ϕ_F : Rendimento quântico de fluorescência.

5.3.6. Voltametria Cíclica

O perfil da voltametria cíclica dos corróis base-livre $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ mostra processos de transferência de elétrons irreversíveis e quase-reversíveis entre -2,00 V e + 1,50 V *versus* EPH (Eletrodo Padrão de Hidrogênio) em DMC anidro em 100 mV s^{-1} (Figura 17). A atribuição das espécies foi realizada pela comparação com a eletroquímica de corróis contendo *meso*-substituintes na literatura, os quais apresentam comportamento semelhante [72].

Os processos de oxidação dos corróis $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (espécies neutras representadas por H_3Cor) em eletrodo de trabalho de platina exibem complexas características redox com picos potenciais para o escaneamento anódico em +0,60 V a 1,30 V (Figura 17). O primeiro pico de oxidação dos corróis em +0,65 V é atribuído a formação de espécies radicalares π -cátion mono-eletrônicas, seguido pela segundo e terceiro picos de oxidação mono-eletrônico, gerando cátion e dicátions, respectivamente. Além disso, ambos os corróis estudados exibiram perfis de oxidação similares independente do substituinte na posição 10 do anel macrocíclico.

Na região negativa (região catódica), dois processos de redução foram observados, para ambos os corróis, em faixa de potencial de -0,30 V a -1,30 V. O

primeiro processo de redução pode ser atribuído a espécies radicalares π -ânion em -0,54 V para o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e -0,34 V para o $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, respectivamente (Figura 17). O segundo pico de redução monoelétrônica foi observado em -1,29 V para o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e -1,24 V para o $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, os quais são semelhantes devido a formação de espécies diânions (Tabela 8).

Figura 17: Voltamograma cíclico do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (a) e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (b), ambos em solução de DCM contendo 0,1 mol L⁻¹ de hexafluorofato de tetrabutilamônio (TBAPF₆) como eletrólito, utilizando taxa de escaneamento de 100 mV s⁻¹.

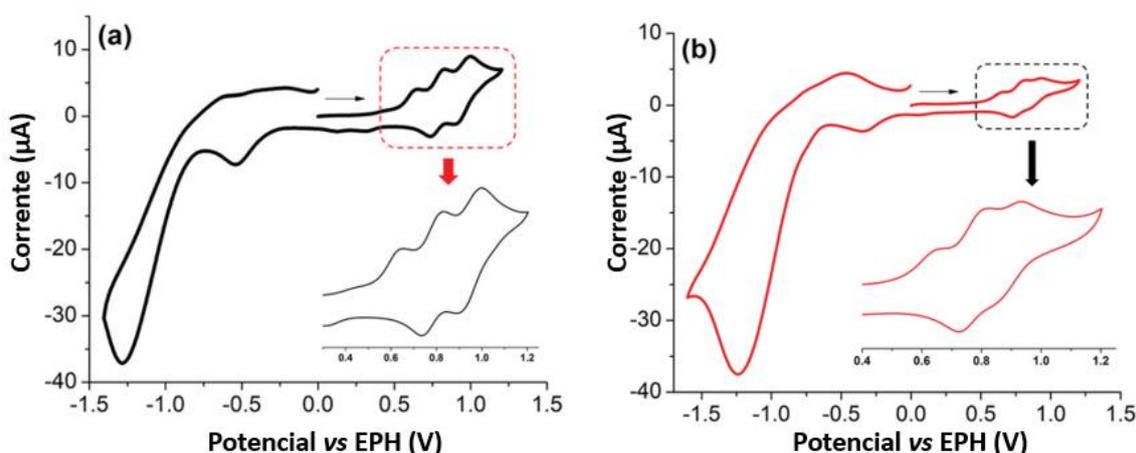


Tabela 8: Potenciais redox do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em solução de DCM (E versus EPH).

Corrol	E_{oxi1}	E_{oxi2}	E_{oxi3}	E_{red1}	E_{red2}	$E_{\text{HOMO}}^{\text{d}}$	$E_{\text{LUMO}}^{\text{e}}$	ΔE
$\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	+0,65V ^a	+0,78V ^c	+0,95V ^c	-0,54V ^b	-1,29V ^b	-5,450	-4,260	1,19
$\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$	+0,65V ^a	+0,77V ^c	+0,93V ^a	-0,34V ^a	-1,24V ^a	-5,450	-4,460	0,99

^a: Potencial do pico anódico (E_{pa}); ^b: Potencial do pico catódico (E_{pc}); ^c: $E_{1/2} = E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}} / 2$; ^d: $E_{\text{HOMO}} = -[4,8 + E_{\text{oxi}} (\text{versus EPH})]$; ^e: $E_{\text{LUMO}} = -[4,8 + E_{\text{red}} (\text{versus EPH})]$.



Capítulo 6 - Interação com Biomoléculas

6. INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS

6.1. REVISÃO DA LITERATURA

6.1.1. Interação com HSA

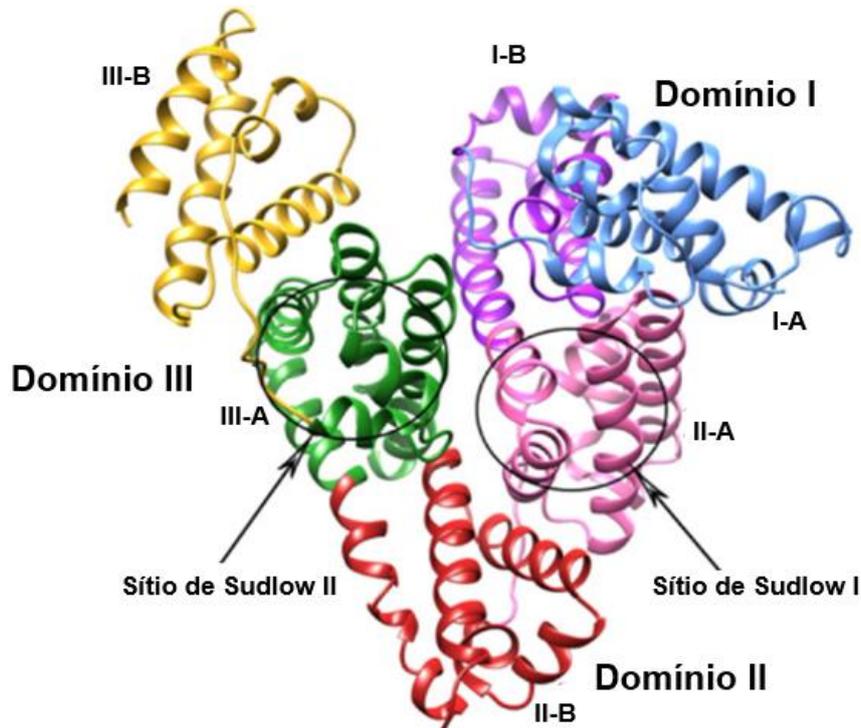
A albumina presente no soro humano (HSA) desempenha a função de transportar componentes de alto peso molecular e tem nos ácidos graxos seu principal substrato pois estes ácidos são importantes em dois aspectos principais: (i) eles são a base para a formação de lipídios que formam as membranas celulares e (ii) são a fonte para a produção de adenosina trifosfato (ATP) [73].

O HSA é uma proteína que está presente no sangue humano sendo composta por 585 aminoácidos e de, aproximadamente, 65 kD em massa. No soro humano, ela corresponde a 60% do total das proteínas. Sua estrutura é formada por três domínios helicoidais similares (I, II, III), os quais apresentam dois subdomínios cada um. A saber: IA e IB, IIA e IIB, e IIIA e IIIB (Figura 18) [74, 75].

Esta biomolécula apresenta dois sítios principais de interação, conhecidos como Sítios de Sudlow (1975) [76], os quais têm características hidrofóbicas, ou seja, interagem preferencialmente com regiões hidrofóbicas das moléculas. Desta forma, moléculas aromáticas e heterocíclicas tendem a se localizar nestes sítios [75].

A função transportadora do HSA atraiu pesquisas envolvendo diversos substratos, inclusive corróis [77]. Diversas informações podem ser obtidas em relação a interação entre a biomoléculas e corrol, entre elas está a determinação do sítio de interação preferencial do substrato. Para isto, moléculas tratadas como sondas são utilizadas para alguns sítios específicos do HSA como a varfarina (agente anticoagulante), que se localiza preferencialmente no subdomínio IIA (Sítio de Sudlow I) e o ibuprofeno (anti-inflamatório), o qual se encontra no subdomínio IIIA (Sítio de Sudlow II). Há também um terceiro sítio (subdomínio IB) o qual também se avalia a interação com o HSA, que geralmente utiliza-se a digitoxina como sonda [78].

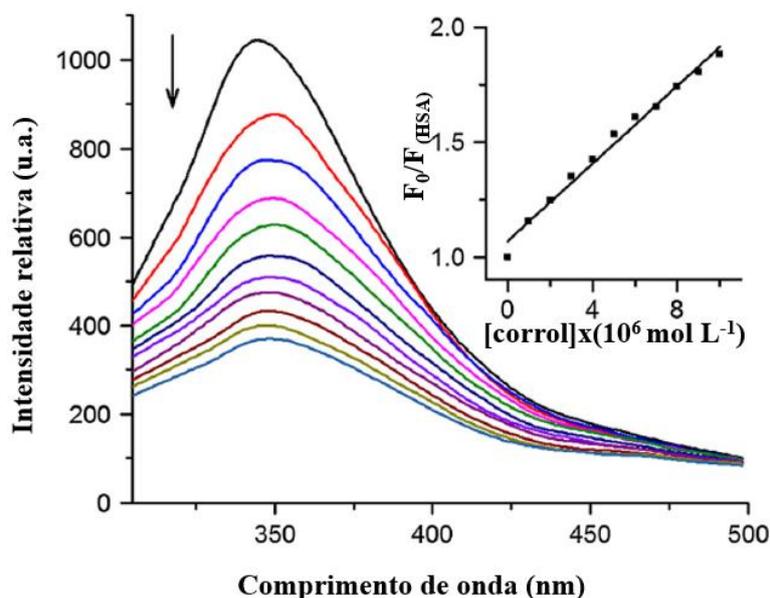
Figura 18: Representação do HSA com seus respectivos domínios e subdomínios.



Fonte: Pragna Lakshmi, T., et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2017**, 183, 90-102.

Também pode-se avaliar o quão forte ocorre esta interação. Este estudo ocorre, principalmente, por espectroscopia de fluorescência, na qual é avaliada a supressão da emissão de fluorescência do HSA após titulações com uma espécie química. A investigação é realizada excitando-se o HSA em 290 nm e observando sua emissão fluorescente no intervalo entre 300 a 500 nm (Figura 19). Este comprimento de onda de excitação é escolhido devido ao resíduo de aminoácido de triptofano (Trp²¹⁴), que está no localizador no Sítio de Sudlow I e absorve nesta região [15, 79].

Figura 19: Espectros de emissão do HSA na presença de corrol.



Fonte: Zhang, Y., et al. *Luminescence*, **2015**, 30, 1045-1054.

Conhecendo termos como intensidade relativa do HSA na ausência do supressor (F_0), intensidade relativa do HSA na presença do supressor (F), constante de Stern-Volmer (K_{sv} , $L \text{ mol}^{-1}$), concentração do supressor ao fim da titulação ($[Q]$, mol L^{-1}), constante cinética de supressão bimolecular (k_q , $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e o tempo de vida do HSA (τ_0 , 5,67 ns), é possível realizar uma estimativa da força de interação entre aduto HSA:corrol [38, 80].

Estes termos estão compreendidos na Equação 5. Porém, também é possível estimar o valor de K_{sv} a partir de um plot de $[corrol]$ (eixo X) e $\frac{F_0}{F}$ (eixo Y), no qual a constante de Stern-Volmer é igual ao coeficiente angular. De acordo com a literatura, uma constante de Stern-Volmer de, aproximadamente, $10^4 L \text{ mol}^{-1}$ é considerada uma interação forte [77].

Equação 5: Determinação da constante de Stern-Volmer [38].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

A partir desta equação também é possível determinar se a interação é de natureza estática ou dinâmica. Uma supressão de fluorescência estática envolve a formação do aduto não-fluorescente que acaba por suprimir a emissão do

fluoróforo, neste caso o HSA. Na interação dinâmica, o supressor deve difundir-se no fluoróforo durante o tempo de vida do mesmo e desativá-lo por um caminho não-radiativo. No processo dinâmico, porém, não se forma o aduto uma vez que pode haver algum tipo de efeito estérico entre as moléculas [77, 81].

A determinação do termo k_q na equação acima define a natureza desta interação. Em uma supressão por difusão controlada, ou seja, no decaimento da fluorescência ideal após contato entre as espécies, o k_q é de $10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A interação será estática se o $k_q > 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e será dinâmica se $k_q < 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A determinação do k_q ocorre pela razão entre o K_{sv} e τ_0 . Em outras palavras, a constante de supressão bimolecular fornece informações a respeito da acessibilidade do supressor ao fluoróforo [38, 82].

Se o modo de interação for estático, a constante de associação, K_a (L mol^{-1}), pode indicar a força de interação entre ambas as moléculas. Esta constante é apresentada na Equação 6, a qual é a equação de Stern-Volmer adaptada. Dos termos ainda não apresentados, “f” é a fração de fluoróforos acessíveis pelo ligante ($f \approx 1,00$). De maneira alternativa, o K_a também pode ser determinado pelo plot de $\frac{F_0}{(F_0-F)}$ (eixo Y) por $\frac{1}{[\text{corrol}]}$ (eixo X), no qual K_a corresponde ao quociente entre coeficiente linear e angular.

Equação 6: Determinação da constante de associação (K_a).

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f [Q] K_a} + \frac{1}{f}$$

As forças de interação são as que seguem: $< 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (fraca), 10^4 L mol^{-1} (intermediária) e $> 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (forte). Ressalta-se aqui que a força de interação ideal é a intermediária, pois uma interação forte entre o aduto pode fazer com que o HSA mantenha retida a molécula, dificultando sua biodistribuição no plasma sanguíneo [83].

Utilizando parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG), pode-se definir os modos de interação principais. Desta forma, a equação de van't Hoff e a equação da Variação da Energia Livre de Gibbs são utilizadas, nas quais R é a constante termodinâmica dos gases ideais ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura em Kelvin e K_a é a constante de associação (L mol^{-1}) [81]. Baseado na equação de van't

Hoff, há uma forma alternativa de determinar o ΔH e o ΔS plotando um gráfico de $\left(\frac{1}{T}\right)$ (eixo X) por $(\ln K_a)$ (eixo Y), onde o coeficiente angular obtido corresponde à $-\frac{\Delta H^\circ}{R}$ e o coeficiente linear à $\frac{\Delta S^\circ}{R}$.

Equação 7: Equação modificada de van't Hoff

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Equação 8: Equação da Variação da Energia Livre de Gibbs.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT\ln(K_a)$$

Uma vez determinados, os parâmetros termodinâmicos possibilitam estimar como ocorre a formação do aduto HSA:corrol. Sob condições normais de temperatura e pressão, a Tabela 9 apresenta estes parâmetros associados aos possíveis processos que podem ocorrer em meio proteico [84].

Tabela 9: Processos associados aos parâmetros termodinâmicos

Processo	ΔH°	ΔS°
Associação Hidrofóbica	> 0	> 0
van der Waals	< 0	< 0
Ligação de Hidrogênio	< 0	< 0
Eletrostática	< 0	> 0
Protonação	< 0	< 0

Fonte: Ross, P. D. & Subramanian, S. *Biochemistry*, **1981**, 20, 3096-3102.

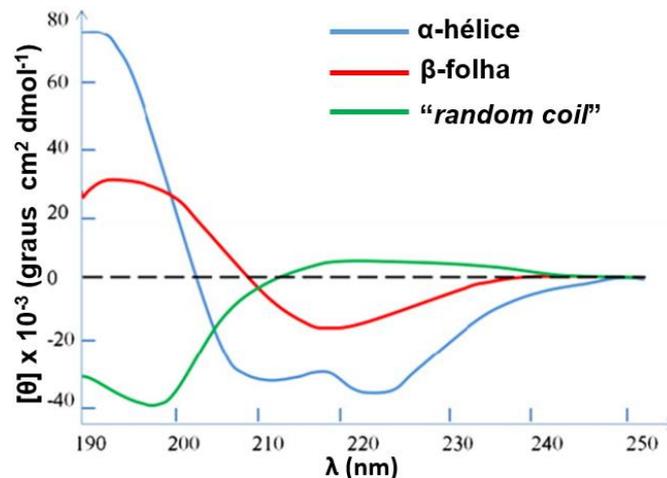
Por meio da espectroscopia de dicroísmo circular também pode-se observar interação com o HSA, pois a biomolécula apresenta estruturas secundárias (α -hélice e β -folha), cujas absorvem a luz circularmente polarizada (Figura 20) [85].

Esta técnica consiste na passagem de radiação eletromagnética por um polarizador, gerando luz linearmente polarizada e, após passar por um campo magnético oscilante, esta luz torna-se circularmente polarizada (CPL, do inglês *Circularly Polarized Light*). Porém, de acordo com a oscilação do campo

magnético, a luz circularmente polarizada rotaciona tanto no sentido horário (RCPL, do inglês *Right Circularly Polarized Light*) quanto no sentido anti-horário (LCPL, do inglês *Left Circularly Polarized Light*). Quando a RCPL e a LCPL atravessam um meio opticamente ativo, elas podem ser absorvidas de maneiras diferentes (Figura 21) [86].

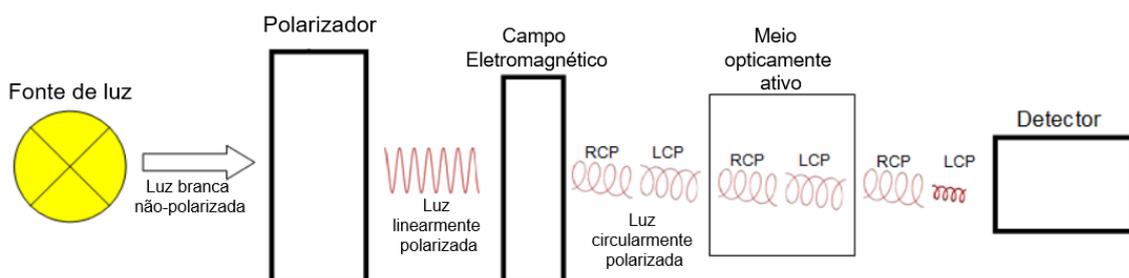
As conformações α -hélice e β -folha de sua estrutura secundária apresentam perfis diferentes quando submetidas ao ensaio de dicroísmo circular, sendo a primeira apresentando duas transições na região negativa, 208 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e 222 nm ($\eta \rightarrow \pi^*$), e uma transição eletrônica na região positiva em 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$). Já a conformação β -folha exibe uma transição na região negativa em 215 nm ($\eta \rightarrow \pi^*$) e uma na região positiva em 198 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) [87, 88].

Figura 20: Espectros de dicroísmo circular de α -hélice e β -folha.



Fonte: Adaptado de Wey, Y., Thyparambil, A. A., & Latour, R. A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **2014**, 1844, 2331-2337.

Figura 21: Representação simplificada da espectroscopia de dicroísmo circular.



Fonte: Adaptado de Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, 1996, 1 ed., 738.

Uma vez que proteínas abrangem uma grande quantidade de peptídeos, a medida da intensidade do sinal é expressa em dicroísmo molar residual (MRE, do inglês *Mean Residue Ellipcity*) que é uma medida específica para resíduos de proteína. O MRE pode ser determinado pela Equação 9 [89], na qual “ θ ” é o dicroísmo circular observado em miligraus, “ n ” é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, “ l ” é o caminho óptico (1,00 cm) e C_p é a concentração da proteína.

Equação 9: Determinação do dicroísmo molar residual (MRE).

$$\text{MRE} = \frac{\theta}{(10nlC_p)}$$

Também é possível calcular a porcentagem da mudança na α -hélice de uma proteína. Para isto, utilizam-se as equações abaixo para avaliar as mudanças nas transições na região negativa do espectro (208 e 222 nm).

Equação 10: Determinação da porcentagem de mudanças na α -hélice em 208 nm.

$$\alpha - \text{hélice (\%)} = \frac{(-\text{MRE}_{208} - 4000)}{(33000 - 4000)} \times 100$$

Equação 11: Determinação da porcentagem de mudanças na α -hélice em 222 nm.

$$\alpha - \text{hélice (\%)} = \frac{(-\text{MRE}_{222} - 2340)}{(30300)} \times 100$$

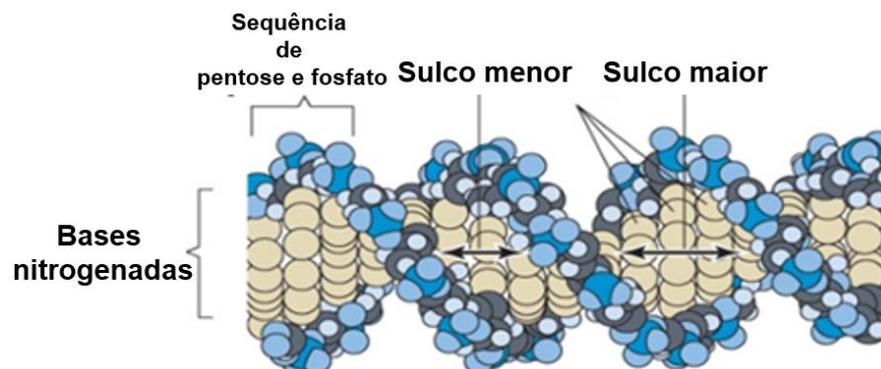
6.1.2. Interação com DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma molécula orgânica em dupla hélice na qual cada uma é formada por uma sequência de nucleotídeos contendo um grupo fosfato, uma pentose (desoxirribose) e uma base nitrogenada (timina, guanina, citosina ou adenina). As hélices interagem entre si através de ligações de hidrogênio presentes entre as bases nitrogenadas (Figura 22) [90].

Em sua forma mais conhecida – a forma B – a forma helicoidal surge da organização estrutural que tende a evitar o maior acúmulo de água possível no interior da dupla-hélice e garantir uma maior aproximação entre as bases nitrogenadas. Diante disso, formam-se cavidades ao longo da sequência de nucleotídeos. Estas cavidades são conhecidas como sulco maior e sulco menor [90].

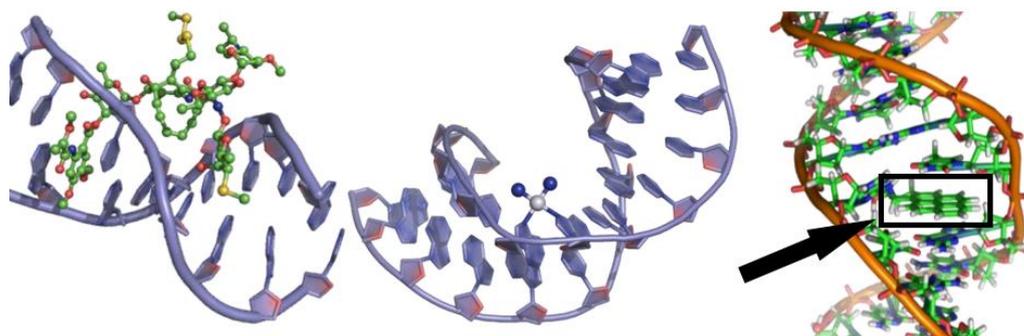
A complexidade molecular do DNA possibilita interações com moléculas em diferentes regiões ao longo de sua estrutura. Estas interações ocorrem, principalmente, com as bases nitrogenadas, porém de naturezas diferentes (Figura 23) como **(i) intercalação** (interação não-covalente), no qual a espécie encontra-se entre as bases nitrogenadas, **(ii) via sulco** (interação não-covalente), onde a espécie encontra-se entre sulco menor ou maior do DNA. Estes dois tipos de interação encontram estabilização, principalmente, por meio de ligações de hidrogênio. A **(iii) coordenação** (ligação covalente) ocorre se a molécula apresentar íon metálico disponível para tal ligação. Também é possível que interações eletrostáticas ocorram de modo a complementar as anteriores, uma vez que o DNA apresenta grupos fosfato em sua estrutura [91, 92, 93].

Figura 22: Representação estrutural do DNA e suas cavidades.



Fonte: Adaptado de Menk, C. F. M. & Sluys, M. V. *Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas*, 2017, 528.

Figura 23: Principais modos de interação observados entre DNA e espécie química.



Interação via sulcos

Interação via coordenação

Interação via intercalação

Fonte: Adaptado de da Silva, M. P. *Síntese, Caracterização e Estudos Cinéticos de Complexos de Cobre (II) com Ligantes Triazínicos como Modelos Biomiméticos da Metaloenzima Catecol Oxidase*, Dissertação (Mestrado em Química), **2014**, 110.

A constante de Stern-Volmer é utilizada, em espectroscopia de fluorescência, para calcular a força de interação entre DNA e espécie química, através da supressão da fluorescência. Se a espécie apresentar emissão fluorescente, a supressão de sua fluorescência pela presença de DNA pode ser investigada. Neste caso, avalia-se o efeito do DNA sobre a molécula em seu estado excitado.

Entretanto, os ensaios mais comuns envolvem a presença de moléculas que servem como competidores pelos sítios de interação do DNA. Desta forma, como o DNA isoladamente não apresenta fluorescência, a formação de um aduto DNA:competidor possibilita que a emissão seja observada.

Assim, a espécie química é adicionada à solução contendo o aduto e observa-se o efeito espectroscópico causado pela sua presença. O valor de K_{SV} determina se a espécie química é capaz de deslocar o competidor presente e alojar-se no respectivo sítio de ligação, comprovando uma maior afinidade com o DNA em relação ao competidor [94].

Três são os competidores mais utilizados para este tipo de análise: o brometo de etídio (EB, do inglês *Ethidium Bromide*), o qual se localiza entre as bases nitrogenadas ($\lambda_{excitação} = 510 \text{ nm}$; $550 < \lambda_{emissão} < 800 \text{ nm}$), o verde de metila (MG, do inglês *Methyl Green*) para competições entre os sulcos maiores ($\lambda_{excitação} = 318 \text{ nm}$; $330 < \lambda_{emissão} < 600 \text{ nm}$), e o DAPI (4',6-(diamidino)-2-(fenil)indol), para sulcos menores ($\lambda_{excitação} = 359 \text{ nm}$; $380 < \lambda_{emissão} < 600 \text{ nm}$). Os testes são realizados independentes um do outro [95, 96, 97].

Para os corróis, entretanto, é aconselhável utilizar o alaranjado de acridina ($\lambda_{\text{excitação}} = 492 \text{ nm}$; $500 < \lambda_{\text{emissão}} < 700 \text{ nm}$) em vez do brometo de etídio porque este absorve na mesma região das bandas Q e, desta forma, poderia mascarar o resultado do procedimento.

Por espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível também é possível avaliar a interação entre a espécie e o DNA. Nesta maneira, observa-se deslocamentos batocrômicos/hipsocrômicos nas transições eletrônicas da espécie química, além de variações nas intensidades das respectivas absorbâncias.

Via espectroscopia de absorção eletrônica, a Equação 12 apresenta os parâmetros necessários para determinar a constante de ligação (K_b) entre DNA e uma espécie química. São imprescindíveis a concentração de DNA (mol L^{-1}) ao fim do ensaio, as absortividades molares ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) da espécie química na ausência de DNA (ϵ_f) e da espécie após todas as adições de DNA (ϵ_b), além da absortividade molar aparente ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que corresponde a razão entre a absorbância observada e a concentração da espécie ($\epsilon_a = \frac{A_{\text{obs}}}{[\text{espécie}]}$), excetuando a absorbância inicial e final do procedimento [98, 99].

Equação 12: Determinação da constante de ligação (K_b).

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Porém, também é possível obter esta constante a partir da construção de um gráfico utilizando um plot de $\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ (eixo Y) e $[\text{DNA}]$ (eixo X), no qual o “ K_b ” é determinado pela razão entre os coeficientes angular e linear. Sabendo das possibilidades de interação com o DNA, corróis e outras espécies químicas têm suas propriedades químicas avaliadas a fim de desenvolver possíveis fármacos e medicamentos [100, 101].

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos espectroscópicos e interativos envolvendo proteínas foram realizados em colaboração com o estudante Otávio Augusto Chaves, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

O HSA, varfarina, ibuprofeno, digitoxina, solução tampão de PBS, DNA de timo de bezerro (*Calf-Thymus*, CT-DNA), alaranjado de acridina (*Orange Acridine*, OA), 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e o verde de metila (*Methyl Green*, MG) foram adquiridos comercialmente sem posterior purificação. A solução de HSA foi preparada em meio PBS (pH = 7,4) contendo $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato, $2,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio e $1,37 \times 10^{-1}$ de cloreto de sódio. O metanol, ácido clorídrico, clorofórmio, diclorometano e hexano também foram obtidos comercialmente. A água utilizada em todos os procedimentos estava em nível milliQ.

6.2.1. Ensaios de interação com HSA

6.2.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

Os ensaios foram realizados em espectrômetro óptico Jasco J-815, utilizando célula de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e cubeta termostática Jasco PFD-425S15F. Todos os espectros foram registrados com correção de linhas-base. A faixa determinada foi entre 200 a 500 nm, em 37 °C (310 K), em três diferentes condições, de acordo com a ordem: solução de HSA ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em PBS); soluções de um dos corróis ($2,78 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em PBS) e mistura HSA:Corrol ($1,00$ e $2,78 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em PBS).

6.2.1.2. Espectroscopia de fluorescência no estado fundamental

Os procedimentos foram realizados na faixa de 305 – 405 nm ($\lambda_{\text{exc.}} = 295 \text{ nm}$), 16 °C (289 K), 26 °C (296 K), 30 °C (303 K), 37 °C (310 K) e 44 °C (317 K). A adição de corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** ou **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** em 3,0 mL de solução HSA ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS) alcançou as concentrações finais de 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,74; 2,09; 2,44 e $2,78 \times 10^{-5} \text{ M}$ (intervalo de concentração de

corróis escolhido devido à baixa solubilidade aquosa). Cada espectro foi obtido como a média de três varreduras.

Pelo fato dos corróis serem capazes de absorver mais do que 0,10 no comprimento de onda de excitação do HSA (295 nm) e de emissão (340 nm), aplicou-se um filtro interno para corrigir os resultados de fluorescência. Esta correção está abrangida na equação abaixo, sendo F_{cor} e F_{obs} as fluorescências corrigida e observada, respectivamente. A_{exc} e A_{em} , as absortividades molares dos corróis nos respectivos $\lambda_{absorção}$ (295 nm, $\epsilon = 4424$ e 4699 L mol⁻¹ cm⁻¹, para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, respectivamente e $\lambda_{emissão}$ (340 nm, $\epsilon = 3438$ e 5320 L mol⁻¹ cm⁻¹, para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, respectivamente.

Equação 13: Equação para correção de filtro interno de emissão do HSA.

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{\frac{(A_{exc} + A_{em})}{2}}$$

Para avaliar a capacidade e os modos de interação dos corróis com o HSA, as constantes de Stern-Volmer (Equação 5), de associação (Equação 6) e os parâmetros termodinâmicos (Equação 7 e Equação 8) foram determinados.

Em outro estudo, visou-se determinar qual é o sítio de interação mais provável de ocorrer. Desta forma, escolheu-se três competidores: varfarina (subdomínio IIA) e ibuprofeno (subdomínio IIIA) e digitoxina (subdomínio IB). As concentrações do HSA e do competidor foram fixadas em razão 1:1. Antes dos corróis serem adicionados à solução de albumina, o HSA e cada competidor foram incubados por 5 minutos em 37 °C (310 K). Adições sucessivas de cada corrol foram realizadas

Sendo assim, adicionou-se 100,00 µL da solução estoque de HSA à 2,00 mL de DMSO e obteve-se o primeiro espectro ($\lambda_{excitação} = 290$ nm; 300 nm < $\lambda_{emissão}$ < 500 nm). Em seguida, 100,00 µL do respectivo competidor foram adicionados e, após três minutos de interação, obteve-se o próximo espectro. Para avaliar a competição pelo sítio, adicionou-se 10,00 mL da solução estoque do corrol, esperou-se três minutos para interagir e obteve-se o próximo espectro. Ao todo, foram adicionados 100,00 mL da solução estoque do corrol. Este procedimento foi realizado para todos os competidores a uma temperatura de 37° C (310 K).

Por fim, determinou-se a constante de Stern-Volmer para definir qual o sítio prioritário de interação entre corrol e HSA. Adições sucessivas dos corróis foram realizadas nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente.

Os espectros de fluorescência sincronizada (faixa de 240 – 320 nm) foram obtidos em fluorímetro Xe900. Os espectros foram conduzidos em solução de 3,0 mL de HSA ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em PBS) na presença e ausência dos corróis nas mesmas concentrações dos ensaios de fluorescência no estado fundamental em $\Delta\lambda = 60$ e $\Delta\lambda = 15$ nm para os resíduos de triptofano e tirosina, respectivamente. Cada espectro foi obtido como a média de três varreduras.

6.2.1.3. Espectroscopia de dicroísmo circular

Os ensaios foram realizados em Espectrômetro Óptico Jasco J-815, utilizando cubeta termostática de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm. Para as medidas utilizou-se 3,00 mL da solução estoque de HSA ($1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão PBS) na ausência e presença de diferentes proporções entre corróis e HSA (1:0; 1:5; 1:10 e 1:15), em comprimentos de onda nas faixas de 200 a 250 nm (ultravioleta distante) e 260 a 320 nm (ultravioleta próximo) e em temperatura de 37 °C (310 K). Cada espectro foi obtido após uma média de três medidas. A intensidade dos sinais de dicroísmo circular foi expressa em dicroísmo molar residual (MRE), de acordo com a Equação 9. Também foram utilizadas a Equação 10 e Equação 11 para determinar a porcentagem de mudança na α -hélice após interação com os corróis.

6.3.2. Ensaios de interação com DNA

6.3.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

A interação entre cada corrol e CT-DNA foi registrada em espectro de absorção eletrônica na região do UV-visível de modelo Shimadzu UV2600, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico, em temperatura ambiente (298 K), em solução tamponada (pH = 7,4) com mistura de DMSO(2%)/Tris-HCl. A faixa espectroscópica escolhida foi 250 – 800 nm.

A concentração do CT-DNA foi determinada utilizando a absorvidade molar de $6.600 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$, em $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$. Os corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** (solução estoque de $4,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em solução de DMSO(2%)/Tris-HCl) foram titulados com concentrações crescentes de CT-DNA (0 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). A constante de ligação (K_b) foi determinada pela Equação 12. A Variação da Energia Livre de Gibbs Padrão (ΔG°) dos adutos corrol:DNA foram calculados pela Equação 8.

6.3.2.2. Espectroscopia de fluorescência

Os ensaios de competição pelos sítios de ligação do CT-DNA foram realizados em fluorímetro Varian Cary50, utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico.

Os corróis de concentrações estoque $4,72 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em DMSO, foram gradualmente adicionados (até um máximo de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) a soluções de CT-DNA ($2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em Tris-HCl e pH = 7,4), na presença de um dos competidores: alaranjado de acridina, AO (intercalador), DAPI (sulco menor) ou verde de metila, MG (sulco maior), todos abrangendo concentração $2,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O tempo de interação foi de três minutos por cada adição do corrol.

As constantes de Stern-Volmer e constantes cinética de supressão bimolecular (k_q) foram determinadas através da Equação 5. Para isto, utilizou-se como tempos de vida (τ_0) dos fluoróforos que, neste caso, são os adutos formados como sendo $1,70 \times 10^{-9} \text{ s}$ (CT-DNA:AO), $2,20 \times 10^{-9} \text{ s}$ (CT-DNA:DAPI) e $2,80 \times 10^{-9} \text{ s}$ (CT-DNA:MG) [102, 103].

6.3.3. Estudo das interações com biomoléculas via *docking* molecular

As estruturas do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** foram construídas por cálculos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com potencial B3LYP e conjunto de bases 6-13G*, disponíveis em programa Spartan'14.

A estrutura cristalográfica do HSA foi obtida no banco de dados de proteínas. Os estudos de *docking* molecular foram realizadas com programa GOLD 5.6. Os átomos de hidrogênio foram adicionados aos estados tautoméricos e ionizados do HSA de acordo com os dados do programa 5.6. Para a albumina, os cálculos

foram explorados com raios de 10 Å em torno dos três principais sítios de ligação: resíduos de aminoácidos de Trp²¹⁴, Tyr⁴¹¹ e Tyr¹⁶¹ para os subdomínios IIA, IIIA e IB, respectivamente.

A estrutura cristalográfica do DNA foi obtida a partir de um banco de dados, na qual foi definido um raio de 5,0 Å em torno dos sulcos menor e maior da dupla hélice. Os estudos de *docking* molecular foram realizadas com programa GOLD 5.6.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1. Interação com HSA

6.3.1.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

Com o objetivo de obter informações sobre as interações, foram registrados espectros de: HSA na ausência dos corróis, corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** e, mistura HSA:corrol.

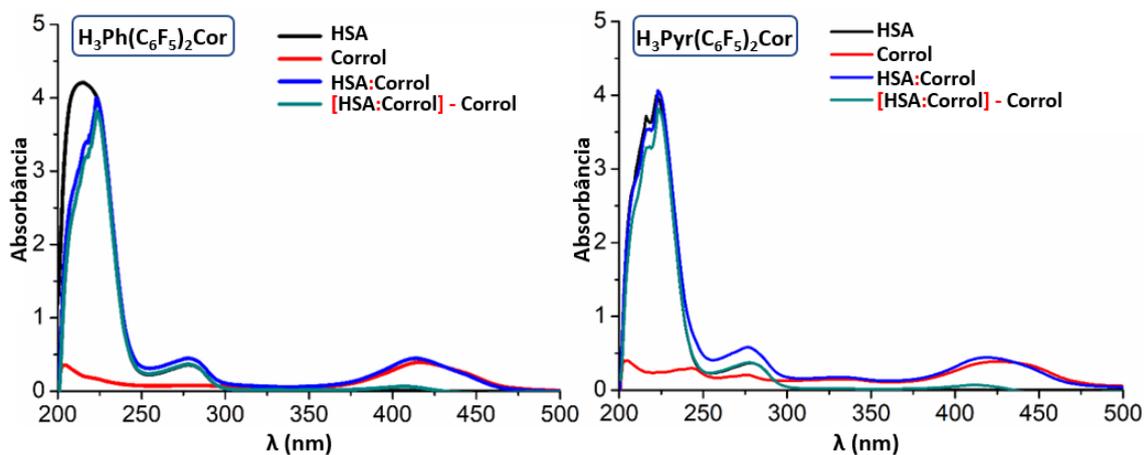
O espectro de HSA apresentou duas bandas eletrônicas, uma em 222 nm e outra em 280 nm, correspondentes a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente, os quais estão associados com os resíduos de aminoácidos de triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) [102]. Por outro lado, os espectros dos corróis apresentam, como banda de absorção máxima, transições em, aproximadamente, 420 nm (banda Soret), atribuída principalmente a transições $\pi \rightarrow \pi^*$, referente a transição do anel macrociclo.

Após a adição dos corróis ao HSA, houve hipercromismo (aumento de absorbância) da transição em 280 nm da albumina sem deslocamento batocrômico observado (Figura 24), indicando que a interação corrol:HSA parece acontecer via mecanismo estático, sem ocasionar perturbação no microambiente nos arredores dos resíduos de aminoácidos da albumina [88]

Para avaliar se o efeito hipercrômico observado é uma consequência da interação HSA:corrol e não simplesmente um resultado da absorção do corrol, os espectros de absorção da mistura HSA:corrol e dos corróis foram subtraídos. O espectro resultante (Figura 24) mostra que existe um pequeno efeito hipercrômico devido a interação HSA:corrol na interação estática. Além disso, a

banda eletrônica do HSA observada a 222 nm sofreu alteração na presença dos corróis (deslocamento batocrômico), indicando que os corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** podem perturbar a estrutura da albumina.

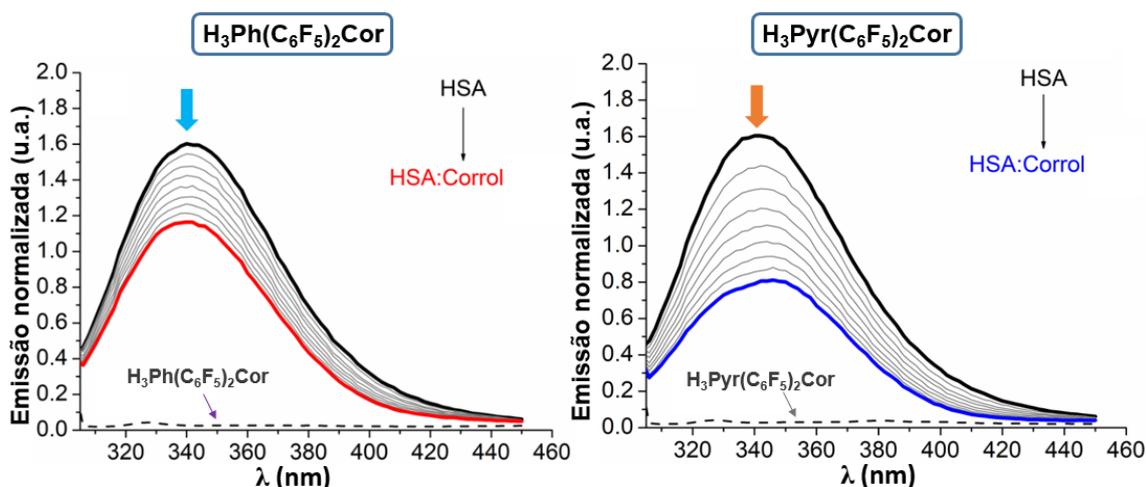
Figura 24: Espectros de UV-vis do HSA (linha preta), corróis (linha vermelha) HSA:corrol (linha azul) e espectro subtraído (HSA:corrol) – (corrol) (linha verde) em solução de PBS (pH = 7.4) em 37 °C. [HSA] = 1.00×10^{-5} mol L⁻¹ e [corrol] = 2.78×10^{-5} mol L⁻¹.



6.3.1.2. Espectroscopia de fluorescência

Para todos os ensaios, o perfil espectroscópico das interações foram as mesmas, ou seja, houve hipocromismo da transição eletrônica proveniente do resíduo de aminoácido de triptofano-214, porém sem grande deslocamento do comprimento de onda de emissão máximo (Figura 25). Isto é um indício de que os corróis, ao interagirem com este resíduo, não alteram a polaridade do microambiente ao redor do mesmo.

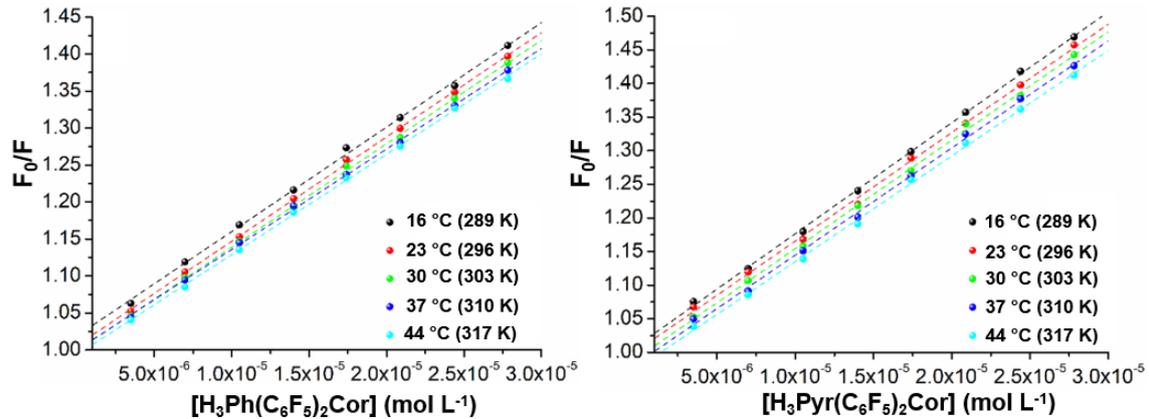
Figura 25: Perfil espectroscópico de fluorescência do HSA (pH 7,4) na presença de concentrações diferentes dos corróis à 37 °C, em DMSO.



Observou-se que os valores das constantes de Stern-Volmer tornavam-se menores à medida em que a temperatura aumentava, indicando uma interação estática entre o corrol e o sítio de ligação do HSA (Tabela 10) [104]. A Figura 26 apresenta o plot de $[\text{corrol}] \times (F_0/F)$ dos quais são obtidas as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}).

Através da equação de Stern-Volmer, determinou-se as constantes de supressão bimolecular (k_q) do aduto, os quais são apresentados na mesma tabela. Todas as constantes estiveram na ordem de $10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo, desta forma, superiores a constante de difusão máxima ($k_{dif} \approx 7,40 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [105], confirmando, portanto, o que já havia sido previsto pelos valores de K_{sv} , uma interação estática, ou seja, a formação de um aduto não-fluorescente que suprimiu a emissão do fluoróforo (HSA). Esta mesma tendência foi observada para corróis semelhantes na literatura [15]

Figura 26: Gráfico de $[\text{corrol}] \times (F_0/F)$ para obter-se as constantes de Stern-Volmer nas diferentes temperaturas analisadas.



As constantes de associação (K_a) utilizadas para avaliar a magnitude da interação entre proteínas e ligantes tiveram seus valores determinados a partir do gráfico de $\frac{F_0}{(F_0-F)}$ (eixo Y) e $\frac{1}{[\text{corrol}]}$ (eixo X), sendo o K_a o quociente entre os coeficientes angular e linear (Figura 27). Os valores contidos na Tabela 10 para o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ situam-se entre $4,7 \times 10^3$ e $3,08 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, os quais encontram-se abaixo de outras constantes encontradas na literatura [15, 77,106]. Entretanto, ressalta-se que é desejável que o K_a obtido esteja em um valor intermediário ($K_a \approx 10^4 \text{ L mol}^{-1}$) para que o ligante esteja apto a ligar-se eficientemente à proteína e que possa ser biodistribuído no organismo.

Figura 27: Gráfico de termos da equação de Stern-Volmer adaptado para interação entre HSA e corróis em 16, 23, 30, 37 e 44 °C.

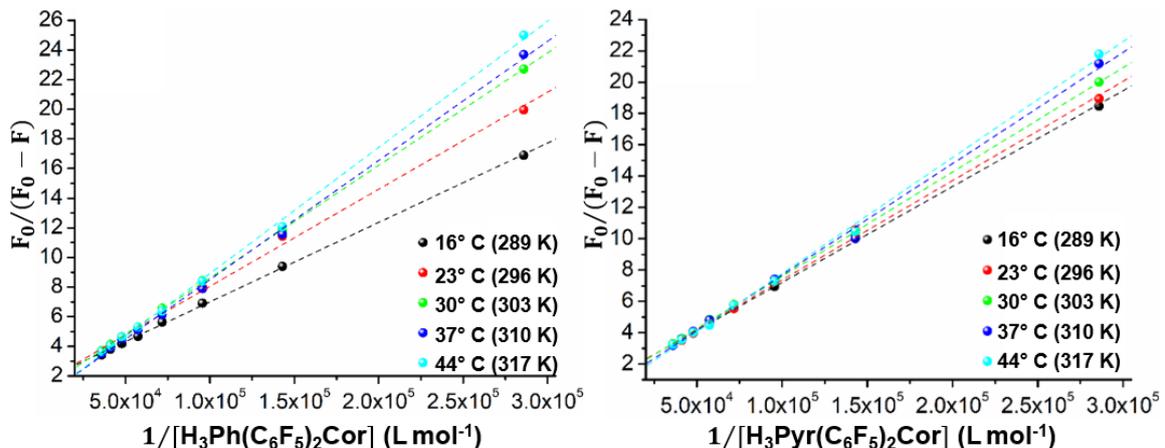


Tabela 10: Parâmetros de associação para a interação entre HSA e corróis em cinco temperatura e pH = 7,4.

Corrol	T (°C)	K_{sv} (L mol ⁻¹)	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_a (L mol ⁻¹)
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor	16	1,42 × 10 ⁴ ± 0.02	2,47 × 10 ¹²	3,08 × 10 ⁴ ± 0.13
	23	1,41 × 10 ⁴ ± 0.01	2,45 × 10 ¹²	2,29 × 10 ⁴ ± 0.13
	30	1,39 × 10 ⁴ ± 0.02	2,43 × 10 ¹²	1,36 × 10 ⁴ ± 0.13
	37	1,36 × 10 ⁴ ± 0.01	2,37 × 10 ¹²	7,00 × 10 ³ ± 0.01
	44	1,35 × 10 ⁴ ± 0.01	2,35 × 10 ¹²	4,70 × 10 ³ ± 0.01
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor	16	1,65 × 10 ⁴ ± 0.02	2,87 × 10 ¹²	1,79 × 10 ⁴ ± 0.13
	23	1,62 × 10 ⁴ ± 0.03	2,81 × 10 ¹²	1,62 × 10 ⁴ ± 0.13
	30	1,61 × 10 ⁴ ± 0.02	2,80 × 10 ¹²	1,39 × 10 ⁴ ± 0.13
	37	1,59 × 10 ⁴ ± 0.03	2,77 × 10 ¹²	1,11 × 10 ⁴ ± 0.05
	44	1,57 × 10 ⁴ ± 0.02	2,73 × 10 ¹²	9,10 × 10 ³ ± 0.04

Em uma comparação direta entre os corróis sintetizados, as constantes de associação obtidas à 37 °C indicam que o substituinte pirenil influencia na formação do aduto com o HSA, provavelmente devido sua planaridade e maior volume quando comparado ao grupo fenil de seu congêneres. Isto pode criar um ambiente favorável ao **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, pois o substituinte pirenil poderia imergir no ambiente hidrofóbico da proteína [107].

Para determinar qual é o modo de associação predominante, os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) foram calculados (Tabela 11).

Baseado na equação modificada de van't Hoff, um gráfico de $\ln K_a$ (eixo Y) e $\frac{1}{T}$ (eixo X) foi realizado para determinar ΔH e ΔS (Figura 28), e de acordo com os processos associados aos parâmetros termodinâmicos descritos por Subramanian e Ross [84], interações envolvendo a $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, cujo caso corresponde ao **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, podem ser classificadas como ligações de hidrogênio, interações de van der Waals ou protonação. Partindo do princípio de que os corróis contém uma quantidade razoável de hidrogênios e é relativamente planar, as duas primeiras hipóteses podem ser as mais prováveis de ocorrer. Tendo em vista que os valores calculados de ΔG foram negativos, os processos de interação dos corróis com o HSA ocorrem de maneira espontânea. Além disso, os valores negativos obtido do ΔH e negativo

para o termo ($T\Delta S$) para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** indicam que o processo envolvendo este corrol é entálpicamente, enquanto que para o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, o processo é entropica e entálpicamente dirigido, já que o $\Delta H < 0$ e o termo $T\Delta S > 0$. Em resumo, a presença do substituinte pirenil em vez do fenil aumenta a habilidade da molécula em interagir com o HSA do ponto de vista termodinâmico, corroborando com os maiores valores de K_a obtidos.

Figura 28: Gráfico da equação modificada de Van't Hoff para interação entre HSA e corróis em 16, 23, 30, 37 e 44 °C.

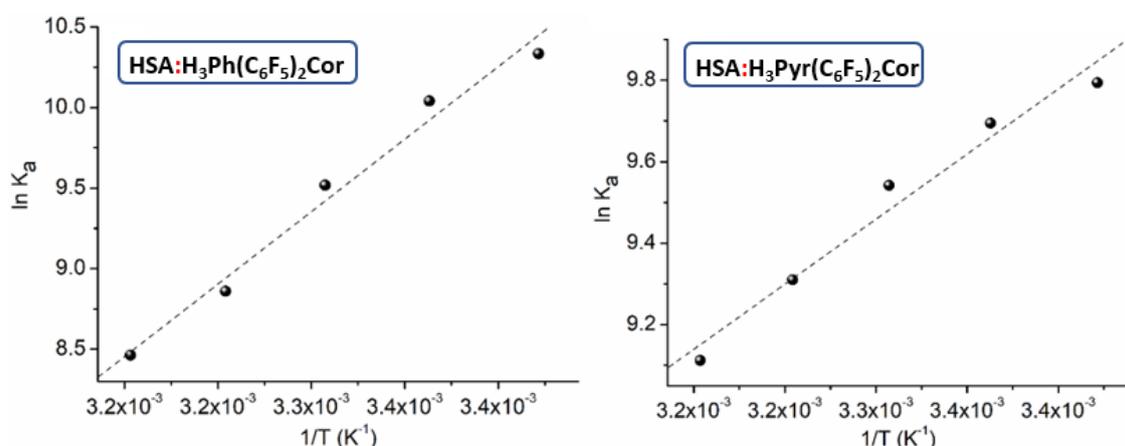


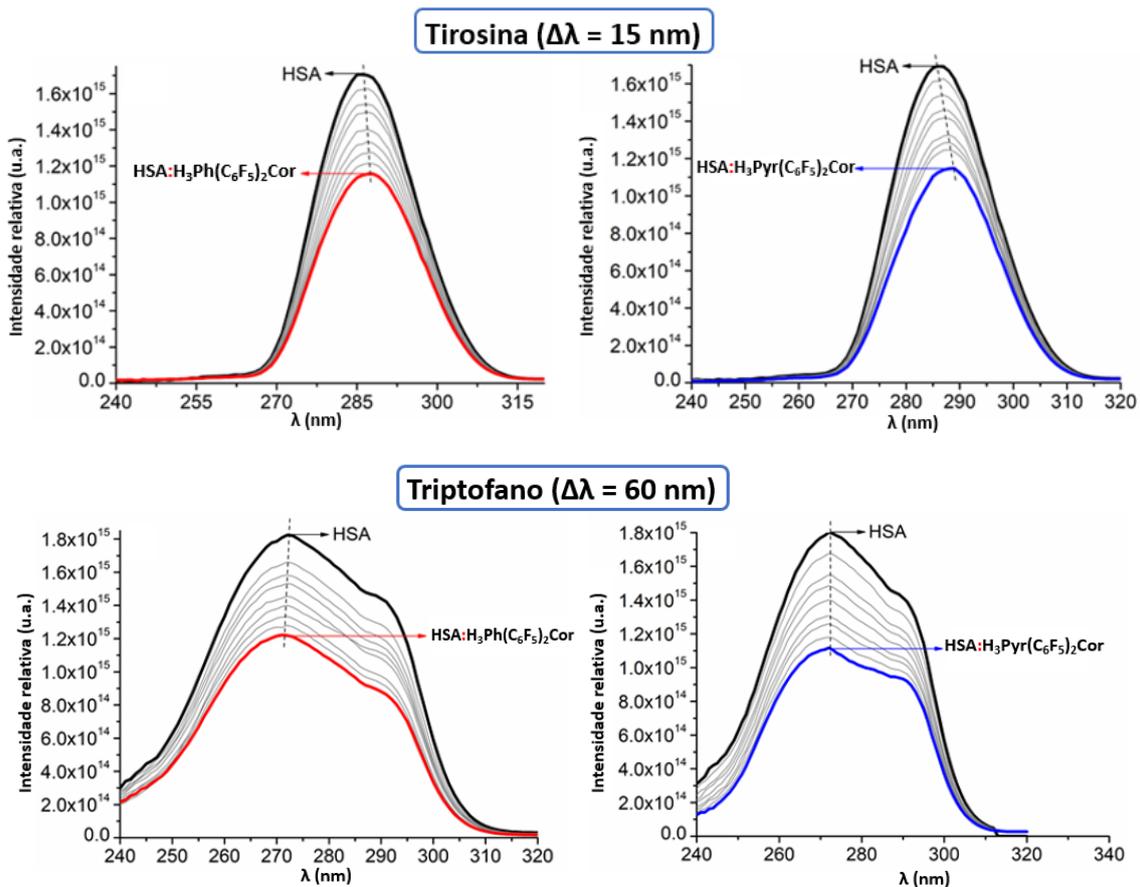
Tabela 11: Parâmetros termodinâmicos para a interação entre HSA e corróis em cinco temperatura e pH = 7,4.

Corrol	T (K)	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (kJmol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJmol ⁻¹)
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor	16	-53.5	-0.0981	-25.1
	23	-53.5	-0.0981	-24.5
	30	-53.5	-0.0981	-23.8
	37	-53.5	-0.0981	-23.1
	44	-53.5	-0.0981	-22.4
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor	16	-19.0	-0.0162	-23.7
	23	-19.0	-0.0162	-23.8
	30	-19.0	-0.0162	-23.9
	37	-19.0	-0.0162	-24.0
	44	-19.0	-0.0162	-24.1

6.3.1.3. Fluorescência sincronizada

Com o objetivo de obter informações a respeito do ambiente molecular da vizinhança dos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina, tanto na ausência quanto na presença dos corróis, a fluorescência sincronizada foi utilizada. Para esta avaliação, os espectros de fluorescência sincronizada da tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm) e triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) são apresentados de modo a tentar elucidar se os corróis afetam também as respectivas vizinhanças (Figura 29). Para ambos os casos, a presença dos corróis causou decréscimo da intensidade fluorescente sem grandes deslocamentos batô ou hipsocrômico, indicando que os corróis não afetam o microambiente em torno destes resíduos de aminoácidos [108].

Figura 29: Espectros de fluorescência sincronizada da interação entre corróis e HSA. $[HSA] = 1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $[corróis] = 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,74; 2,09; 2,44$ e $2,78 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.



Na análise da tirosina, o deslocamento observado foi de 1,0 nm, o que pode ser entendido como um erro experimental e não, necessariamente, um fenômeno físico, corroborando com resultados obtidos tanto por espectroscopia de absorção eletrônica quanto por fluorescência.

6.3.1.4. Espectroscopia de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular permite observações acerca de perturbações nas estruturas secundárias (UV distante) e terciárias (UV próximo) de proteínas. Como citado no capítulo 3, a α -hélice do HSA apresenta dois sinais negativos no espectro de dicroísmo circular: uma em 208 nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$) e outra em 222 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$), cujos correspondem às ligações peptídicas [109].

Os espectros a seguir indicaram que os corróis interagem com a estrutura secundária (200 – 250 nm) do HSA pois quanto maior se tornava a concentração do corrol, maior era perturbação observada na α -hélice (Figura 30). Além disso, também ocorreram deslocamentos batocrômicos de 208 para 212 nm para ambos os corróis nas maiores concentrações estudadas, evidenciando uma redução do conteúdo helicoidal da proteína quando submetida a altas concentrações dos corróis [89].

Os espectros de dicroísmo circular da Figura 31 são correspondentes a estruturas terciárias da proteína. Sinais negativos próximo a 262, 268, 279 e 290 nm são assinaladas como sendo de ligações entre enxofres de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de cisteína, ligações estas que possibilitam a aproximação entre estruturas secundárias e a formação da estrutura terciária da proteína [110].

As perturbações observadas nesses comprimentos de onda indicam que os corróis são capazes de interagirem com a estrutura, porém, por serem menos intensas que as da estrutura secundária, acredita-se que as interações preferenciais ocorrem nesta.

Na tabela abaixo são apresentadas as porcentagens de conteúdo helicoidal (α -hélice) restantes após o HSA estar em contato com os respectivos corróis.

Tabela 12: Conteúdo de α -hélice restante (%) para o HSA (em tampão PBS) após contato com $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, em 37 °C.

Razão Molar (HSA:corrol)	$\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (208 nm)	$\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (222 nm)	$\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (208 nm)	$\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ (222 nm)
1:0	58.2%	56.1%	58.7%	56.8%
1:5	56.2%	55.3%	58.4%	56.3%
1:10	46.7%	53.7%	50.2%	55.6%
1:15	37.9%	53.1%	35.2%	55.0%

Figura 30: Espectros de dicroísmo circular do HSA (UV distante) na ausência e na presença de diferentes proporções dos corrolis. $[\text{HSA}] = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

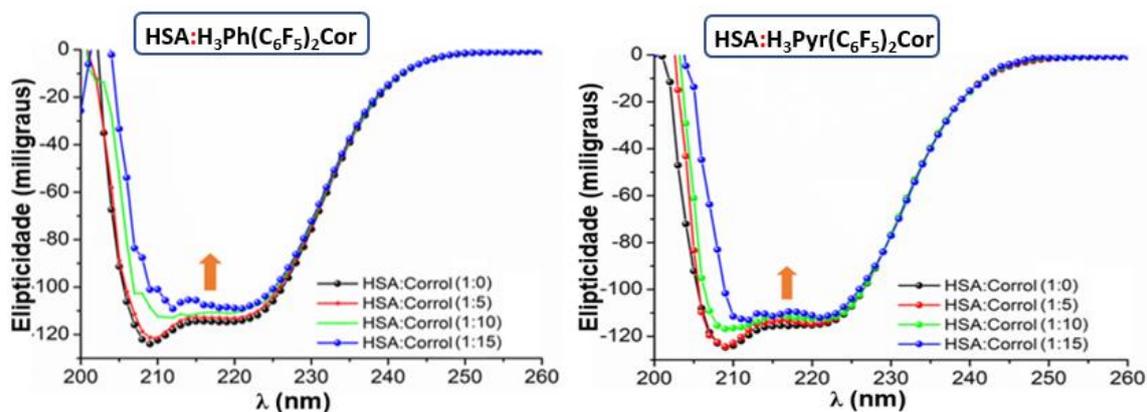
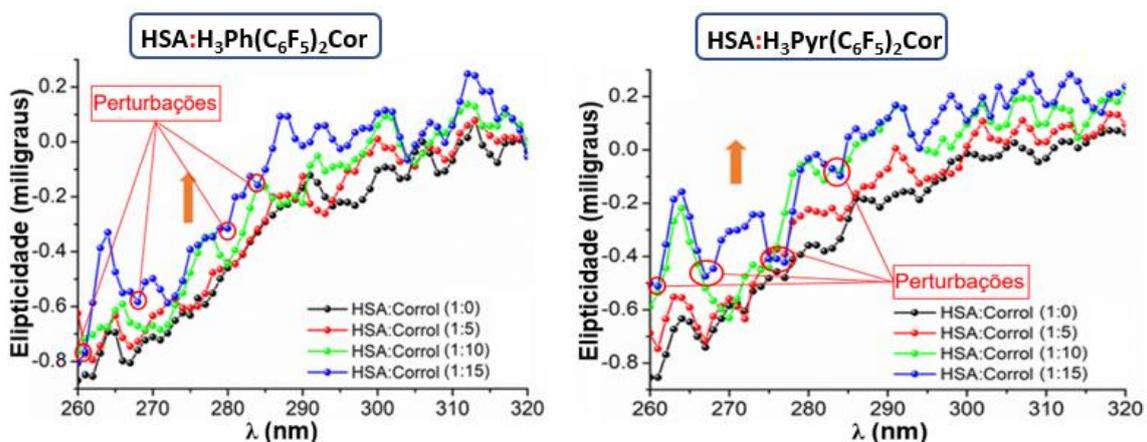


Figura 31: Espectros de dicroísmo circular do HSA (UV próximo) na ausência e na presença de diferentes proporções dos corrolis. $[\text{HSA}] = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



6.3.1.5. Interação com HSA: estudo de *docking* molecular

Após a interação com a biomolécula, o corrol pode localizar-se, preferencialmente, em um dos três sítios de interações do HSA: sítio de Sudlow I (subdomínio IIA), sítio de Sudlow II (subdomínio IIIA) e sítio III (subdomínio IB), representados na

Figura 32. Para isto, estudos via *docking* molecular foram utilizados pois permitem uma aproximação em nível atômico da habilidade de ligação de cada ligante dentro dos três possíveis sítios [81].

Os valores de pontuação de *docking* para a interação entre HSA e os corróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** nos três sítios estudados são apresentados na Tabela 14 e Tabela 15. De acordo com a tabela, o subdomínio IIIA apresentou a menor pontuação entre os três sítios para os dois corróis. Desta forma, assume-se que é pouco provável que os ligantes tendam a localizar-se neste subdomínio (sítio de Sudlow II). A proximidade, em pontuação, entre os outros dois sítios indicam que o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** poderiam ligar-se em qualquer um dos subdomínios IIA ou IB.

Na literatura, não é incomum derivados porfirínicos interagirem preferencialmente com o subdomínio IIA ou IB. Por exemplo, o Fe(III)-2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol e o ânion *meso*-tetra(fenilsulfonato)porfirina na forma livre e na sua forma coordenada com íon Mg^{II} também localizam-se no subdomínio IIA [15, 111,112], enquanto a protoporfirina IX acomoda-se no interior do subdomínio IB [113].

Tabela 13: Pontuação de *docking* molecular para interação do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e do **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** com o HSA.

Corrol	HSA		
	Subdomínio IIA	Subdomínio IIIA	Subdomínio IB
H ₃ Ph(C ₆ F ₅) ₂ Cor	71.2	6.70	69.5
H ₃ Pyr(C ₆ F ₅) ₂ Cor	86.9	24.9	81.8

Os resultados do *docking* molecular sugerem interações de van der Waals e ligações de hidrogênio como as principais forças de interação para cada corrol dentro dos três principais sítios do HSA. Entretanto, as tabelas abaixo também

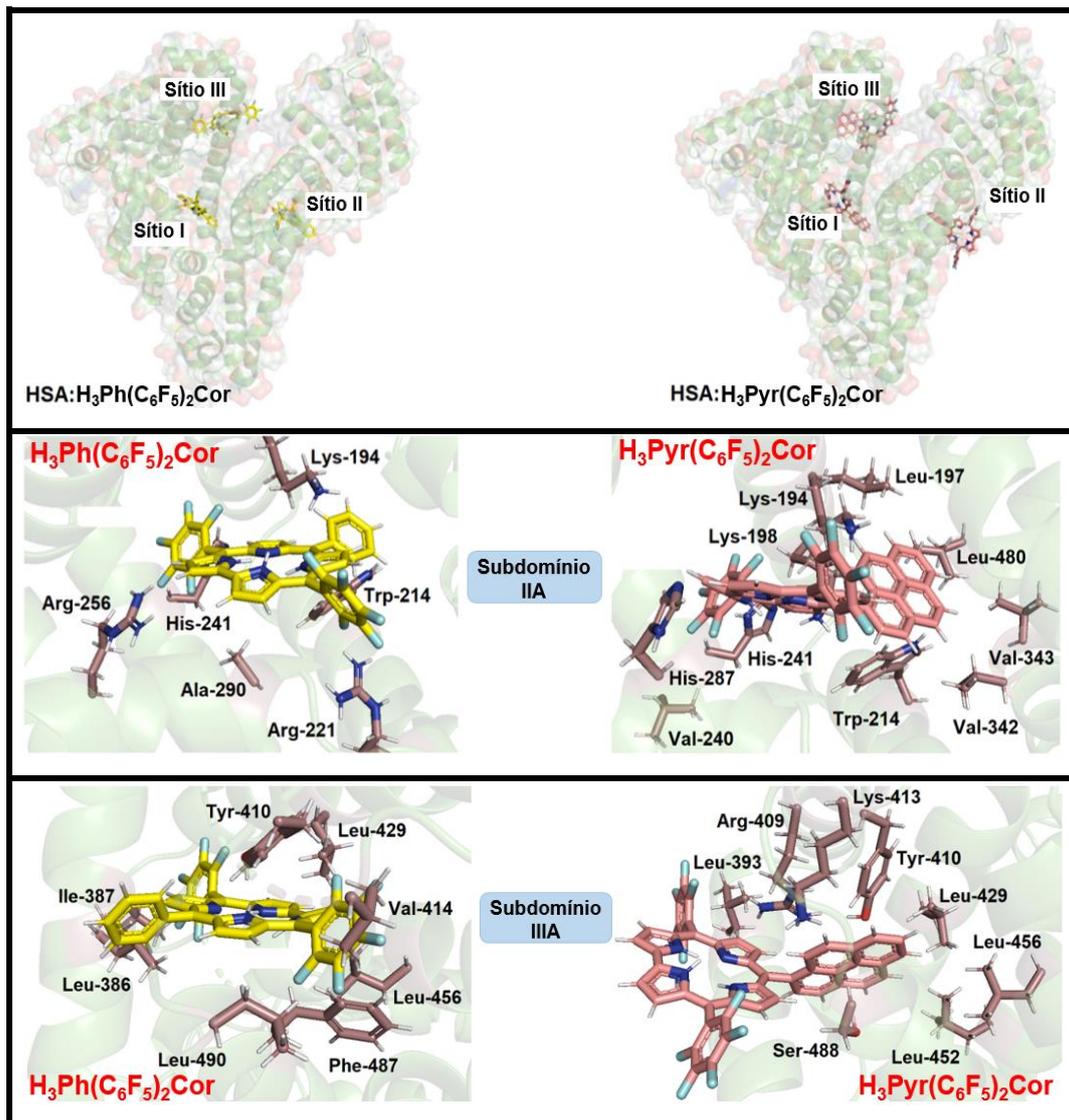
apresentam interações via π -cátion para os subdomínios IIA e IB (os dois principais sítios possíveis para os corróis).

Como exemplo, para a interação HSA:**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** no subdomínio IIA, o hidrogênio do grupo guanidina dos resíduos de aminoácido de arginina-221 (Arg²²¹) e arginina-256 (Arg²⁵⁶) são os principais átomos para ligações de hidrogênio com os átomos de flúor presentes no ligante, os quais estão distantes 2,50 e 3,50 Å, respectivamente. Já os resíduos de aminoácidos de triptofano-214 (Trp²¹⁴), histidina-241 (His²⁴¹) e alanina-290 (Ala²⁹⁰) podem interagir via forças de van der Waals com o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**, os quais distanciam-se 2,40, 3,20 e 2,50 Å, respectivamente. Além disso, o núcleo do corrol pode interagir via π -cátion com o resíduo de aminoácido de lisina-194 (Lys¹⁹⁴), dentro de uma distância de 3,00 Å.

Assim como em outras interações não-covalentes envolvendo sistemas aromáticos, as interações π -cátion incluem um componente eletrostático substancial que aumenta as energias de ligação em 2 – 5 kcal/mol, tornando-as competitivas com as ligações de hidrogênio e pares de íons nas interações fármaco-receptor e proteína-proteína.

Assim, estudos têm estabelecido a importância da interação π -cátion no que diz respeito a processos biológicos [114]. Uma vez que somente os subdomínios IIA e IB apresentaram interação π -cátion para os corróis, provavelmente este tipo de força poderia ser uma das razões pelas quais os corróis ligam-se dentro destes sítios.

Figura 32: Resultados de *docking* molecular para a interação HSA:corrol dentro dos subdomínios IIA (sítio I), IIIA (sítio II) e IB (sítio III). Resíduos de aminoácidos selecionados estão representados como bastões em marrom, enquanto o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e o $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ estão em amarelo e rosa, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio (branco), nitrogênio (azul-escuro), flúor (azul-claro) e oxigênio (vermelho).



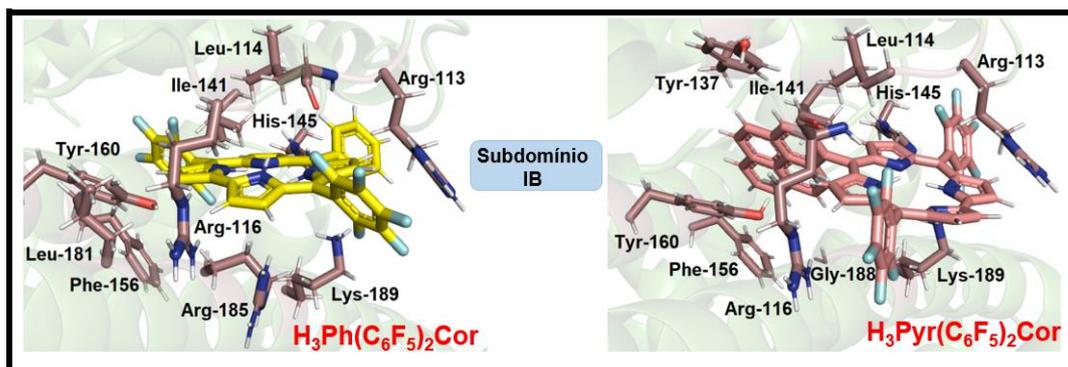


Tabela 14: Resultados de *docking* molecular para a interação entre $H_3Ph(C_6F_5)_2Cor$ e HSA.

Subdomínio	Resíduo de aminoácido	Tipo de interação	Distância (Å)
Subdomínio IIA	Lys ¹⁹⁴	π -cátion	3.00
	Trp ²¹⁴	van der Waals	2.40
	Arg ²²¹	Ligação de hidrogênio	2.50
	His ²⁴¹	van der Waals	3.20
	Arg ²⁵⁶	Ligação de hidrogênio	3.50
	Ala ²⁹⁰	van der Waals	2.50
Subdomínio IIIA	Leu ³⁸⁶	van der Waals	2.80
	Ile ³⁸⁷	van der Waals	1.80
	Tyr ⁴¹⁰	Ligação de hidrogênio	2.30
	Val ⁴¹⁴	van der Waals	1.80
	Leu ⁴²⁹	van der Waals	1.80
	Leu ⁴⁵⁶	van der Waals	2.10
	Phe ⁴⁸⁷	van der Waals	1.50
Leu ⁴⁹⁰	van der Waals	3.30	
Subdomínio IB	Arg ¹¹³	π -cátion	2.70
	Leu ¹¹⁴	van der Waals	3.40
	Leu ¹¹⁴ (C=O)	Ligação de hidrogênio	3.20
	Arg ¹¹⁶	van der Waals	1.20
	Ile ¹⁴¹	van der Waals	1.30
	His ¹⁴⁵	van der Waals	3.60
	Phe ¹⁵⁶	van der Waals	3.50
	Tyr ¹⁶⁰	van der Waals	1.80
	Leu ¹⁸¹	van der Waals	2.90
	Arg ¹⁸⁵	van der Waals	3.40
Lys ¹⁸⁹	van der Waals	2.00	

Tabela 15: Resultados de *docking* molecular para a interação entre H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor e HSA.

Subdomínio	Resíduo de aminoácido	Tipo de Interação	Distância (Å)
Subdomínio IIA	Lys ¹⁹⁴	π -cátion	2.50
	Leu ¹⁹⁷	van der Waals	3.10
	Lys ¹⁹⁸	van der Waals	1.90
	Trp ²¹⁴	van der Waals	2.70
	Val ²⁴⁰	van der Waals	3.60
	His ²⁴¹	van der Waals	2.30
	His ²⁸⁷	van der Waals	2.60
	Val ³⁴²	van der Waals	2.90
	Val ³⁴³	van der Waals	3.20
	Leu ⁴⁸⁰	van der Waals	3.00
Subdomínio IIIA	Leu ³⁹³	van der Waals	2.40
	Arg ⁴⁰⁹	van der Waals	1.70
	Tyr ⁴¹⁰	van der Waals	2.40
	Lys ⁴¹³	van der Waals	1.40
	Leu ⁴²⁹	van der Waals	3.10
	Leu ⁴⁵²	van der Waals	2.70
	Leu ⁴⁵⁶	van der Waals	2.70
	Ser ⁴⁸⁸	van der Waals	3.00
Subdomínio IB	Arg ¹¹³	van der Waals	2.50
	Leu ¹¹⁴	van der Waals	3.60
	Arg ¹¹⁶	π -cátion	3.80
	Arg ¹¹⁶ (N-H)	Ligação de hidrogênio	1.80
	Tyr ¹³⁷	van der Waals	2.30
	Ile ¹⁴¹	van der Waals	3.40
	His ¹⁴⁵	van der Waals	2.00
	Phe ¹⁵⁶	van der Waals	2.00
	Tyr ¹⁶⁰	van der Waals	2.10
	Gly ¹⁸⁸	van der Waals	2.90
Lys ¹⁸⁹	Ligação de hidrogênio	1.80	

6.3.2. Interação com DNA

6.3.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-visível

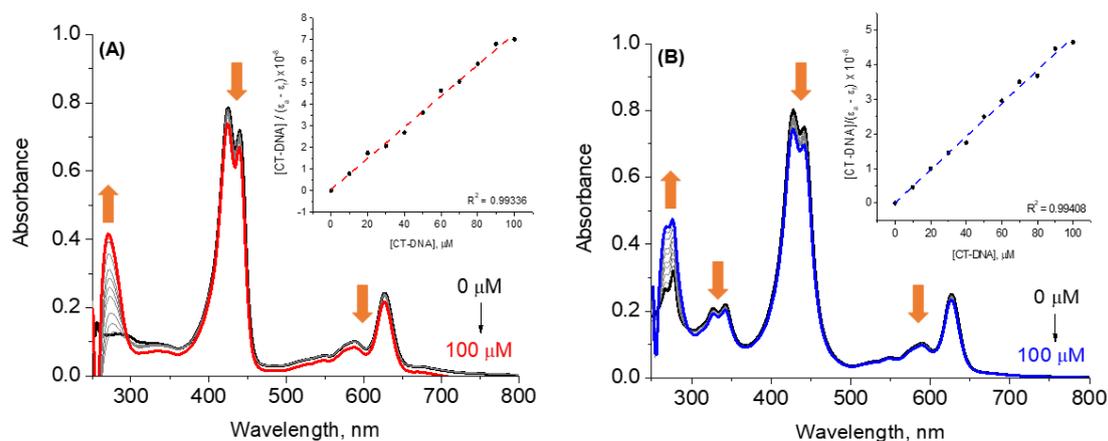
A espectroscopia de absorção pode ser utilizada para investigar a interação do DNA com complexos metálicos e moléculas orgânicas. Assim, com o objetivo de entender as mudanças espectrais causadas pela interação entre DNA e os coróis estudados, a espectroscopia de absorção na região do UV-visível foi utilizada. A Figura 33 apresenta o espectro de UV-visível dos coróis **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** na ausência e na presença de sucessivas adições de DNA de timo de bezerro (CT-DNA).

Os dois coróis apresentaram hipocromismo de suas principais transições eletrônicas. Além disso, a pequena variação de absorbância observada na banda Soret do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** (6,1% e 7,2%, respectivamente) indica que os substituintes fenil e pirenil conseguem adentrar parcialmente entre as bases nitrogenadas, mas que a interação principal ocorre na região externa da biomolécula [115]. Na região de 290 nm, houve o surgimento de uma transição eletrônica correspondente a absorção por parte do DNA.

Embora exista similaridade entre os espectros de absorção eletrônica dos coróis, as constantes de ligação determinadas foram diferentes, tendo o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** como a espécie que interagiu mais fortemente com o DNA. As constantes de ligação obtidas foram $1,49 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ para o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e $1,05 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ para o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, este apresentando-se, aproximadamente, 7 vezes mais eficiente quando se trata da formação do aduto DNA-corol.

Em relação ao perfil espectral da interação entre DNA e aduto, efeitos de intercalação do DNA são indicados através de hipocromismo e batocromismo acentuados, uma vez que os orbitais do tipo π das espécies podem se sobrepor, reduzindo a energia das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (batocromismo) [15, 99].

Figura 33: Espectros de absorção eletrônica dos corróis após adições de CT-DNA, em DMSO/Tris-HCl pH 7,4.



Interação via sulcos são indicados por pequeno deslocamento batocrômico e pouco hipocromismo [15, 99, 116]. Como os espectros de absorção eletrônica apresentam, essencialmente, pouco hipocromismo, há indícios para afirmar que o modo principal de interação com o DNA é o de interação via sulcos. O **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** também apresentou pouco deslocamento batocrômico (2 nm), mas como este deslocamento é pequeno, é pouco provável que este fato indique uma intercalação.

Por fim, as constantes de ligação apresentadas pelo **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** são um pouco maiores quando comparadas a outros corróis presentes na literatura (Tabela 16), o que as habilitam para estudos mais aprofundados para interações com biomoléculas.

Tabela 16: Constante de ligação (K_b) do $H_3Ph(C_6F_5)_2Cor$ e $H_3Pyr(C_6F_5)_2Cor$ comparados aos da literatura.

Molécula	K_b (L mol ⁻¹)
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – $H_3Ph(C_6F_5)_2Cor$	1,49 x 10 ⁵
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – $H_3Pyr(C_6F_5)_2Cor$	1,05 x 10 ⁶
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(4-metóxicarbonilfenil)-(piridil)gálio(III)corrol ^a	2,52 x 10 ⁵
5,15-bis(4-metóxicarboxifenil)-10-(pentafluorofenil)-(piridil)gálio(III)corrol ^a	6,23 x 10 ⁴
2,17-bis(sulfonato)-5,10,15-tris(pentafluorofenil)corrol ^b	5,76 x 10 ⁴
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(<i>p</i> -hidroxi-fenil)ferro(III)corrol ^c	1,28 x 10 ⁵
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(<i>p</i> -hidroxi-fenil)manganês(III)corrol ^c	2,94 x 10 ⁵
5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(<i>p</i> -hidroxi-fenil)cobre(III)corrol ^c	2,20 x 10 ⁵

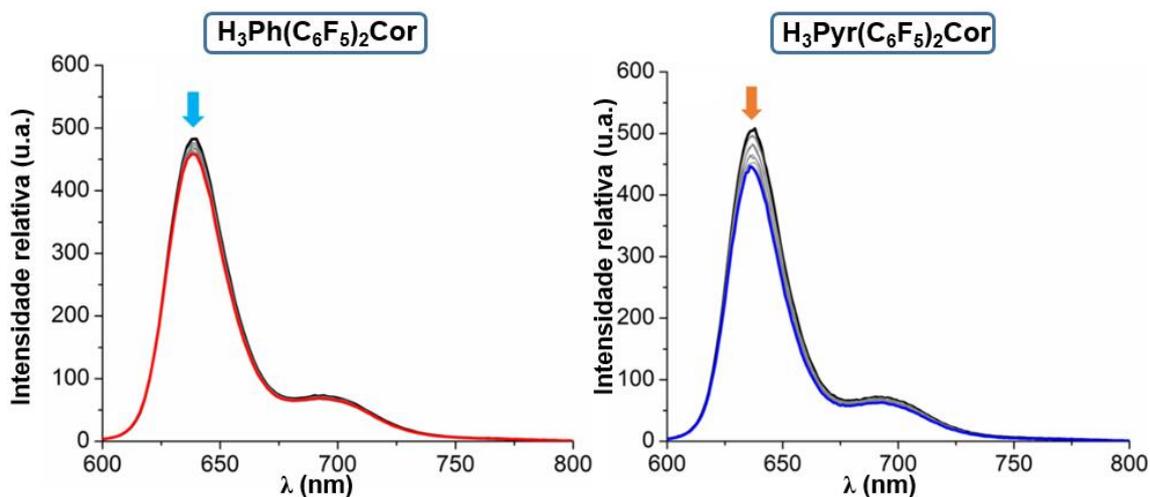
^a ref. [100]; ^b ref. [15]; ^c ref. [117].

6.3.2.2. Espectroscopia de fluorescência

Primeiro, avaliou-se o efeito da presença do DNA no estado excitado dos corróis. A Figura 34 demonstra que adições sucessivas de CT-DNA (solução tampão de DMSO/Tris-HCl pH 7,4) às soluções de $H_3Ph(C_6F_5)_2Cor$ e $H_3Pyr(C_6F_5)_2Cor$ causaram hipocromismo (5 a 12%) da emissão observada, sendo mais acentuado no corrol com substituinte pirenil.

A pequena hipocromicidade, sem apresentar deslocamento batocrômico, demonstra que estes corróis podem interagir com o DNA através de um modo não-intercalativo. Portanto, o modo preferencial de interação entre corróis e DNA parece ser por forças de ligação através de sulcos da biomolécula.

Figura 34: Espectros de emissão dos corróis após sucessivas adições de soluções de CT-DNA.



Com o objetivo de determinar qual é a localização preferencial dos corróis ao interagir com o DNA, realizou-se ensaios de competição utilizando alaranjado de acridina (AO), DAPI e verde de metila (MG) como competidores pela intercalação de bases nitrogenadas, sulco menor e sulco maior do DNA, respectivamente. Para isto, observou-se o efeito da adição do respectivo corrol à mistura de CT-DNA:competidor. Pelo plot de [corrol] (eixo X) e (F_0/F) (eixo Y), calculou-se a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), principal parâmetro utilizado para prever qual a localização preferencial dos corróis.

Observando a Figura 35 e a Figura 36, pôde-se constatar que as adições sucessivas dos corróis às misturas de CT-DNA:competidor causaram redução na emissão fluorescente da solução, indicando que os corróis têm a capacidade de estarem em qualquer um dos sítios de interação possíveis.

Os valores de K_{sv} calculados para as interações estão dispostas na Tabela 17, onde indica que o DAPI sofre maior competição com o corrol pelo sulco menor do DNA, uma vez que a constante de Stern-Volmer obtida é a maior entre os ensaios de competição. Além disso, os valores da constante cinética de supressão bimolecular (k_q) indicam que as interações são estáticas pois todos os termos calculados foram acima da constante de difusão controlada ideal ($10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Tabela 17: Constantes de Stern-Volmer obtidos para os corróis após interação com DNA, em DMSO, à 37 °C. Os possíveis desvios dos valores obtidos foram omitidos para melhor visualização.

Competidor	K_{sv} (L mol ⁻¹)		k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	
	H ₃ Ph(C ₆ F ₅) ₂ Cor	H ₃ Pyr(C ₆ F ₅) ₂ Cor	H ₃ Ph(C ₆ F ₅) ₂ Cor	H ₃ Pyr(C ₆ F ₅) ₂ Cor
AO (intercalação)	3,43 x 10 ³	3,46 x 10 ³	2,02 x 10 ¹²	2,03 x 10 ¹²
DAPI (sulco menor)	5,8 x 10 ³	6,12 x 10 ³	2,64 x 10 ¹²	2,78 x 10 ¹²
MG (sulco maior)	1,04 x 10 ³	1,20 x 10 ³	3,71 x 10 ¹²	4,28 x 10 ¹²

Figura 35: Espectros de fluorescência resultantes da interação entre HSA e H₃Ph(C₆F₅)₂Cor, em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). [CT-DNA] = 2,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, [AO] = [DAPI] = [MG] = 2,00 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e [corrol] = 0 a 100 μmol L⁻¹.

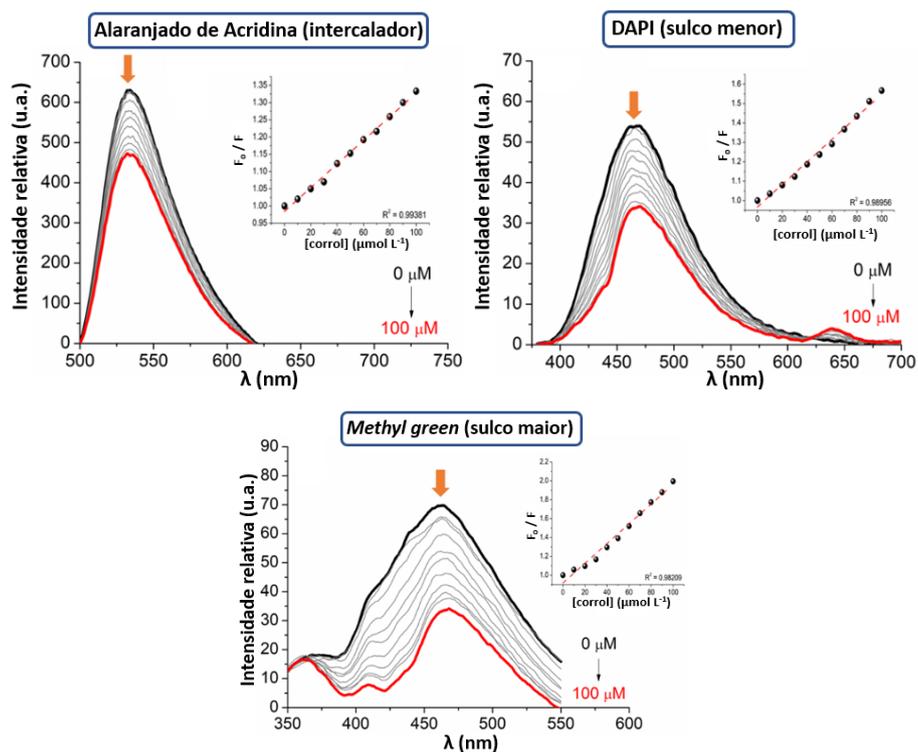
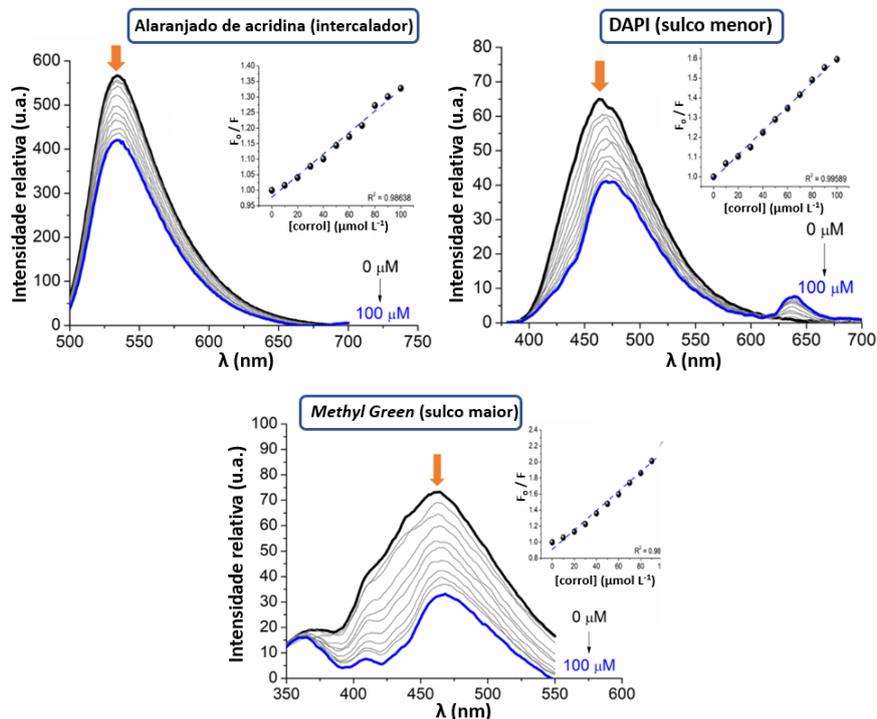


Figura 36: Espectros de fluorescência resultantes da interação entre HSA e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, em DMSO/Tris-HCl (pH = 7,4). [CT-DNA] = $2,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [AO] = [DAPI] = [MG] = $2,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e [corrol] = 0 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.



6.3.2.3. Interação com DNA: estudo de *docking* molecular

Cálculos de *docking* molecular também foram empregados para oferecer uma explicação em nível molecular entre cada corrol e DNA. Assim como pode ser visto na Tabela 18, a pontuação atribuída aos corróis indicam que eles podem encaixar-se tanto em sulcos maiores quanto em sulcos menores do DNA. Entretanto, há um indicativo de que o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** insere-se melhor no sulco maior e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, no sulco menor, corroborando os ensaios realizados por fluorescência utilizando os competidores *Methyl Green* e DAPI.

A Figura 37 apresenta a melhor posição para cada corrol dentro das fitas de DNA e a Tabela 19 mostra as principais forças intermoleculares envolvidas na interação. Os resultados do *docking* molecular sugerem interações de van der Waals e ligações de hidrogênio como as principais forças entre os nucleotídeos e os corróis, exceto para o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**, no qual não foram detectadas ligações de hidrogênio. Como exemplo, o oxigênio do grupo carboxila do DG-10 é um potencial receptor para ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo

amino do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ no sulco maior, os quais estão distantes 2,90 Å, enquanto os resíduos de nucleotídeos DT-08, DC-09, DC-13, DC-14 e DC-15 interagem com o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ via forças de van der Waals, distantes entre si 1,80, 3,50, 2,80, 3,00 e 3,00 Å, respectivamente.

Figura 37: Resultados de *docking* molecular para a interação DNA:corrol. Resíduos de nucleotídeos estão representados como bastões em marrom, enquanto o $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ são nas cores amarelo e rosa, respectivamente. Cores dos elementos: hidrogênio (branco).

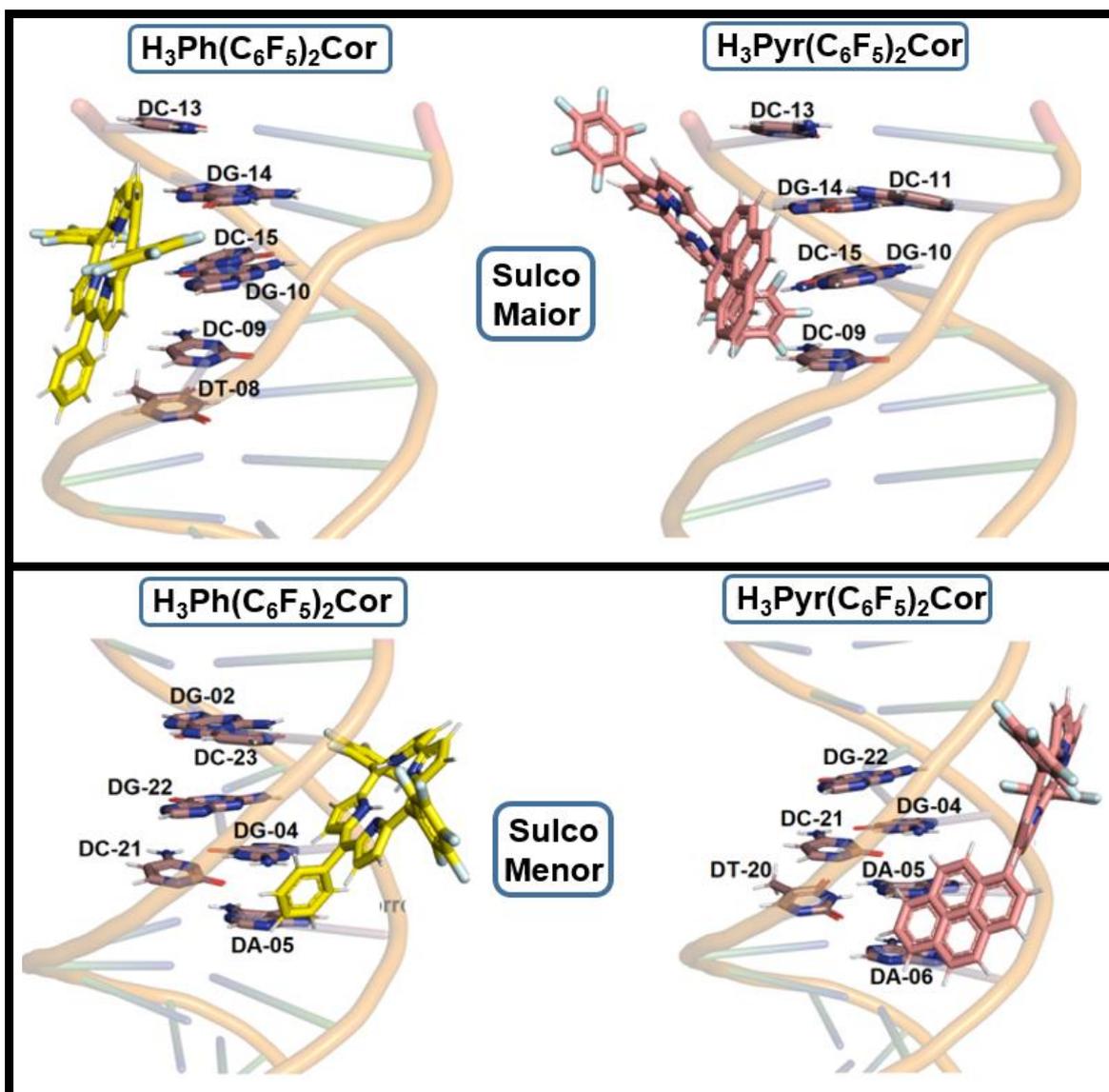


Tabela 18: Pontuação de *docking* molecular para interação do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e do **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** com o DNA.

DNA:corrol		
Corrol	Sulco menor	Sulco maior
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor	55,3	50,2
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor	57.7	53.8

Tabela 19: Resultados de *docking* molecular para a interação entre DNA e corróis.

Corrol (Sulco)	Resíduos de nucleotídeos	Tipo de interação	Distância (Å)
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor (Sulco maior)	DT-08	van der Waals	1,80
	DC-09	van der Waals	3,50
	DG-10	Ligações de hidrogênio	2,90
	DC-13	van der Waals	2,80
	DG-14	van der Waals	3,00
	DC-15	van der Waals	3,00
H₃Ph(C₆F₅)₂Cor (Sulco menor)	DG-02	Ligação de hidrogênio	2,90
	DG-04	van der Waals	1,70
	DA-05	van der Waals	3,10
	DC-21	van der Waals	3,30
	DG-22	van der Waals	3,10
	DC-23	van der Waals	3,70
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor (Sulco maior)	DC-09	van der Waals	2,80
	DG-10	van der Waals	2,50
	DC-11	van der Waals	3,60
	DC-13	van der Waals	3,00
	DG-14	van der Waals	2,90
	DC-15	van der Waals	1,60
H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor (Sulco menor)	DG-04	van der Waals	3,30
	DA-05	van der Waals	3,00
	DA-06	van der Waals	3,60
	DT-20	van der Waals	3,40
	DC-21	van der Waals	3,10
	DG-22	Ligação de hidrogênio	3,80



Capítulo 7 - Demais Análises

7. MICROANÁLISES E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

7.1. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN%)

As análises elementares de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram obtidas utilizando-se um equipamento Perkin-Elmer CHN 2400e. As análises foram realizadas em duplicata.

A Tabela 20 apresenta os resultados para análise elementar (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio do **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**. Além disso, o **H₃Ph₃Cor** adquirido comercialmente também foi analisado para comprovar sua pureza. Os resultados confirmaram a pureza das amostras, uma vez que as porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio calculadas teoricamente aproximaram-se das porcentagens obtidas experimentalmente.

Tabela 20: Resultado das análises elementares de CHN (%) das amostras

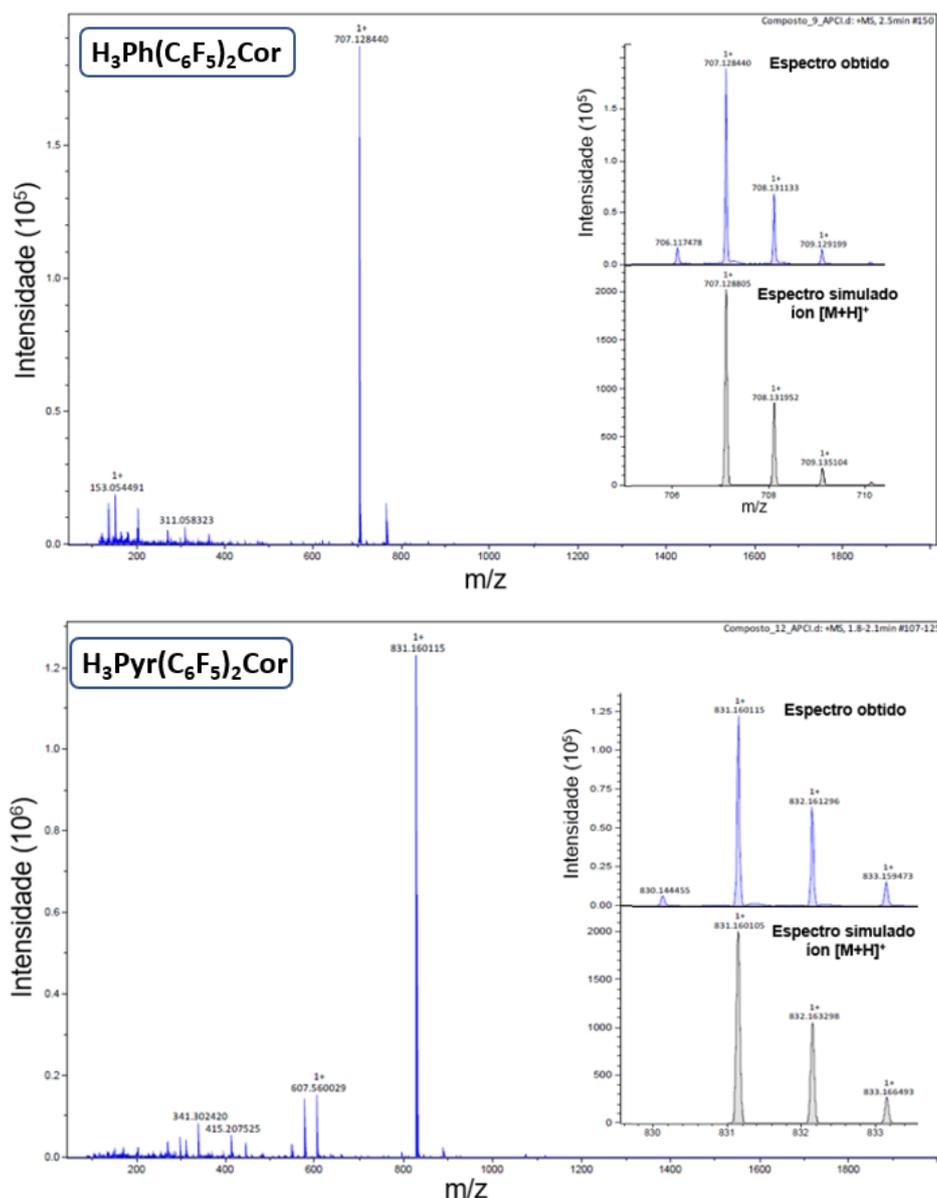
Elemento	H ₃ Ph(C ₆ F ₅) ₂ Cor	H ₃ Pyr(C ₆ F ₅) ₂ Cor	H ₃ Ph ₃ Cor
%C _{obtido} ; %C _{calculado}	62,98; 62,90	68,03; 67,96	84,66; 84,38
%H _{obtido} ; %H _{calculado}	2,29; 2,28	2,46; 2,43	5,02; 4,98
%N _{obtido} ; %N _{calculado}	7,97; 7,93	6,88; 6,74	10,66; 10,64
Fórmula molecular	C ₃₇ H ₁₆ F ₁₀ N ₄	C ₄₇ H ₂₀ F ₁₀ N ₄	C ₃₇ H ₂₆ N ₄

7.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (HRMS) ACOPLADA A IONIZAÇÃO QUÍMICA POR PRESSÃO ATMOSFÉRICA (APCI)

Os espectros de massa de alta resolução dos compostos foram obtidos em um espectrômetro Bruker Micro TOF-QII 10416, com ionização química por pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*), no modo positivo. Os espectros de massa foram registrados com soluções diluídas em MeOH, aproximadamente, 500 ppb de concentração com um fluxo de 150 µL min⁻¹ e capilares de 3500 V.

Para confirmar a formação dos corróis $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ utilizou-se a técnica de espectrometria de massas (HRMS-APCI) no modo positivo. Nos espectros de massa obtidos (Figura 38), notou-se que os corróis foram observados, uma vez que os fragmentos de seus pesos moleculares correspondentes foram detectados ($\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, $m/z = 706,117478$; $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$, $m/z = 830,144455$) nas suas formas protonadas, representados pela sigla $[\text{M}+\text{H}]^+$ e pela distribuição isotópica (diferença entre os picos) de +1. Estes resultados estão de acordo com o esperado e com os espectros que foram simulados anteriormente, confirmando a existência das espécies.

Figura 38: Espectros de massa do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ e do $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$.



7.4. ESPECTROS DE RESONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR COSY 2D ^1H - ^1H

Figura 41: Espectro de COSY 2D ^1H - ^1H do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em CDCl_3 .

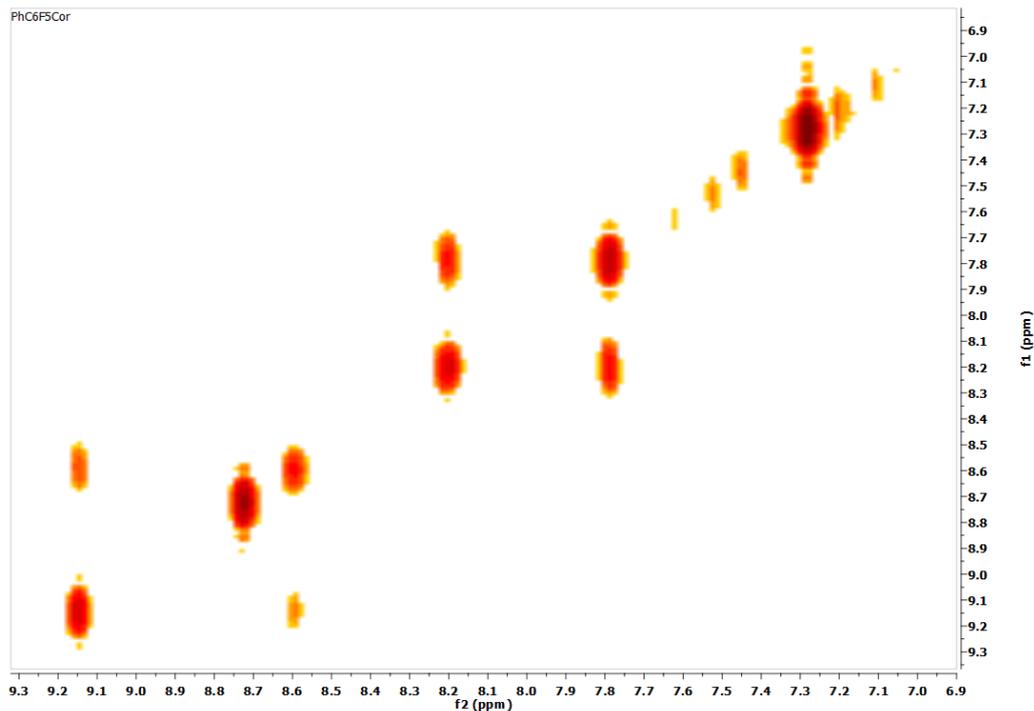
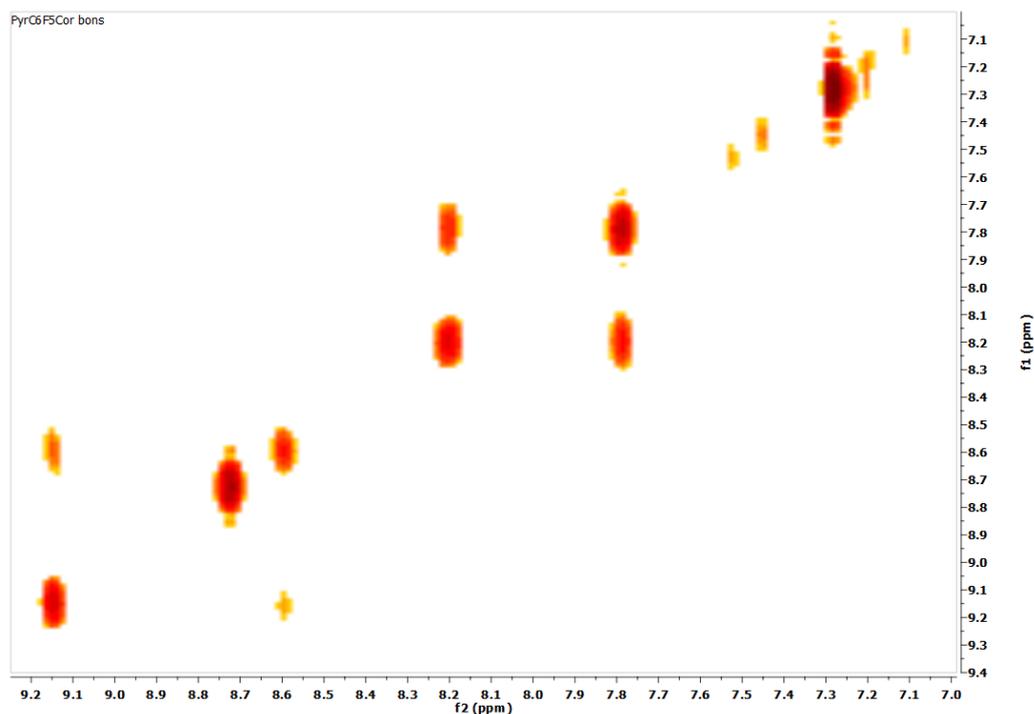
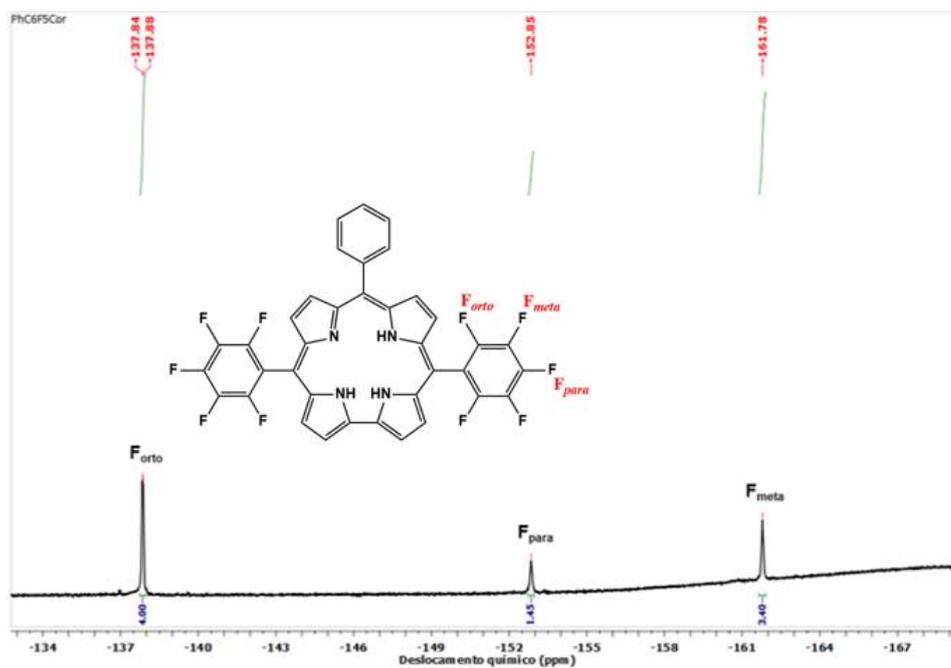
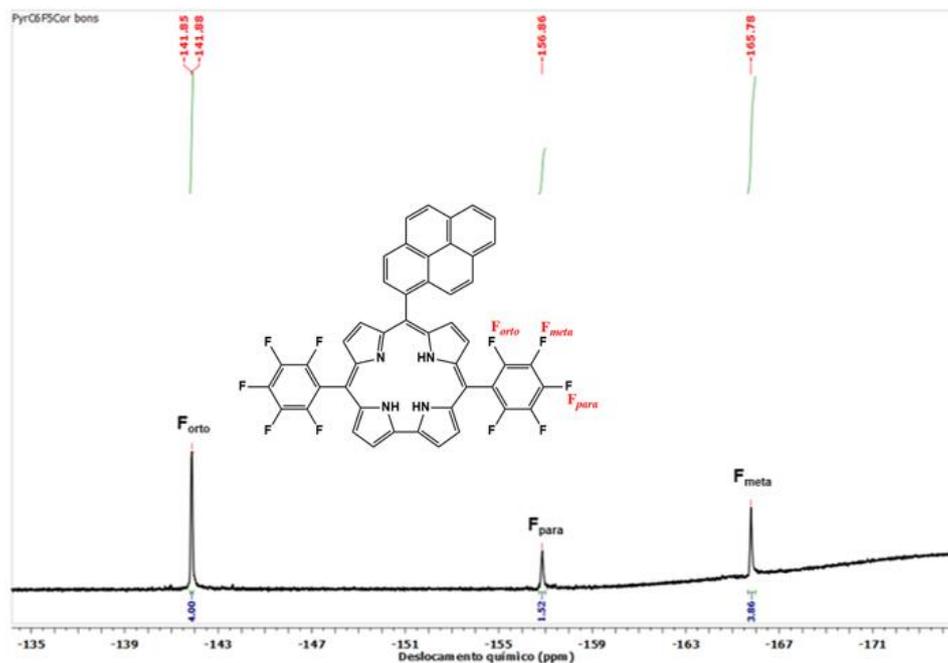


Figura 42: Espectro de COSY 2D ^1H - ^1H do $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em CDCl_3 .



7.5. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{19}F Figura 43: Espectro de ^{19}F -RMN do $\text{H}_3\text{Ph}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em CDCl_3 .Figura 44: Espectro de ^{19}F -RMN do $\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor}$ em CDCl_3 .



Capítulo 8 - Conclusões

8. CONCLUSÕES

Neste trabalho, apresentou-se da síntese do 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(fenil)corrol – [**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**] e do 5,15-bis(pentafluorofenil)-10-(pirenil)corrol – [**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**], partindo dos precursores benzaldeído e 1-pirenocarboxaldeído, respectivamente, além do 5-(pentafluorofenil)dipirrometano.

Estas moléculas foram caracterizadas através de diferentes técnicas como análise elementar CHN%, espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis, ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹⁹F e COSY 2D ¹H-¹H, espectrometria de massas de alta-resolução, voltametria cíclica, bem como seus rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto, fotodegradação e fluorescência.

Também foi avaliada a capacidade dos corróis em interagir com biomoléculas tais como a albumina de soro humano (HSA) e DNA. Ao serem comparados a outros corróis na literatura, o **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** apresentaram satisfatórios rendimentos quânticos de oxigênio singleto e elevada fotoestabilidade, características estas que os tornam potenciais agentes em aplicações biológicas como interação com proteínas e DNA.

Diante destes fatos, interações com as biomoléculas foram realizadas através de ensaios de espectroscopia de fluorescência e de absorção eletrônica na região do UV-vis e determinou-se que **H₃Ph(C₆F₅)₂Cor** e o **H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor** apresentaram elevadas constantes de associação (K_a) em 37 °C, os quais foram $7,00 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e $1,11 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), e ocorrem espontaneamente, uma vez que foi constatado que a variação da energia livre de Gibbs para os corróis foi negativo ($\Delta G < 0$). A interação entre corrol e DNA também foi investigada. Por espectroscopia eletrônica na região do UV-vis obteve-se, como constantes de ligação (K_b), $1,49 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e $1,05 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Pyr(C₆F₅)₂Cor**), valores estes que estão acima das constantes de ligação encontradas na literatura.

Por espectroscopia de fluorescência, a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi utilizada para determinar a capacidade interativa dos corróis com o DNA. Os valores de K_{sv} determinados foram: $1,36 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (**H₃Ph(C₆F₅)₂Cor**) e $1,59$

$\times 10^4 \text{ L mol}^{-1}(\text{H}_3\text{Pyr}(\text{C}_6\text{F}_5)_2\text{Cor})$. Também, com o auxílio de estudos teóricos de *docking* molecular, foi possível estimar a posição preferencial dos corróis ao interagirem com as biomoléculas. Para os dois corróis, as pontuações de *docking* indicaram o sulco menor como sítio preferencial do DNA e o subdomínio IIA, para o HSA. Por fim, a principal interação entre corróis e DNA/HSA é por forças de van der Waals.

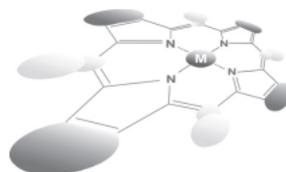


Capítulo 9 - Artigos Publicados

9. ARTIGOS PUBLICADOS

Journal of Porphyrins and Phthalocyanines
J. Porphyrins Phthalocyanines 2020; A–T
 DOI: 10.1142/S1088424620500534
 (pp. 20)

Published at <https://www.worldscinet.com/jpp/>



Fluorescent pyrene moiety in fluorinated C₆F₅-corroles increases the interaction with HSA and CT-DNA

Thiago V. Acunha^a, Otávio A. Chaves^{*b} and Bernardo A. Iglesias^{*a}

^aLaboratory of Bioinorganics and Porphyrinic Materials, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria — UFSM, Roraima 1000, Santa Maria — RS, 97105-900, Brazil

^bSENAI Institute of Innovation in Green Chemistry, Morais e Silva 53, Rio de Janeiro — RJ, 20271-030, Brazil

Received 26 August 2020

Accepted 02 October 2020

PAPER

View Article Online
 View Journal | View Issue



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
 2020, 22, 16965

Photophysical and electrochemical properties of two *trans*-A₂B-corroles: differences between phenyl or pyrenyl groups at the *meso*-10 position†

Thiago V. Acunha,^a Henrique F. V. Victória,^b Klaus Krambrock,^b
 Amanda C. Marques,^c Luiz Antônio S. Costa^{ib c} and Bernardo A. Iglesias^{ib *a}

The present study reports on the optical and photophysical properties of *trans*-A₂B-corroles possessing pyrenyl units attached at the *meso*-10-position and compares them with those of model *trans*-A₂B-corroles having phenyl substituents at that position. In contrast to the model *meso*-substituted corrole, the new pyrenyl-corrole shows slightly red-shifted absorption bands and blue-shifted emission, slightly higher fluorescence quantum yield, and more importantly, it shows better photo-stability under white-light illumination. Theoretical calculations were used to determine the electronic transitions and geometries of the singlet and triplet excited states (TD-DFT and NTO). Moreover, we demonstrate that the pyrenyl-corrole in analogy to previously studied model corroles is able to generate reactive oxygen species (ROS) under visible light using photo-degradation of 1,3-diphenylisobenzofuran (DBPF), a singlet oxygen quencher, and EPR spectroscopy allied with the spin-trapping method is used for identifying singlet oxygen species. The results show that the pyrenyl unit attached at the *meso*-10-position of the corrole increases the photo-stability and efficiency in ROS generation compared to the phenyl substituent.

Received 2nd May 2020,
 Accepted 1st July 2020

DOI: 10.1039/d0cp02364g

rsc.li/pccp



Capítulo 10- Referências

10. REFERÊNCIAS

- [1] Gross, Z., Galili, N., & Saltsman, I. *Angewandte Chemie International Edition*, **1999**, 38, 1427-1429.
- [2] Ivanova, Y. B., et al. *The Journal of Physical Chemistry*, **2012**, 116, 10683-10694.
- [3] Giovannetti, R. *Macro to Nano Spectroscopy*. **2012**, 448.
- [4] Gryko, D. T. & Jadach, K. *The Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66, 4267-4275.
- [5] Koszarna, B. & Gryko, D. T. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 71, 3707-3717.
- [6] Guizado, T. R. C. *Estudos Computacionais da Interação de Porfirinas e seus complexos de Ferro com Albumina Sérica Humana*, Dissertação (Mestrado em Física), **2008**, 141.
- [7] Ding, F. & Peng, W. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2016**, 18, 6595-6606.
- [8] Ross, P. D. & Subramanian, S. *Biochemistry*, **1981**, 20, 3096-3102
- [9] Boer, D. R., Canals, A. & Coll, M. *Dalton Transactions*, **2009**, 399-414.
- [10] Nafisi, S., et al. *Journal of Molecular Structure*, **2007**, 87, 35-43.
- [11] Harrison, H. R., Hodder, O. J. R. e Hodgkin, D. C. *Journal of the Chemical Society B*, **1971**, 640-645.
- [12] Liccoccia, S. e Paolesse, R. *Structure and Bonding*, **1995**, 84, 71-133.
- [13] Bursa, B., et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2015**, 17, 7411-7423.
- [14] You, L., et al. *Science China Physics, Mechanics and Astronomy*, **2010**, 53, 1491-1496.
- [15] Zhang, Y., et al. *Luminescence*, **2015**, 30, 1045-1054.
- [16] Ghosh, A. & Jynge, K. *Chemistry A European Journal*, **2006**, 823-833.
- [17] Ghosh, A. & Almloef, J. *The Journal of Physical Chemistry*, **1995**, 99, 1073-1075.
- [18] Ou, Z., et al. *Inorganic Chemistry*, **2007**, 46, 2775-2786.
- [19] Gross, Z., Simkhovich, L., & Galili, N. *Chemical Communications*, **1999**, 599-600.
- [20] Liu, H., et al. *Coordination Chemistry Reviews*, **2013**, 257, 1306-1333.
- [21] Palmer, J. H. *Structure and Bonding*, **2012**, 142, 49-90
- [22] Zipp, C., et al. *South African Journal of Chemistry*, **2013**, 66, 158-166.
- [23] Giovannetti, R. *Macro to Nano Spectroscopy*. **2012**, 448.
- [24] Rothemund, P. *Journal of the American Chemical Society*, **1935**, 57, 2010 – 2011.
- [25] Assis, M. das D. & Smith, L. *Journal of the Chemical Society*, **1998**, 2, 2221-2226.
- [26] Paolesse, R., et al. *The Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66, 550-556.
- [27] Smith, M. B. & March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, **2007**, 6 ed., 2374.
- [28] Kadish, K. M., Smith, K. M. & Guilard, R. *The Porphyrin Handbook*, **2000**, 1 ed., 405.
- [29] Gryko, D. T. & Jadach, K. *The Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66, 4267-4275.
- [30] Littler, B. J., Ciringh, Y. e Lindsey, J. S. *The Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 64, 2864-2872.
- [31] Gryko, D. T. & Koszarna, B. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2003**, 1, 350-357.
- [32] Kral, V.; Vasek, P. e Dolensky, B. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **2004**, 69, 1126-1136

- [33] Koszarna, B. & Gryko, D. T. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 71, 3707-3717.
- [34] Pavia, L. D., et al. *Introduction to Spectroscopy*, **2008**, 752.
- [35] Skoog, D. A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, **2013**, 9 ed., 1072
- [36] Gouterman, M. *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, 6, 138-163.
- [37] Bursa, B., et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2016**, 18, 7216-7228.
- [38] Lakovicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Terceira Ed., **2006**, 954
- [39] Abdel-Kader, M. H. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. 1 Ed., **2014**, 312.
- [40] Aziz, S.A., et al. *Macromolecules Containing Metal and Metal-like Elements: Photophysics and Photochemistry of Metal-Containing Polymers*. Décima Ed., **2010**, 432.
- [41] Nijegorodov, N., et al. *Spectrochimica Acta Part A*, **2006**, 64, 1 – 5.
- [42] Kruk, M., et al. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2012**, 116, 10695-10703.
- [43] Macdonald, I. J. & Dougherty, T. J. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105 – 129.
- [44] Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. & Jain, R. K. *Nature*, **2003**, 3, 380 – 387.
- [45] Muller, J. P. & Wilson, J. P. *Seminars in Surgical Oncology*, **1995**, 11, 346 – 354.
- [46] Derosa, M. C. & Crutchley, R. J. *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233 – 234, 351 - 371.
- [47] Kruk, I. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Segunda Ed., **1998**, 264
- [48] Ribeiro, J. *Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinâmicos da Ftalocianina de Zinco em meios Homogêneo e Microheterogêneo*, Dissertação (Mestrado Química), **2003**, 119.
- [49] Wilkinson, F., Helman, P. W. & Ross, A. B. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **2009**, 24, 663 -1021.
- [50] Gonçalves, A. S. P. *Fotodegradação de espécies reativas de oxigênio induzida por fulerenos e derivados: um estudo por EPR e captura de spins* (Dissertação de mestrado), **2010**, 74.
- [51] Janzen, E. G. & Blackburn, B.J. *Journal of the American Chemical Society*, **1968**, 90, 5909-5910.
- [52] Gonçalves, A. S. P. *Fotodegradação de espécies reativas de oxigênio induzida por fulerenos e derivados: um estudo por EPR e captura de spins* (Dissertação de mestrado), **2010**, 74.
- [53] Bonnet, R. & Martínez, G. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9513 – 9547.
- [54] Agostinis, P., et al. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2011**, 61, 250 – 281.
- [55] Sternberg, E. & Dolphin, D. *Current Medicinal Chemistry*, **1996**, 3, 239-272.
- [56] Eggeling, C., et al. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2651-2659.
- [57] Smallwood, I. M. *Handbook of Organic Solvents Properties*, **1996**, 306.
- [58] Pivetta, R. C., et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2017**, 332, 306-315.
- [59] Ding, T. et al. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2005**, 109, 7411-7417.
- [60] Mohammed, A., et al. *Tetrahedron*, **2003**, 44, 2077-2079.
- [61] Montoya, M. M. & Janssen, R. A. J. *Advanced Functional Materials*, **2017**, 27, 1605779-1605791.

- [62] Würthner, F., Kaiser, T. E. & Saha-Möller, C. R. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 3376-3410.
- [63] Guzel, E. et al. *Inorganica Chimica Acta*, **2017**, 467, 169-176.
- [64] Ogunsipe, A. Chen, J. -Y. & Nyokong, T. *New Journal of Chemistry*, **2004**, 28, 822-827.
- [65] Shao, W., et al. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2012**, 116, 14228-14234.
- [66] Zhao, Q. et al. *Science China Chemistry*, **2016**, 6, 31339.
- [67] Zhao, H. et al. *Free Radical Biological Medicine*, **2001**, 31, 599.
- [68] Wang, L. S. H. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2020**, 390, 112283.
- [69] Barata, J. F. B., et al. *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51, 1537-1540.
- [70] Amao, Y., Miyashita, T. & Okura, I. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2001**, 107, 101-106.
- [71] Ventura, B. et al. *New Journal of Chemistry*, **2005**, 29, 1559-1566.
- [72] Shen, J., et al. *Inorganic Chemistry*, 2006, 45, 2251.
- [73] Guizado, T. R. C. Estudos Computacionais da Interação de Porfirinas e seus complexos de Ferro com Albumina Sérica Humana, Dissertação (Mestrado em Física), **2008**, 141.
- [74] Dockal, M., Carters, D. C. e Rüker, F. *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 29303-29310.
- [75] Pragna Lakshmi, T., et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2017**, 183, 90-102.
- [76] Sudlow, G., Birkett, D. J., e Wade, D. N. *Molecular Pharmacology*. **1975**, 11, 824 – 832.
- [77] Na, N., et al. *Molecules*, **2016**, 21, 1-14.
- [78] Chaves, O. A., et al. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2018**, 29, 1786-1795.
- [79] Ding, F. & Peng, W. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2016**, 18, 6595-6606.
- [80] Zhou, J. et al. *PLOS ONE*, **2015**, 10, 1-17.
- [81] Gauthler, T. D. et al. *Environmental Science & Technology*, **1986**, 20, 1162-1166.
- [82] Ferreira, R. C., et al. *Revista Virtual da Química*, **2018**, 10, 432-447.
- [83] Chaves, O. A., et al. *Molecules*, **2015**, 20, 19526-19539.
- [84] Ross, P. D. & Subramanian, S. *Biochemistry*, **1981**, 20, 3096-3102.
- [85] Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, **1996**, 1 ed., 738.
- [86] Woody, R. W. *Methods in Enzymology*, **1995**, 246, 34-71
- [87] Johnson Jr. W. C. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **1988**, 17, 145-166.
- [88] Wey, Y., Thyparambil, A. A., & Latour, R. A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **2014**, 1844, 2331-2337.
- [89] Zaidi, N., et al. *PLOS ONE*, **2013**, 1-12
- [90] Alisson, L. A. *Fundamental Molecular Biology*, **2007**, 725.
- [91] Boer, D. R., Canals, A. & Coll, M. *Dalton Transactions*, **2009**, 399-414.
- [92] Barra, C. V. & Netto, A. V. G. *Revista Virtual de Química*, **2015**, 7, 1998-2016

- [93] da Silva, M. P. *Síntese, Caracterização e Estudos Cinéticos de Complexos de Cobre (II) com Ligantes Triazínicos como Modelos Biomiméticos da Metaloenzima Catecol Oxidase*, Dissertação (Mestrado em Química), **2014**, 110.
- [94] Tuite, E., et al. *European Journal of Biochemistry*, **1997**, 243, 482-492.
- [95] Nafisi, S., et al. *Journal of Molecular Structure*, **2007**, 87, 35-43.
- [96] Biancardi, A., et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2013**, 4596-4603.
- [97] Prieto, D., et al. *Histochemistry and Cell Biology*, **2014**, 142, 335-345.
- [98] Na, N., et al. *Molecules*, **2016**, 21, 1-14.
- [99] Sohrabi, N. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2015**, 7, 533-537.
- [100] Wang, J., et al. *Applied Organometallic Chemistry*, **2016**, 1-12.
- [101] Liang, Z., et al. *The Journal of Membrane Biology*, **2016**, 249, 419-428.
- [102] Sayed M, Krishnamurthy B and Pal H. *Physical Chemistry Chemical. Physics*, **2016**, 18, 24642-24653.
- [103] Estandarte AK, Botchway S, Lynch C, Yusuf M and Robinson I. *Science Reports*, **2016**, 6, 31417.
- [104] Chaves, O. A., et al. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2017**, 28, 1229-1236.
- [105] Montalti, M., et al. *Handbook of Photochemistry*, 3rd ed. CRC Press, Taylor & Francis, **2006**.
- [106] Iglesias, B. A., et al. *Journal of Bioinorganic Chemistry*, **2015**, 153, 32-41.
- [107] Wang, N., et al. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2008**, 41, 589-595.
- [108] Wardell M, et al. *Biochemical Biophysical. Resarches. Communication*, **2002**, 291, 913-918.
- [109] Balaei, F. & Ghobadi, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2019**, 162, 1-8.
- [110] Ahmad, B., Parveen S. & Khan R.H. *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 1350–1356.
- [111] Rozinek, S.C. Thomas, R.J. & Brancalion, L. *Biochemical and Biophysics Reports*, **2016**, 7, 295–302
- [112] Chaves, O.A., et al. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2016**, 15, 1524-1535.
- [113] Wardell, M. et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 291, 913-918.
- [114] Dougherty, A.D. *Accounts of Chemical Research*, **2013**, 46, 885–893.
- [115] da Silveira C.H., et al. *Inorganic Chimica Acta*, **2018**, 482, 542-553.
- [116] Wang, J-M., et al. *Applied Organometallic Chemistry*, **2017**, 31, 1-12.
- [117] Sun, Y., et al. *Bioorganic Chemistry*, **2019**, 90, 1-10.