

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

Thiago Vargas Acunha

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
FOTODINÂMICA DE TETRA-MESÓ-[(PIRIDIL)PORFIRINA]
PLATINA(II) FRENTE À MICROORGANISMOS**

Santa Maria, RS
2017

Thiago Vargas Acunha

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE
TETRA-MESO-[(PIRIDIL)PORFIRINA]PLATINA(II) FRENTE À
MICROORGANISMOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

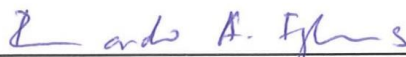
Santa Maria, RS
2017

Thiago Vargas Acunha

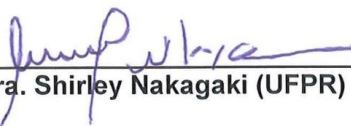
**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE
TETRA-MESO-[(PIRIDIL)]PORFIRINA]PLATINA(II) FRENTE À
MICROORGANISMOS**

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

Aprovado em 30/06/2017:



Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Profa. Dra. Shirley Nakagaki (UFPR)



Profa. Dra. Bárbara Tirloni (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Este trabalho se tornou possível graças a algumas pessoas que participaram direta ou indiretamente, durante o período no qual estive vinculado à Universidade Federal de Santa Maria, entre elas:

Ao professor e meu orientador Bernardo Almeida Iglesias, cujo idealizou este trabalho e com seu conhecimento, paciência, amizade e compreensão pôde me auxiliar no desenvolvimento do mesmo.

Ao professor Davi Fernando Back, o qual com seu conhecimento, atenção e dedicação se dispôs para tirar dúvidas e sugerir implementações ao meu trabalho sempre que precisei e quando foi necessário.

Ao professor Roberto Christ Vianna Santos e ao doutorando Leonardo Quintana Soares Lopes que se dispuseram a auxiliar o desenvolvimento deste trabalho com competência e conhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, que me auxiliou pela concessão de bolsa de estudos durante o mestrado.

Aos meus colegas de laboratório que sempre se dispuseram a tirar dúvidas sobre os mais diversos assuntos sempre com paciência e dedicação, e que com a amizade deles tornou este tempo de aprendizado muito mais prazeroso.

À minha família, meus pais Sérgio e Delcira e irmãos Fabrício e Bianca, pelo apoio recebido durante o período em que participei do mestrado.

E, principalmente, à minha noiva Danusa Bender, pessoa incrível, querida, amada, divertida e compreensiva, a qual eu devo meu enorme agradecimento por estar ao meu lado durante todos estes anos, sempre apoiando minhas decisões e me ajudando a tomar as melhores decisões para o rumo da minha vida.

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE TETRA-MESO-[(PIRIDIL)PORFIRINA]PLATINA(II) FRENTE À MICROORGANISMOS

AUTOR: Thiago Vargas Acunha

ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Este trabalho trata da síntese da Tetra-meso-[(3-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina (**3-H₂TPtPyP**) e Tetra-meso-[(4-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina (**4-H₂TPtPyP**), partindo de seus respectivos precursores Tetra-meso-(3-piridil)porfirina (**3-H₂TPyP**), Tetra-meso-(4-piridil)porfirina (**4-H₂TPyP**) e do complexo [Pt(bipy)Cl₂] para avaliação fotofísica e de suas propriedades fotodinâmicas frente a micro-organismos *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva). Para isto, os compostos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta e visível e do infravermelho, bem como suas propriedades fotofísicas como emissão, rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de geração de oxigênio singleto. Para a síntese, seguiu-se a metodologia já descrita por Naue e colaboradores (2009). De maneira geral, as porfirinas apresentaram satisfatória fotoestabilidade e bons rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto. Estas características são apreciáveis segundo os princípios da terapia fotodinâmica (PDT). Diferentemente dos experimentos realizados na ausência de luz, no qual as porfirinas não apresentaram atividade contra as bactérias, na presença de luz branca (26 mW cm⁻²) sob o tempo de 90 minutos de irradiação, foi possível observar satisfatória atividade, principalmente para as porfirinas tetracatiônicas **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**, as quais foram sete vezes mais eficientes contra *E. coli* e mais de três vezes mais eficazes contra *S. aureus*, quando comparadas com seus respectivos precursores. Além do efeito da carga, a presença dos complexos de Pt^{II} potencializou o efeito de fotoinativação dos micro-organismos estudados quando comparados com a porfirina tetrametilada (TMePyP), a qual também é tetracatiônica. Estes melhores resultados apresentados podem estar relacionados com as paredes celulares das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, que são negativamente carregadas devido a presença de grupos fosfatos e que podem facilitar a permeabilidade da porfirina para dentro da célula. Além disso, interações entre o fósforo e Pt^{II}, obedecendo a Teoria de Pearson, também podem influenciar na melhor assimilação das porfirinas tetraplatinadas para dentro da célula e, assim, obter menores concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínima (CBM).

Palavras-chave: Porfirinas de platina(II), Terapia Fotodinâmica, micro-organismos.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND EVALUATE OF PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF TETRA-MESO-[(PYRIDYL)PORPHYRINS]PLATINUM(II) AGAINST MICROORGANISMS

AUTHOR: Thiago Vargas Acunha

ADVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

This work deals with the synthesis of Tetra-meso-[(3-pyridyl)-chloro-2,2'-bipyridyl-platinum(II)]porphyrin (**3-H₂TPtPyP**) and Tetra-meso-[(4-pyridyl)-chloro-2,2'-bipyridyl-platinum(II)]porphyrin (**4-H₂TPtPyP**), starting from their respective precursors Tetra-meso-[(3-pyridyl)porphyrin (**3-H₂TPyP**), Tetra-meso-(4-pyridyl)porphyrin (**4-H₂TPyP**) and [Pt(bipy)Cl₂] complex to evaluate its photodynamic properties against *Escherichia coli* (Gram-negative bacterium) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive bacterium) microorganisms. For this, the compounds were characterized by elemental analysis, electronic spectroscopy in the UV-vis and infrared regions, as well as their photophysical properties by emission, fluorescence quantum yield and quantum yield of singlet oxygen generation. For the synthesis, it was followed the methodology proposed by Naue and co-workers (2009). In general, the porphyrins showed satisfactory photostability and good quantum yields of singlet oxygen generation values. These characteristics are appreciable under the principles of photodynamic therapy (PDT). Differently from the treatment realized in absence of light, in which the porphyrins were not active against the bacteria culture, in the presence of white light (26 mW cm⁻²) under the 90 minutes of irradiation, the porphyrins exhibited the satisfactory activity against studied microorganisms, mainly for the tetracationic porphyrins **3-H₂TPtPyP** and **4-H₂TPtPyP**, which were seven times more efficient against *E. coli* and more than three times more effective against *S. aureus* when compared to their respective precursors. In addition to the effect of the charge, a presence of the Pt^{II} complexes potentiated the photodynamic effect of the studied microorganisms when compared with a tetramethylated porphyrin (TMePyP), which is also tetracationic. These better results presented may be related to the cell walls of Gram-negative and Gram-positive bacteria, which are negatively charged due to the presence of phosphate groups and which may facilitate the permeability of porphyrin into the cell. Furthermore, interactions between phosphorus and Pt^{II}, obeying the Pearson's theory, may also influence the better assimilation of the tetraplatinated porphyrins into the cell and thus obtain lower minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC).

Keywords: Platinum(II) porphyrins, Photodynamic Therapy, microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação estrutural de um macrociclo tetrapirrólico.....	18
Figura 2 -	Espectros de absorção eletrônica de metaloporfirinas e porfirinas base-livre com as suas respectivas transições.....	23
Figura 3 -	Diagrama de Jablonski adaptado, destacando os processos e seus respectivos tempos pelos quais a energia pode ser dissipada. Na figura estão representados apenas os níveis energéticos e vibracionais, e entre parênteses estão os respectivos tempos de vida.....	24
Figura 4 -	Espectro de fluorescência característico de porfirinas.....	25
Figura 5 -	Representação estrutural da 4-H ₂ TPtPyP e 3-H ₂ TPtPyP.....	27
Figura 6 -	Espectros de UV-vis e de fluorescência apresentando a interação entre ZnTPPF ₁₆ (SPyPt) ₄ e ssDNA.....	29
Figura 7 -	Representação do alcance da luz através da pele em diferentes comprimentos de onda.....	31
Figura 8 -	Representação estrutural da molécula do Photofrin®.....	32
Figura 9 -	Mecanismo de ação em terapia fotodinâmica.....	34
Figura 10 -	Representação da distribuição eletrônica nos orbitais moleculares do oxigênio na forma de estado singleto ¹ Δ _g e ¹ Σ _g ⁺	35
Figura 11 -	Representação estrutural de porfirinas sintetizadas por Hu e colaboradores. Os contra-íons Cl ⁻ foram omitidos para melhor visualização.....	39
Figura 12 -	Representação estrutural da parede celular de bactérias <i>Gram</i> -positivas.....	40
Figura 13 -	Representação estrutural da parede celular de bactérias <i>Gram</i> -negativas.....	41
Figura 14 -	Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Alves e colaboradores.....	42
Figura 15 -	Representação da metodologia para determinar CIM e CBM.....	46
Figura 16 -	Espectros de infravermelho das porfirinas sintetizadas e do complexo [Pt(bipy)Cl ₂].....	51
Figura 17 -	Espectro na região do UV-vis das porfirinas 4-H₂TPyP , 3-H₂TPyP , 4-H₂TPtPyP e 3-H₂TPtPyP , em solução de DMSO.....	53
Figura 18 -	Espectros de emissão das porfirinas 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP e 4-H₂TPtPyP em DMSO, onde λ _{exc} = 587 nm.....	56
Figura 19 -	Tempos de vida de fluorescência das porfirinas 3-H₂TPtPyP e 4-H₂TPtPyP	56
Figura 20 -	Espectro de absorção eletrônica, apresentando o comprimento de onda selecionado para excitação para geração de oxigênio singleto.....	58
Figura 21 -	Espectro de emissão do oxigênio singleto gerado pelas porfirinas, comparado com o padrão de referência azul de metileno (MB).....	58
Figura 22 -	Ensaio de fotoestabilidade via espectroscopia na região do UV-vis da porfirina 3-H₂TPtPyP , em DMSO, quando irradiada com laser em 417 nm e 587 nm.....	61
Figura 23 -	Ensaio de fotoestabilidade via espectroscopia na região do UV-vis da porfirina 4-H₂TPtPyP , em DMSO, quando irradiada com laser em 417 nm e 587 nm.....	61
Figura 24 -	Gráfico comparativo dos ensaios de fotoestabilidade para a 3-H₂TPtPyP e a 4-H₂TPtPyP em atmosfera ambiente e atmosfera inerte (N ₂) após irradiação em 417 nm.....	62

Figura 25 -	Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>E. coli</i> após o tratamento com as porfirinas sintetizadas e a TMePyP, na ausência de luz.....	65
Figura 26 -	Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>S. aureus</i> após o tratamento com as porfirinas sintetizadas e a TMePyP, na ausência de luz.....	65
Figura 27 -	Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>E. coli</i> após o tratamento com as porfirinas, na presença de luz branca (26 mW cm ⁻²).....	66
Figura 28 -	Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL ⁻¹) de <i>S. aureus</i> após o tratamento com as porfirinas, na presença de luz branca (26 mW cm ⁻²).....	66
Figura 29 -	Contagem de colônias de <i>E. coli</i> , após 90 minutos de tratamento na ausência de luz (A) e sob irradiação (26 mW cm ⁻²) (B). Manchas brancas em (B) foram consideradas contaminações, visto que o tamanho das colônias difere dos presentes em (A).....	67
Figura 30 -	Contagem de colônias de <i>S. aureus</i> , após 90 minutos de tratamento na ausência de luz (A) e sob irradiação (26 mW cm ⁻²) (B).....	67

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Representação geral da rota de síntese das porfirinas 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP e 4-H₂TPtPyP	16
Esquema 2 -	Rota sintética geral de tetra- <i>meso</i> -(fenil)porfirina, proposta por Rothemund.....	19
Esquema 3 -	Rota sintética geral de tetra- <i>meso</i> -(fenil)porfirina, proposta por Adler e Longo.....	20
Esquema 4 -	Rota sintética geral de tetra- <i>meso</i> -(fenil)porfirina, proposta por Lindsey e colaboradores.....	20
Esquema 5 -	Mecanismo proposto para síntese de porfirinas tetra- <i>meso</i> -substituídas.....	21
Esquema 6 -	Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Lourenço e colaboradores.....	28
Esquema 7 -	Esquema reacional da obtenção de Pt ^{II} -porfirinas, relatadas por Oliveira e colaboradores.....	29
Esquema 8 -	Representação da reação entre DPBF e ¹ O ₂ , formando 1,2-dibenzilbenzina.....	36
Esquema 9 -	Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Naik e colaboradores.....	38
Esquema 10 -	Rota sintética para síntese da 4-H₂TPyP	47
Esquema 11 -	Rota sintética para síntese da 3-H₂TPyP	48
Esquema 12 -	Rota sintética para síntese da 4-H₂TPtPyP	49
Esquema 13 -	Rota sintética para síntese da 3-H₂TPtPyP	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais estiramentos e deformações, em número de onda (cm^{-1}) para as porfirinas 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP , 4-H₂TPtPyP e o complexo [Pt(bipy)Cl ₂].....	52
Tabela 2 - Transições eletrônicas (nm) e absorvidades molares ($\log \epsilon$) para as porfirinas 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP e 4-H₂TPtPyP em DMSO.....	54
Tabela 3 - Dados fotofísicos obtidos para as porfirinas sintetizadas, em $\lambda_{\text{exc}} = 587 \text{ nm}$	55
Tabela 4 - Rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto obtido para os compostos 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP e 4-H₂TPtPyP calculado utilizando azul de metileno (MB) como padrão ($\phi_{\Delta} = 0,52$).....	59
Tabela 5 - Coeficientes de fotobranqueamento das porfirinas após irradiações na Banda Soret (417 nm) e Banda Q (587 nm).....	62
Tabela 6 - CIM e CBM para a 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP , 4-H₂TPtPyP e TMePyP em testes realizados na ausência de luz.....	63
Tabela 7 - CIM e CBM para a 3-H₂TPyP , 4-H₂TPyP , 3-H₂TPtPyP , 4-H₂TPtPyP e TMePyP em testes realizados na presença de luz branca (26 mW cm^{-2}).....	64

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Cálculo para determinar o rendimento quântico de fluorescência.....	25
Equação 2 -	Cálculo para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete.....	35
Equação 3 -	Cálculo para determinar o rendimento quântico de oxigênio singlete.....	36
Equação 4 -	Equação para determinar o coeficiente de absorvidade molar...	44
Equação 5 -	Equação para determinar o coeficiente de fotobranqueamento...	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO	Espécies reativas de oxigênio
3-H ₂ TPyP	Tetra- <i>meso</i> -(3-piridil)porfirina
4-H ₂ TPyP	Tetra- <i>meso</i> -(4-piridil)porfirina
3-H ₂ TPtPyP	Tetra-hexafluorofosfato de tetra- <i>meso</i> -[(3-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina
4-H ₂ TPtPyP	Tetra-hexafluorofosfato de tetra- <i>meso</i> -[(4-piridil)-cloro-2,2'-bipiridil-platina(II)]porfirina
UV-vis	Ultravioleta-visível
IV	Infravermelho
DCM	Diclorometano
TFA	2,2,2-ácido trifluoracético
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
PDT	Terapia fotodinâmica
DMA	9,10-dimetilantraceno
DPBF	1,3 – difenilisobenzofurano
Φ_{Δ}	rendimento quântico de oxigênio singleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração mínima inibitória para 50% de uma população
ICP-MS	Plasma Indutivamente Acoplado-Espectrometria de Massas
EDTA	Ácido dietilenodiamino tetra-acético
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
BHI	Brain heart infusion
UFC	Unidades formadoras de colônia
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
CLSI	Instituto de padrões laboratoriais e clínicos
MLCT	Transferência de carga metal-ligante
τ_f	Tempo de vida de fluorescência
MeOH	Metanol
Φ_{FB}	Coefficiente de fotobranqueamento
TMePyP	Tetra- <i>meso</i> -(4-metilpiridil)porfirina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS GERAIS.....	16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
2	DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.1	Porfirinas.....	18
2.1.1.1	Aspectos gerais.....	18
2.1.1.2	Metodologia para síntese de porfirinas.....	19
2.1.1.3	Propriedades eletrônicas e fotofísicas.....	22
2.1.1.3.1	Espectroscopia eletrônica região do UV-vis.....	22
2.1.1.3.2	Espectroscopia de luminescência.....	23
2.1.1.4	Piridil-porfirinas coordenadas a complexos de Pt ^{II}	26
2.1.2	Terapia Fotodinâmica.....	30
2.1.2.1	Aspectos gerais.....	30
2.1.2.2	Fotosensibilizadores.....	31
2.1.2.3	Espécies reativas de oxigênio.....	33
2.1.2.4	Interação com biomoléculas.....	37
2.1.2.5	Fotoinativação de micro-organismos.....	39
2.2	SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	43
2.2.1	Material e métodos.....	43
2.2.1.1	Reagentes.....	43
2.2.1.2	Análise elementar.....	43
2.2.1.3	Espectroscopia na região do infravermelho.....	43
2.2.1.4	Espectroscopia eletrônica na região do UV-vis.....	43
2.2.1.5	Estudos fotofísicos das porfirinas.....	44
2.2.1.6	Micro-organismos.....	45
2.2.1.7	Ensaio de atividade fotodinâmica.....	45
2.2.2	Sínteses.....	47
2.2.2.1	Síntese da Tetra- <i>meso</i> -(4-piridil)porfirina (4-H₂TPyP).....	47
2.2.2.2	Síntese da Tetra- <i>meso</i> -(3-piridil)porfirina (3-H₂TPyP).....	48
2.2.2.3	Síntese da Tetra- <i>meso</i> -[(4-piridil)-cloro-(2,2'-bipiridil)-platina(II)]porfirina (4-H₂TPtPyP).....	49
2.2.2.4	Síntese da Tetra- <i>meso</i> -[(3-piridil)-cloro-(2,2'-bipiridil)-platina(II)]porfirina (3-H₂TPtPyP).....	50
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
2.3.1	Espectroscopia na região do infravermelho.....	51
2.3.2	Espectroscopia eletrônica na região do UV-vis.....	53
2.3.3	Propriedades fotofísicas.....	54
2.3.3.1	Fluorescência.....	54
2.3.3.2	Rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}).....	57
2.3.3.3	Fotoestabilidade.....	59
2.3.4	Fotoinativação de micro-organismos.....	63
2.3.4.1	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.....	63
2.3.4.2	Curva de viabilidade celular.....	65
3	CONCLUSÃO.....	68
4	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69

5	REFERÊNCIAS.....	70
6	ARTIGOS PUBLICADOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

Porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos que estão presentes em diversos sistemas biológicos e desempenham funções específicas nestes sistemas, como é o caso da hemoglobina (transporte de oxigênio), clorofila (captação de energia luminosa), citocromo P450 (detoxificação), entre outros [1]. Os quatro pirróis estão conectados por pontes com carbonos metilênicos (CH) (Esquema 1) [2].

Após a síntese e comprovação da existência da *heme* realizada por Hans Fischer em 1929, novas metodologias sintéticas foram propostas como a de Rothmund em 1935 [3], a de Adler e Longo em 1964 [4] e a de Lindsey e colaboradores em 1986 [5], nas quais o produto reacional final consistia de porfirinas tetra-*meso*-substituídas.

Porfirinas são, em geral, estudadas para se conhecer suas propriedades eletrônicas, químicas e fotofísicas para diferentes fins como, por exemplo, interação com DNA, mimetização de moléculas fotossintéticas, terapia fotodinâmica, entre outros [6, 7, 8].

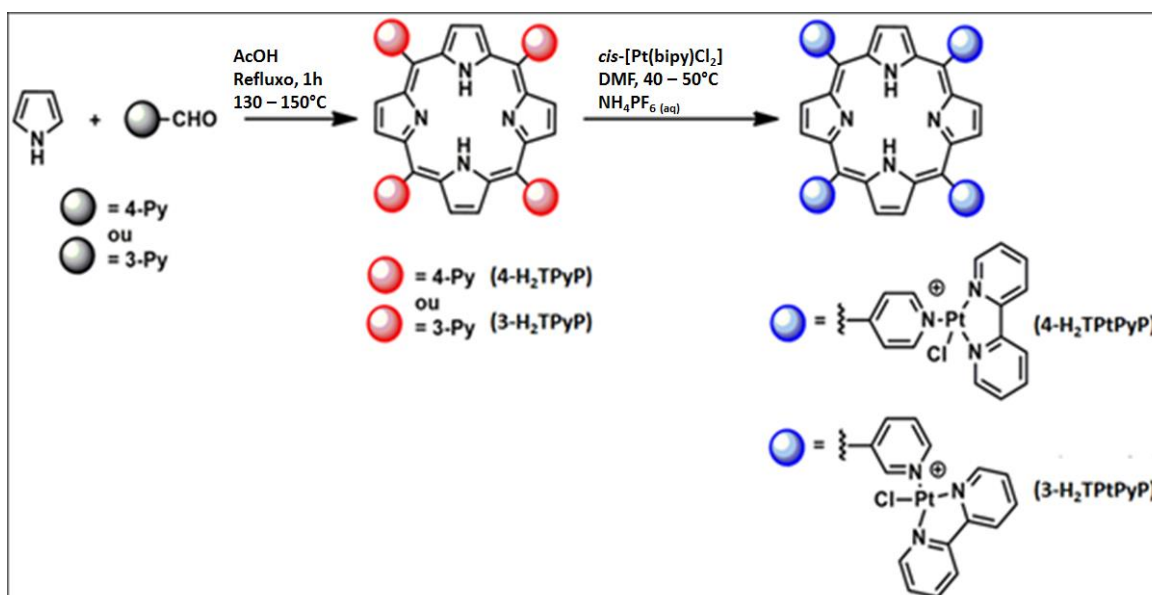
A investigação a respeito da interação de complexos de platina(II) com biomoléculas começou quando Barnet Rosenberg descobriu o potencial uso da cisplatina ($[Pt(NH_3)_2Cl_2]$) na interrupção da divisão celular de micro-organismos [9]. Desde então, foi comprovado que a cisplatina apresenta bons resultados contra câncer de testículo. Entretanto, sua utilização causa efeitos indesejáveis ao paciente como problemas renais, hepáticos e neurotóxicos, e faz com que alternativas sejam pesquisadas a fim de se obter resultados semelhantes e menores efeitos deletérios. Estas alternativas envolvem, basicamente, complexos de platina(II) [10, 11, 12].

O princípio da terapia fotodinâmica é utilizar uma molécula fotosensibilizadora, oxigênio molecular e luz para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) capazes de oxidar biomoléculas. Para isso ocorrer, é necessário que o fotosensibilizador seja excitado pela luz e possa alcançar o estado tripleto por um cruzamento intersistemas e, assim, gerar tais espécies [13, 14].

Neste trabalho, tetra-*meso*-(piridil)porfirinas coordenadas a complexos bipyridínicos de Pt^{II} ($[Pt(bipy)Cl]^+$) (Esquema 1) foram sintetizadas seguindo a metodologia proposta por Naue e colaboradores, em 2009 [15]. Estas porfirinas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas e fotofísicas, e utilizadas

para avaliar a atividade fotodinâmica frente a micro-organismos como *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), bactérias que podem causar problemas de saúde como infecções de pele, pneumonia, artrite séptica, diarreia, vômitos, dores abdominais e infecção urinária [16, 17, 18].

Esquema 1 - Representação geral da rota de síntese das porfirinas **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**.



1.1. OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar tetra-*meso*-(piridil)porfirinas coordenadas a complexos biperidínicos de Pt^{II}, caracterizá-las mediante técnicas espectroscópicas e fotofísicas, e avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos frente às bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar os compostos tetra-*meso*-(4-piridil)porfirina (**4-H₂TPyP**), tetra-*meso*-(3-piridil)porfirina (**3-H₂TPyP**), tetra-hexafluorofosfato de tetra-*meso*-[(4-piridil)-cloro-2,2'-biperidil-platina(II)]porfirina (**4-H₂TPtPyP**) e o tetra-hexafluorofosfato de tetra-*meso*-[(3-piridil)-cloro-2,2'-biperidil-platina(II)]porfirina (**3-H₂TPtPyP**).

Caracterizar os compostos sintetizados a partir de técnicas como análise elementar, espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta/visível (UV-vis) e infravermelho (IV), além de estudar suas propriedades fotofísicas fluorescência, rendimentos quânticos de fluorescência, tempos de vida de fluorescência, fotoestabilidade e rendimento quântico geração de oxigênio singleto.

Avaliar a atividade fotodinâmica sobre os micro-organismos *E. coli* (*Gram*-negativa) e *S. aureus* (*Gram*-positiva), observando qual o efeito que a presença de cargas e de complexos de Pt^{II} na periferia do anel porfirínico causa à atividade fotodinâmica.

2. DESENVOLVIMENTO

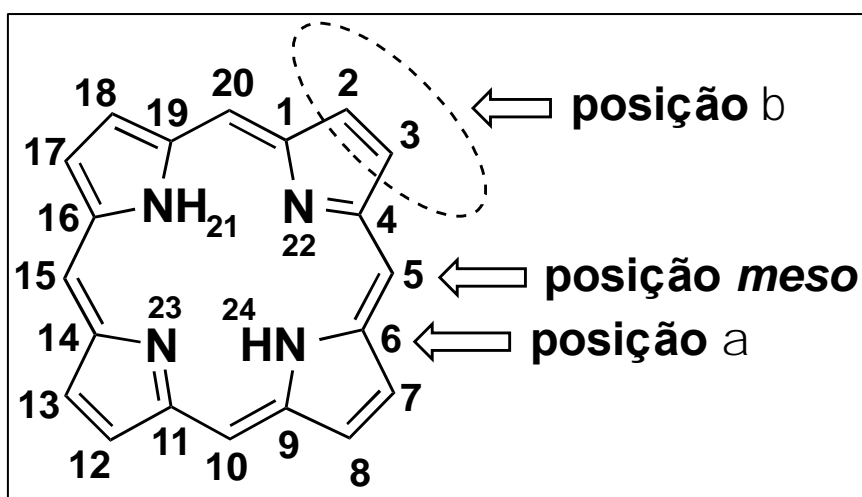
2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1. Porfirinas

2.1.1.1. Aspectos gerais

Porfirinas são moléculas compostas por quatro anéis pirrólicos conjugados e conectados entre si por pontes do tipo metino (CH) (Figura 1) [2]. Seu nome deriva de *porphura*, palavra grega que se refere a cor púrpura, característica deste tipo de molécula. A primeira estrutura de uma porfirina foi proposta por Küster em 1912, porém por ser um grande anel macrocíclico, acreditou-se não ser suficientemente estável. Em 1929, Hans Fischer e colaboradores sintetizaram a *heme*, porfirina complexada com íon Fe^{II} , comprovando a sua existência [2].

Figura 1 - Representação estrutural de um macrociclo tetrapirrólico [2].



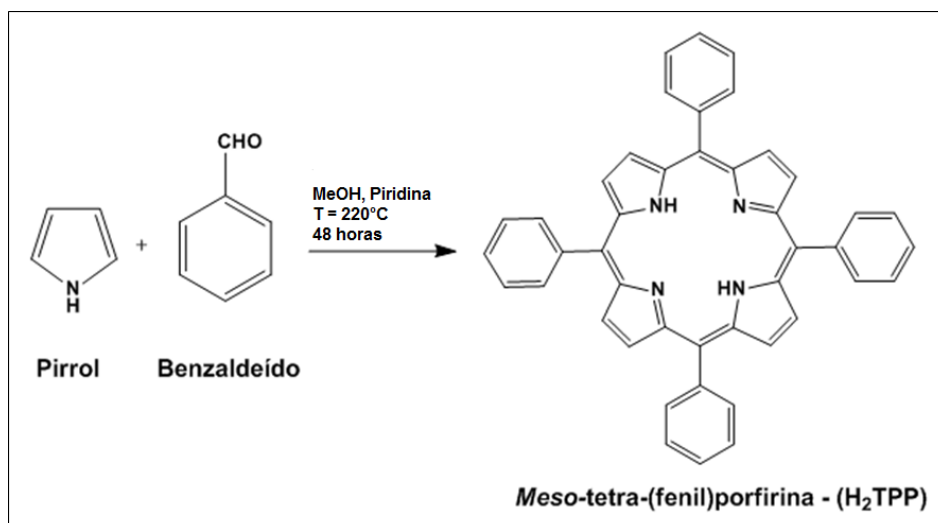
Fonte: Adaptado de Milgrom, 1997, p. 9.

Porfirinas são altamente conjugadas e seus 18 elétrons π deslocalizados conferem aromaticidade de acordo com a Regra de Hückel ($4n + 2$ elétrons π). Estas características permitem que porfirinas sejam relativamente estáveis, além de serem moléculas relativamente planares [2,19, 20].

2.1.1.2. Metodologias para síntese de porfirinas

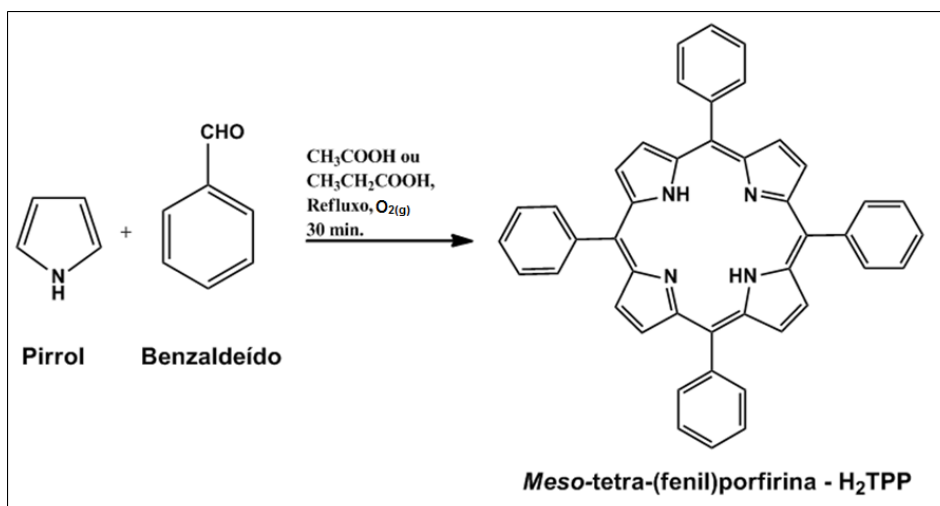
Após a síntese da *heme* realizada por Fischer e colaboradores, em 1929, novas metodologias sintéticas de porfirinas foram relatadas. Em 1935, Rothmund propôs uma rota sintética para a obtenção de porfirinas *meso*-substituídas, partindo de unidades de pirrol e benzaldeído (Esquema 2). As condições experimentais envolviam a utilização de metanol como solvente, além de pequenas quantidades de piridina, em refluxo, por 48 horas reacionais [3, 21]. O rendimento experimental obtido era aproximadamente 9%. Contudo, a metodologia apresentava 5% de clorina como impureza.

Esquema 2 - Rota sintética geral de tetra-*meso*-(fenil)porfirina, proposta por Rothmund [3].



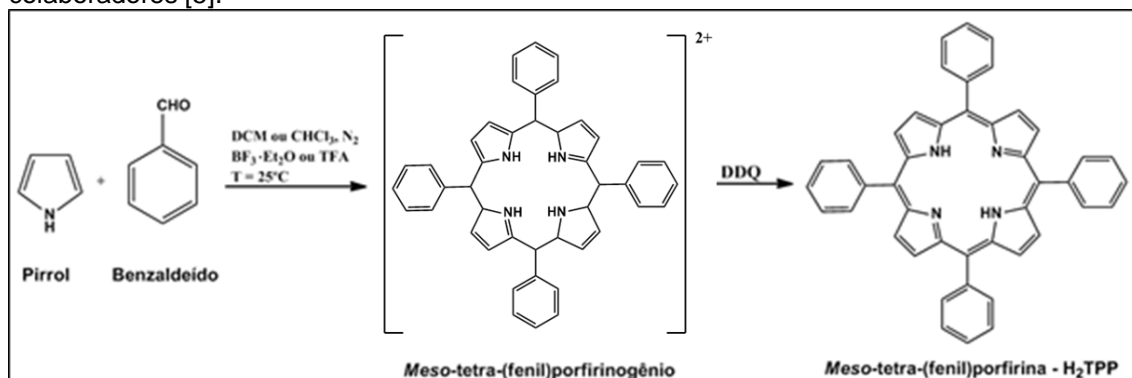
Fonte: Adaptado de Kadish, Smith e Guillard, 1999, p. 47.

Com o objetivo de complementar a metodologia de Rothmund, Adler e Longo, em 1964, propuseram uma metodologia sintética na qual utilizava-se meio ácido (ácido propanoico ou ácido acético), além do tempo reacional reduzido (30 minutos), sob refluxo em atmosfera ambiente (Esquema 3). Estas modificações possibilitaram um aumento no rendimento para 20% e de contaminações com clorina entre 5 e 10% [4]. Entretanto, esta metodologia apresentava algumas limitações como a impossibilidade de se atingir o rendimento descrito pelos autores, além da incapacidade de se obter o produto desejado quando se utilizava outros grupos funcionais ligados ao aldeído [21].

Esquema 3 - Rota sintética geral de tetra-*meso*-(fenil)porfirina, proposta por Adler e Longo [4].

Fonte: Adaptado de Adler, Longo e Shergalis, 1964, p. 3145.

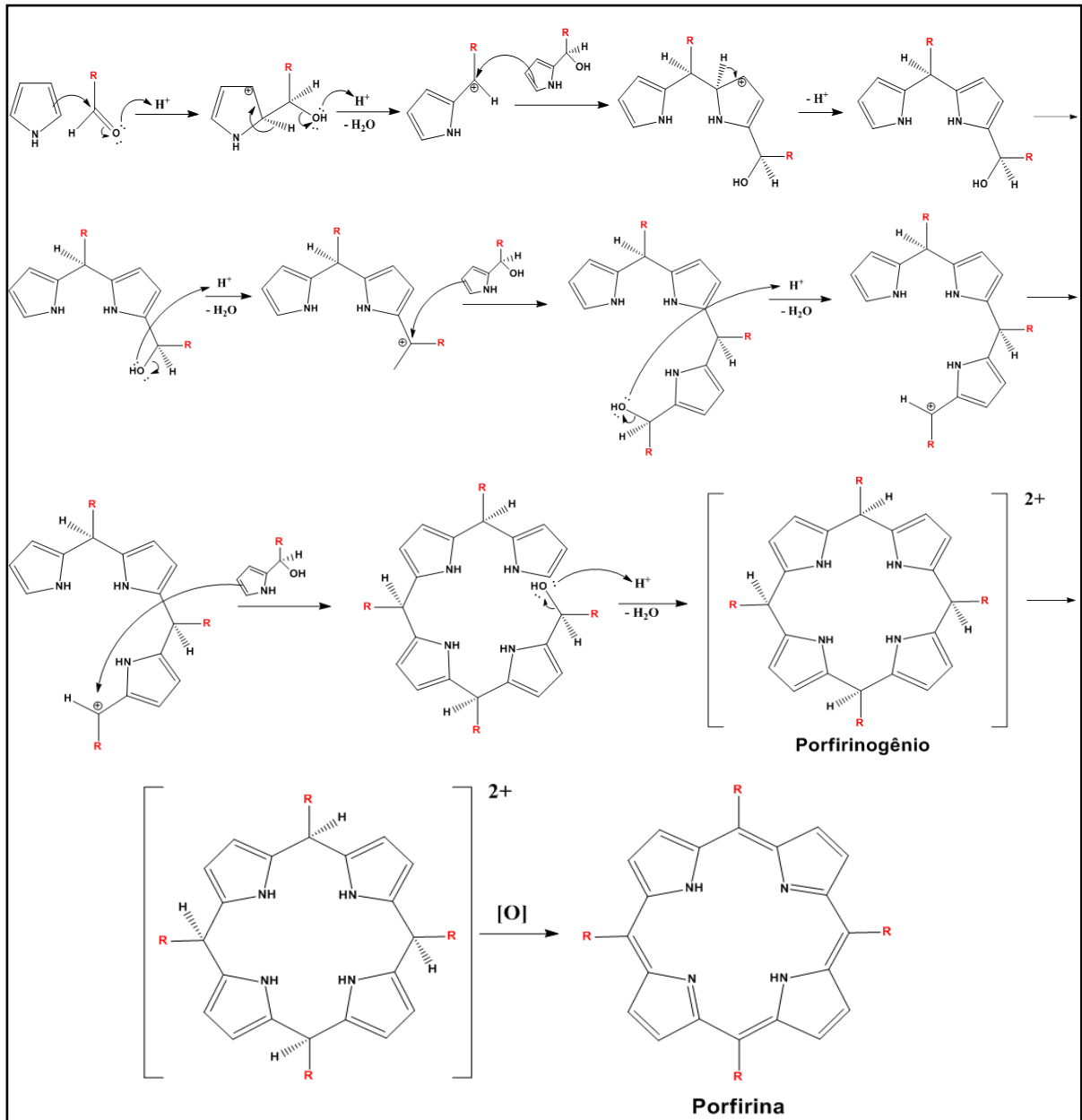
Em 1986, Lindsey e colaboradores propuseram uma nova metodologia para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas na qual ocorre em duas etapas (Esquema 4). A primeira etapa envolve a reação entre pirrol e benzaldeído, em diclorometano (DCM) ou clorofórmio ($CHCl_3$), na presença de 2,2,2-ácido trifluoracético (TFA) ou eterato de trifluoreto de boro ($BF_3 \cdot Et_2O$) como ácido de Lewis, sob temperatura ambiente, produzindo um intermediário conhecido como porfirinogênio. Na etapa seguinte, um agente oxidante, geralmente 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), é utilizado para oxidar o porfirinogênio, produzindo a tetra-*meso*-(fenil)porfirina. O rendimento experimental relatado pelos autores foi de, aproximadamente, 45%. A escolha por esta metodologia visa uma síntese com condições experimentais mais brandas [5].

Esquema 4 - Rota sintética geral de tetra-*meso*-(fenil)porfirina, proposta por Lindsey e colaboradores [5].

Fonte: Adaptado de Lindsey, Schreiman e Hsu, 1964, p. 4970.

A representação do possível mecanismo para a síntese de porfirinas, reagindo aldeído e pirrol, em meio ácido, para produzir porfirinas tetra-*meso*-substituídas é apresentado no Esquema 5 [22].

Esquema 5 - Mecanismo proposto para síntese de porfirinas tetra-*meso*-substituídas [22].



Fonte: Adaptado de Iglesias, 2012, p 38.

2.1.1.3. Propriedades eletrônicas e fotofísicas

2.1.1.3.1 Espectroscopia eletrônica região do UV-vis

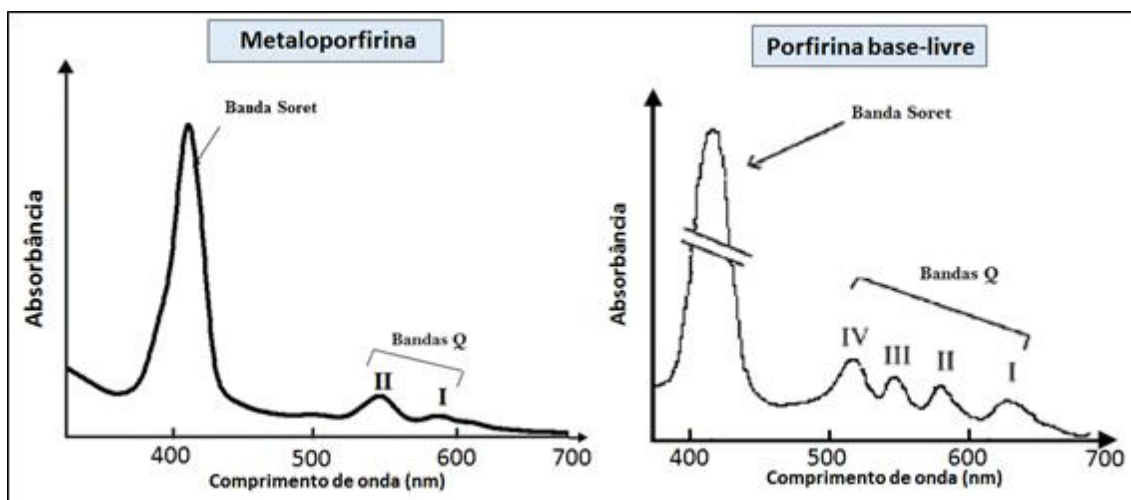
Tanto porfirinas base-livre quanto porfirinas coordenadas a centros metálicos no interior do anel porfirínico apresentam um perfil característico quanto ao seu espectro de absorção eletrônica na região do ultravioleta/visível. O espectro de absorção de porfirinas pode ser explicado pela Teoria dos Quatro Orbitais Moleculares de Fronteira, proposta por Gouterman (1961) [23]. De acordo com esta teoria, as bandas de absorção surgem de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ entre dois orbitais HOMO e dois orbitais LUMO, com orbitais HOMO caracterizados como orbitais de simetria a_{1u} e a_{2u} e os orbitais LUMO com simetria e_g .

Para porfirinas metaladas, com simetria D_{4h} , as transições ocorrem ao longo dos eixos X e Y equivalentes. Sendo assim, há o surgimento de uma transição de alta intensidade ($\epsilon > 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), conhecida como banda Soret, entre 400 e 430 nm, e duas transições de baixa intensidade ($\epsilon < 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), nomeadas bandas Q, entre 500 e 700 nm. (Figura 2) [23].

A ausência de centros metálicos coordenados na cavidade do anel porfirínico reduz a sua simetria para D_{2h} . Nesta simetria, os componentes nos eixos X e Y deixam de ser equivalentes e, sendo assim, as transições referentes as bandas Q se dividem em outras duas transições em direção aos respectivos eixos, chamadas de $Q_{x(0-0)}$, $Q_{x(0-1)}$, $Q_{y(0-0)}$ e $Q_{y(0-1)}$ (Figura 2) [23].

A transição referente à banda Soret é permitida por *spin* e as bandas Q são proibidas por *spin*. A existência das bandas Q no espectro eletrônico é explicada pelas transições relativas aos níveis vibracionais da molécula. Além disso, é possível observar um deslocamento batocrômico na transição relativa a banda Soret quando a metaloporfirina e a porfirina base-livre são comparadas [23, 24].

Figura 2 – Espectros de absorção eletrônica de metaloporfirinas e porfirinas base-livre com as suas respectivas transições [25, 26].



Fonte: Adaptado de Faria de Sales e Mansur, 2009, p. 689. e Manton e colaboradores, 2014, p. 3579.

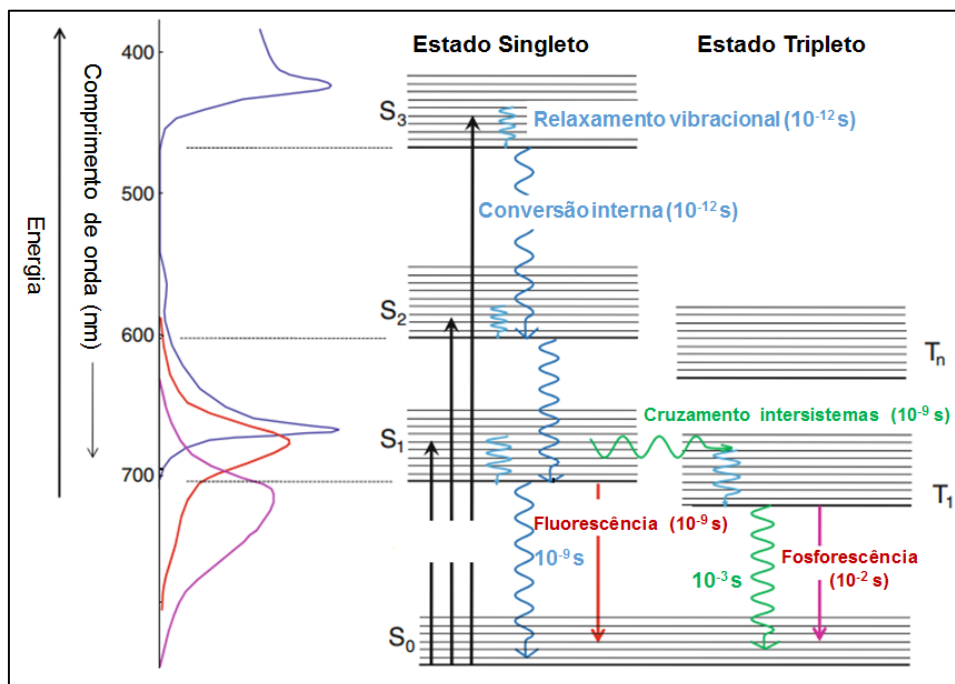
2.1.1.3.2 Espectroscopia de luminescência

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 [27]. Naturalmente, as espécies químicas podem ser encontradas, principalmente, em dois estados diferentes: singlete e tripleto. Os estados singlete e tripleto se referem à multiplicidade de *spin* dos elétrons [13].

No estado singlete, 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. Naturalmente, espécies que apresentam número par de elétrons apresentam-se no estado singlete, com exceção do oxigênio molecular (O_2), que se encontra no estado tripleto, no qual a distribuição eletrônica nos orbitais moleculares degenerados do tipo π antiligantes apresenta um elétron por orbital, seguindo a Regra de Hund [13, 28].

O diagrama de Jablonski adaptado (Figura 3) apresenta os principais caminhos para o retorno de uma espécie excitada ao seu estado fundamental.

Figura 3 - Diagrama de Jablonski adaptado, destacando os processos e seus respectivos tempos pelos quais a energia pode ser dissipada. Na figura estão representados apenas os níveis energéticos e vibracionais, e entre parênteses estão os respectivos tempos de vida [13].

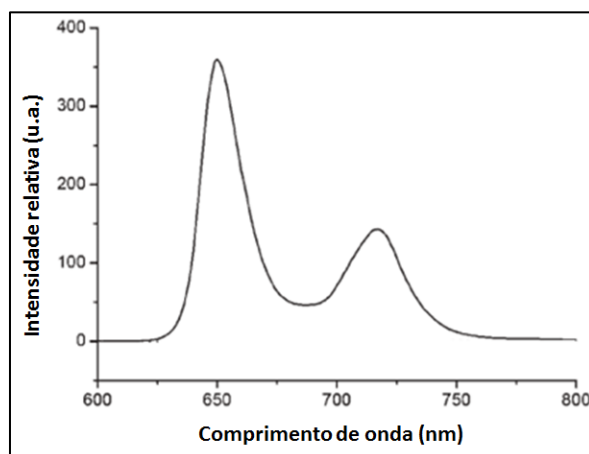


Fonte: Adaptado de Abdel-Kader, 2014, p. 36.

Se ocorrer uma desativação do estado S₁ ao estado S₀ diretamente, pode haver a emissão luminescente, conhecido como fluorescência. Essa emissão, de acordo com a Regra de Kasha [29], corresponde a transições entre o estado excitado de menor energia para o estado fundamental, mais precisamente entre os estados vibracionais 0, do estado excitado, para o estado vibracional 0 e 1 do nível menos energético.

Sendo assim, de modo geral, porfirinas ao serem excitadas em qualquer uma de suas bandas de absorção eletrônica (banda Soret ou bandas Q), emitem intensamente na região do vermelho, apresentando, de maneira característica, duas bandas de emissão fluorescente entre 600 - 750 nm (Figura 4) [22].

Figura 4 – Espectro de fluorescência de porfirinas [30].



Fonte: Adaptado de Maestrin e colaboradores, 2004, p. 712.

Uma molécula que apresente fluorescência pode ter seu rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) calculado. Este cálculo envolve a comparação com uma espécie tratada como referência, como por exemplo, a tetra-*meso*-(fenil)porfirina ($\lambda_{exc} = 420$ nm; $\Phi_F = 0,10$ em DCM) [31], e pode ser representada pela equação a seguir:

Equação 1 – Cálculo para rendimento quântico de fluorescência [22].

$$\Phi_x = \Phi_p \cdot \frac{\text{int}(x)}{\text{abs}(x)} \cdot \frac{\text{abs}(p)}{\text{int}(p)} \cdot \frac{n^2(p)}{n^2(x)}$$

Fonte: Adaptado de Iglesias, 2012, p. 76.

Φ_x e Φ_p correspondem aos rendimentos quânticos de fluorescência da amostra e do padrão, respectivamente. **int (x)** e **int (p)** são as integrais das áreas das bandas de fluorescência da amostra e do padrão, **abs (x)** e **abs (p)** são valores relativos a absorvância da amostra e padrão no respectivo λ_{exc} , e n^2 é o quadrado do índice de refração de cada solvente no qual se encontram a amostra e o padrão. Se o solvente for o mesmo para as duas espécies, este último termo é desconsiderado da equação, pois $n^2(p) = n^2(x)$.

Entretanto, a molécula ainda pode alcançar o estado tripleto. Para isto, é necessário que os estados singleto e tripleto tenham energias semelhantes e possam se sobrepor. Isto pode ser alcançado por efeito de algum campo

magnético presente. Embora a luz produza campo magnético, ela é fraca para induzir eficientemente a transição entre os estados singleto e tripleto. Contudo, uma perturbação intramolecular conhecida como acoplamento *spin*-órbita pode causar a sobreposição dos estados. 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 singleto 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 pesados (com alta densidade eletrônica). 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 os tempos de vida de fluorescência devido a inversão de *spin* necessária para retorno ao estado fundamental [13, 32, 33].

2.1.1.4. Piridil-porfirinas coordenadas a complexos de Pt^{II}

Investigações envolvendo complexos de Pt^{II} e biomoléculas começou quando Barnett Rosenberg descobriu o potencial uso da cisplatina (*cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$) na inibição da divisão celular [9]. À esta molécula foram atribuídas propriedades anticancerígenas devido a sua interação com as bases nitrogenadas (preferencialmente com a guanina) do DNA, promovendo uma distorção na conformação natural do mesmo, levando a uma morte celular programada (apoptose) [34].

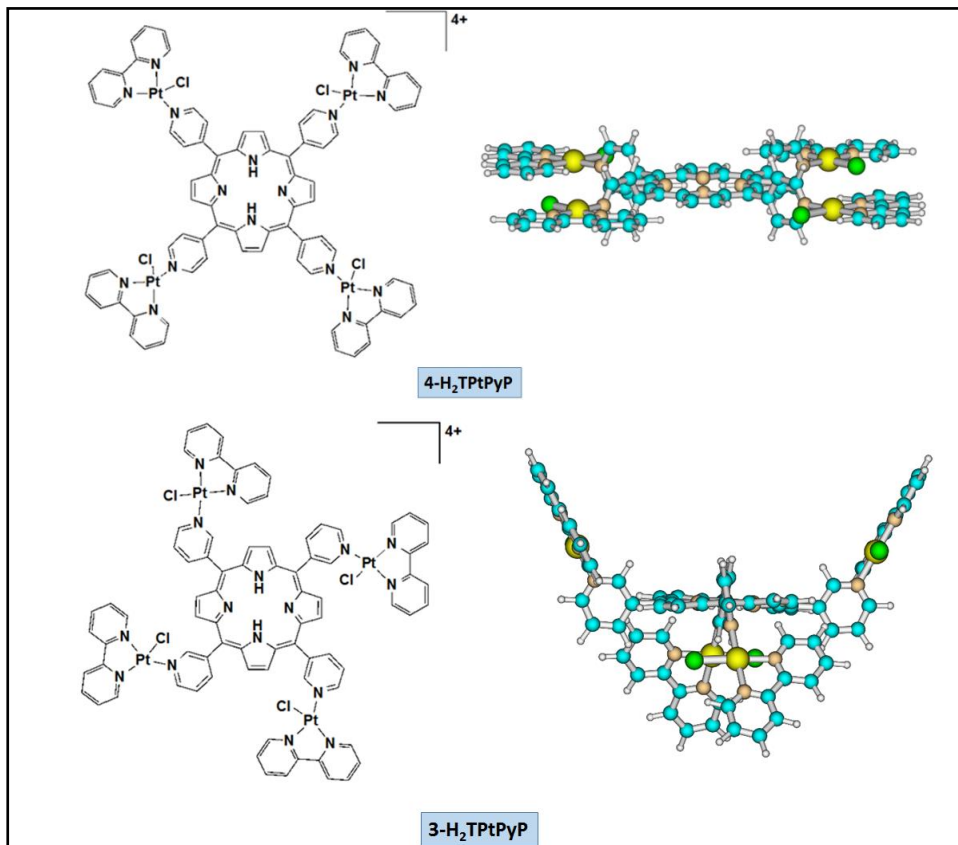
Entretanto, apesar de apresentar características antitumorais, a cisplatina promove efeitos indesejáveis ao paciente como náuseas, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, entre outros [11]. Esses efeitos se devem aos meios pelos quais este composto pode ser desativado pelo organismo como a interação da Pt^{II} com átomos presentes (enxofre, geralmente) em sítios ativos de algumas proteínas intra (metalotioneína, glutatona, entre outros) e extracelulares (albumina). Estas interações podem ser esclarecidas pela Teoria de Pearson, a qual explica a estabilidade de ligações de acordo com o tamanho dos átomos [35]. A interação entre Pt^{II} e enxofre pode ocasionar em interações estáveis, impossibilitando que cisplatina interaja com o DNA. Outro fato é que a cisplatina não interage somente

com células cancerígenas, mas também com células saudáveis, causando os efeitos indesejáveis já mencionados [10, 36].

Estes efeitos indesejáveis estimularam a comunidade científica na busca por alternativas, entre elas envolvendo estruturas análogas a cisplatina. A seletividade de porfirinas a tumores aliada a capacidade de interação com o DNA proveniente de complexos de Pt^{II} surge como uma proposta atrativa para pesquisadores [8, 10].

A interação de piridil-porfirinas coordenadas a complexos de Pt^{II} com o DNA foi pesquisada por Naue e colaboradores (2009) [15]. Os autores sintetizaram moléculas isômeras na qual diferenciavam entre si pela posição do nitrogênio no grupo piridina ligado às posições *meso* da porfirina. Esta disparidade ocasionou em conformações diferentes: enquanto a 4-H₂TPtPyP apresenta conformação praticamente planar, a 3-H₂TPtPyP apresenta conformação conhecida como “saddle”, no qual dois *meso*-substituintes estão acima e outros dois estão abaixo do anel porfirínico (Figura 5)

Figura 5 – Representação estrutural da 4-H₂TPtPyP e 3-H₂TPtPyP [15].

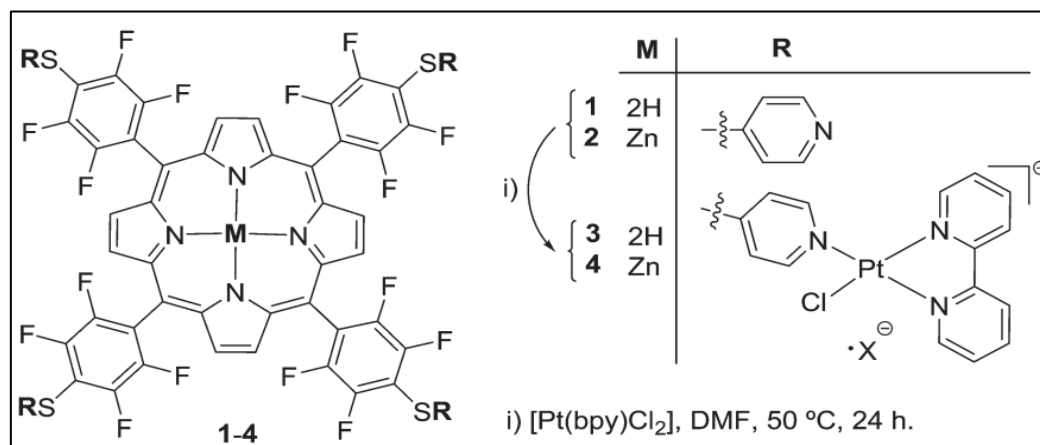


Fonte: Adaptado de Naue e colaboradores, 2009, p. 183.

Os autores determinaram, através de Ressonância Plasmônica de Superfície, que as porfirinas interagem de maneira diferente com o DNA justamente por apresentarem conformações diferentes, na qual a 3-H₂TPtPyP possibilita interações eletrostáticas mais eficientes que a 4-H₂TPtPyP por alcançar os sulcos maiores do DNA, ao passo que a conformação planar da 4-H₂TPtPyP não alcança.

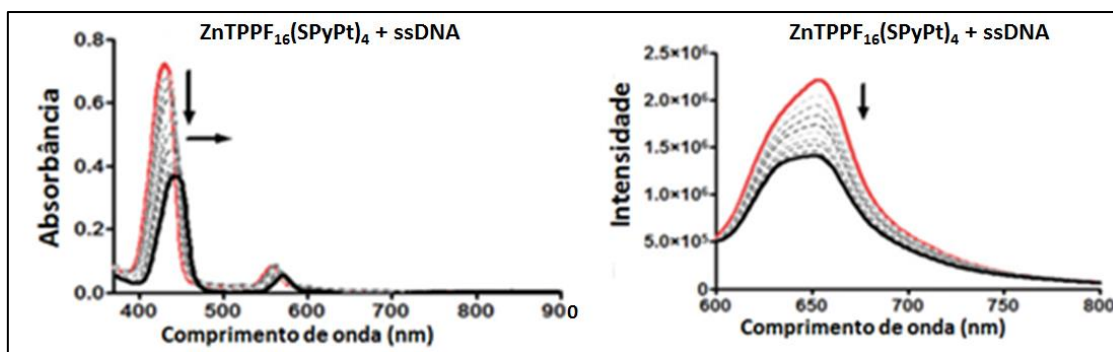
Mais tarde, Lourenço e colaboradores (2015) [37], sintetizaram tetra-(S-piridil)porfirinas coordenadas a complexos bipyridínicos de Pt^{II} (Esquema 6) a fim de avaliar a interação das mesmas com o DNA. A interação pôde ser avaliada modulando propriedades como a existência/ausência do íon metálico (Zn^{II}) no anel porfirínico, distribuição da carga e substituintes periféricos. Interações medidas por espectroscopia UV-vis e de fluorescência demonstraram por meio de alterações no espectro (decaimento e deslocamento das bandas de absorção e decaimento nas bandas de emissão) que as moléculas catiônicas interagem de maneira efetiva com o DNA (Figura 6).

Esquema 6 - Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Lourenço e colaboradores [37].



Fonte: Adaptado de Lourenço e colaboradores, 2015, p. 531.

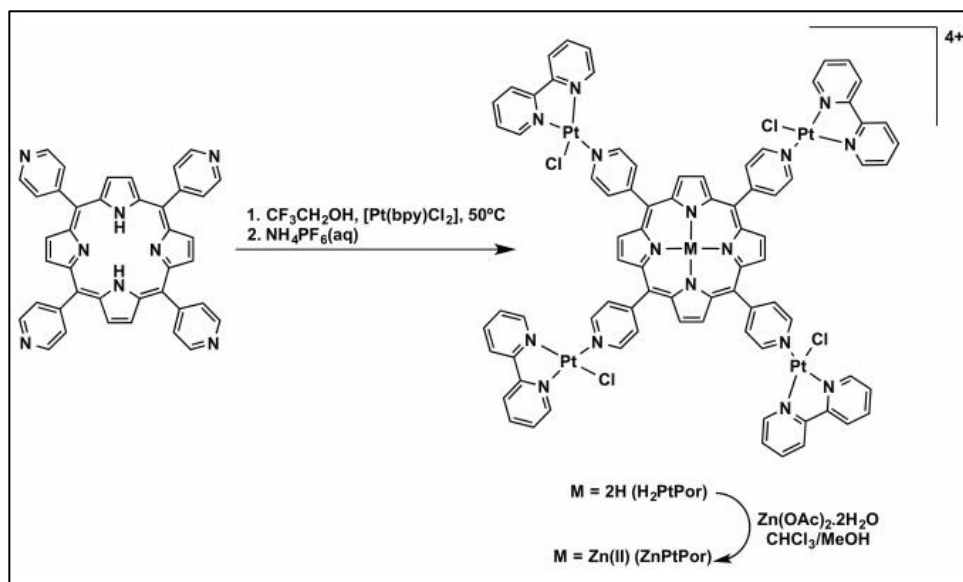
Figura 6 - Espectros de UV-vis e fluorescência apresentando a interação entre $\text{ZnTPPF}_{16}(\text{SPyPt})_4$ e ssDNA [37].



Fonte: Adaptado de Lourenço e colaboradores, 2015, p. 531.

As propriedades fotoativas de tetra-*meso*-(piridil)platina(II)porfirinas foram avaliadas por Oliveira e colaboradores (2017) [38], para investigar, entre outros aspectos, o efeito da luz visível na clivagem do DNA pela técnica de eletroforese em gel. Os autores sintetizaram porfirinas base-livre coordenadas a complexos de Pt^{II} (H_2PtPor) e porfirinas coordenadas a íons Zn^{II} no anel macrocíclico (ZnPtPor) (Esquema 7).

Esquema 7 - Esquema reacional da obtenção de Pt^{II} -porfirinas, relatadas por Oliveira e colaboradores [38].



Fonte: Adaptado de Oliveira e colaboradores, 2017, p. 1661.

Ensaios na ausência de luz não apresentaram clivagem do DNA, mesmo depois de transcorrido 24 horas. Entretanto após 90 minutos na presença de luz,

a clivagem foi observada. Ensaios com o precursor (4-H₂TPyP) também foram realizados e não houve indícios de clivagem, significando que a presença de complexos de Pt^{II} são essenciais para a interação com o DNA.

2.1.2 Terapia Fotodinâmica

2.1.2.1. Aspectos gerais

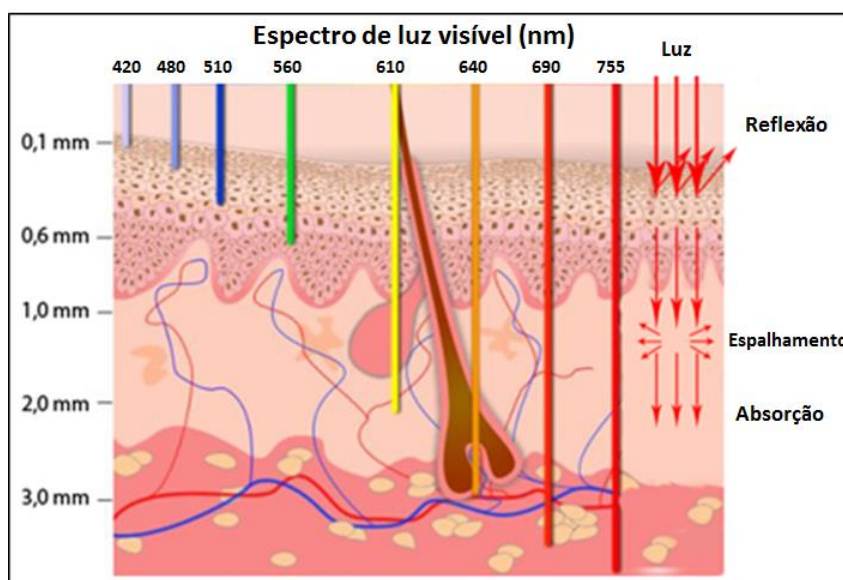
O princípio da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) consiste na utilização de uma molécula fotosensibilizadora que na presença de oxigênio e luz pode produzir as espécies reativas de oxigênio, capazes de interagir com um substrato, oxidando-o [7, 14, 39, 40]. Entre os objetivos da PDT estão a destruição de células cancerígenas dos mais diversos tipos (câncer de bexiga, de pulmão, de pele, entre outros) e a inativação e possível eliminação de micro-organismos causadores de doenças (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, etc) [41, 42, 43].

O primeiro relato do uso da PDT foi feito por Oscar Raab em 1900, quando utilizou luz visível em combinação com acridina para destruir micro-organismos vivos (*Paramecium caudatum*, protozoário) [44]. Nos anos seguintes, muitos relatos de uso de uma fonte de luz para tratar doenças e eliminar micro-organismos foram feitos e, finalmente, em 1907 o termo “fotodinâmico” foi introduzido no meio científico por Tappeiner e Jodlbauer para explicar que o efeito fototóxico era concebido somente na presença de oxigênio [45]. Quatro anos mais tarde, W. Hausmann descreveu efeitos fototóxicos de hematoporfirinas em pele de ratos [46]. Em 1913, Friedrich Meyer-Betz realizou o primeiro estudo de terapia fotodinâmica em humanos utilizando hematoporfirinas aplicando a substância na sua própria mão [47]. Por volta de 1975, Thomas Dougherty conseguiu tratar com sucesso câncer de pele em pacientes, o que possibilitou anos mais tarde realizar o primeiro estudo clínico controlado em pacientes humanos [48]. Alguns anos depois, o primeiro fármaco utilizado para terapia fotodinâmica foi aprovado para o tratamento de câncer de esôfago: o Photofrin® [39, 49].

A fonte luminosa, tipicamente utilizada em comprimentos de onda na faixa do visível (entre 400 - 800 nm), possibilita a excitação do fotosensibilizador que

na presença de oxigênio gera ERO que interagem com o tumor e o destroem, conduzindo para uma ação curativa do paciente. Em certos casos, quando o tumor é demasiadamente grande, recomenda-se o uso da PDT como medida pré-operatória para redução do tamanho do tumor [14, 50]. Entretanto, irradiações dentro da janela foto-terapêutica (600 – 800 nm) são recomendadas. Esta região do espectro eletromagnético é onde, normalmente, substâncias presentes no organismo não absorvem radiação, como é o caso da hemoglobina, além de ser uma radiação de menor energia e que possibilita atravessar mais profundamente o tecido (Figura 7) [50].

Figura 7 - Representação do alcance da luz através da pele em diferentes comprimentos de onda [51].



Fonte: Adaptado de Agostinis e colaboradores, 2011, p. 255.

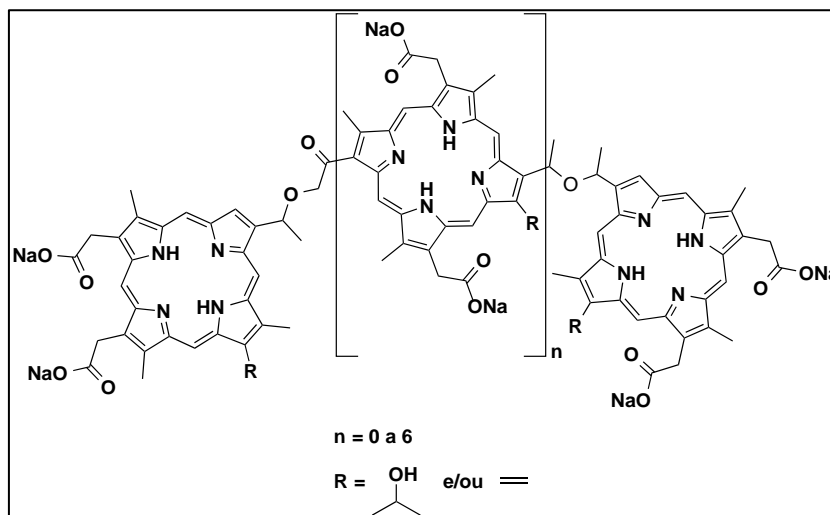
2.1.2.2. Fotosensibilizadores

A primeira ideia de usar um corante como um fotosensibilizador veio de Oscar Raab, em 1900. Ele notou que o efeito tóxico da acridina em *Paramecium caudatum* era mínimo em dias de tempestades comparados ao efeito em dias de sol. Com isso, o autor observou que a acridina convertia a luz absorvida em alguma “energia quimicamente ativa” [13].

Uma das substâncias mais utilizadas na PDT é o Photofrin® (Figura 8). O Photofrin® é uma molécula constituída por oligômeros de porfirinas e é indicado

para tratamento contra câncer em locais como esôfago, bexiga, coluna cervical, endobrônquios e cérebro, com alta taxa de cura no tratamento, se descoberto com antecedência [39].

Figura 8 - Representação estrutural da molécula do Photofrin®.



Fonte: Adaptado de Fakhar-e-Alam e colaboradores, 2010, p. 814.

Apesar de sua conhecida efetividade contra tumores, principalmente câncer de esôfago, o Photofrin® apresenta algumas desvantagens como a fotosensibilidade prolongada (até 12 semanas) após o uso do medicamento e baixa absorvidade da luz em comprimento de onda menos energético (630 nm), necessário para sua ativação [52, 53]. Sendo assim, novas moléculas para uso potencial em PDT são pesquisadas. De acordo com Simplício e colaboradores (2002) [14] e Alisson e colaboradores (2004) [54], diversas características devem ser avaliadas para se considerar um fotosensibilizador como ideal para tratamento clínico. Entre elas, é possível destacar:

1. **Seletividade:** O fotosensibilizador precisa ir diretamente ao local desejado e se acumular nesta região. Fotosensibilizadores conjugados a sistemas carreadores estão sendo estudados para aumentar a seletividade da substância [55, 56];
2. **Meio de administração:** O fotosensibilizador que puder ser administrado topicamente, por ingestão, inalação ou via intravenosa e possuir a mínima toxicidade administrativa ao paciente, torna-se apreciável;

3. **Comprimento de onda de irradiação:** Comprimentos de onda maiores permitem uma maior penetração da luz sobre a pele. Sendo assim, moléculas que absorvem radiação na janela foto-terapêutica (600 – 800 nm) são mais apreciadas, principalmente se a biomolécula a ser oxidada encontra-se mais profundamente no tecido.
4. **Ativação:** Irradiações em comprimentos de ondas menores são mais energéticas do que em maiores, podendo causar dano ao paciente. Portanto, é desejável e mais seguro que o fotosensibilizador possa ser ativado irradiando-o em maiores comprimentos de onda;
5. **Características fotofísicas favoráveis:** Uma maior quantidade de moléculas fotosensibilizadoras que conseguem alcançar o estado tripleto pode ter um maior rendimento quântico de ERO;
6. **Baixa toxicidade no escuro (ausência de luz):** É desejável que fotosensibilizadores sejam citotóxicos apenas na presença de radiação, para não causarem efeitos indesejáveis ao paciente e,
7. **Farmacocinética favorável:** Rápida eliminação do organismo para evitar efeitos indesejáveis.

2.1.2.3. Espécies reativas de oxigênio

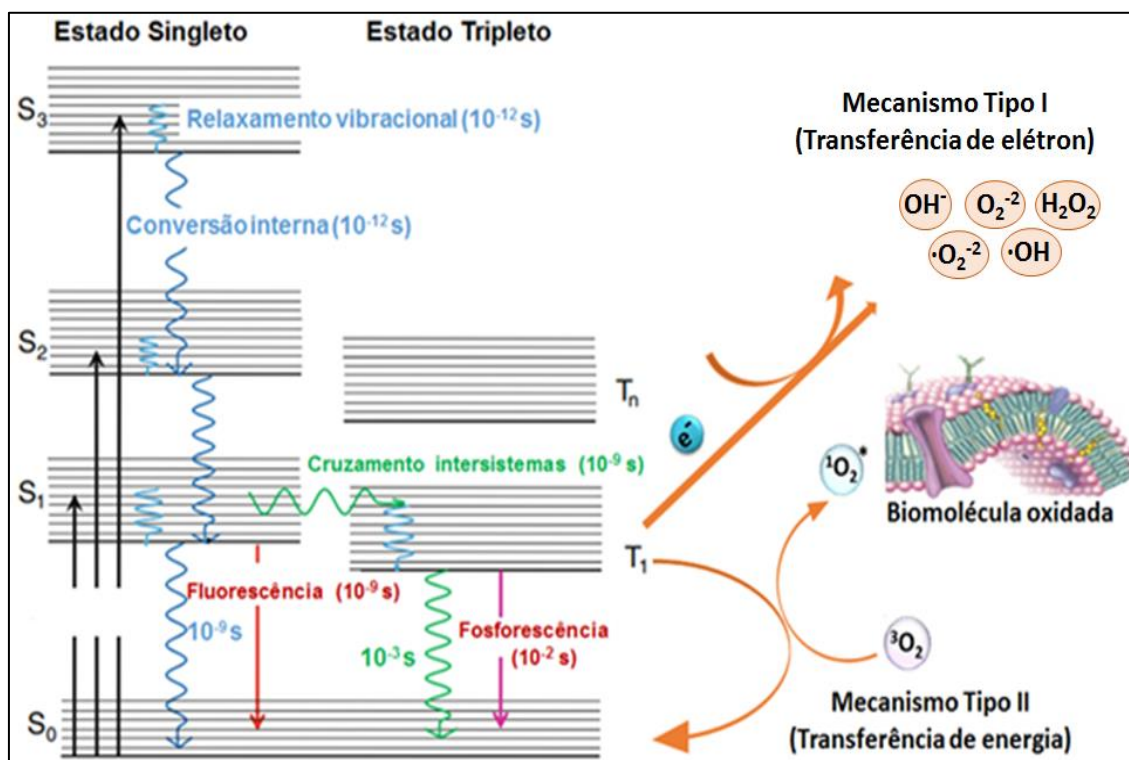
Se o fotosensibilizador conseguir realizar um cruzamento intersistemas e estiver na presença de oxigênio, ele pode produzir espécies altamente reativas, conhecidas como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Estas espécies compreendem moléculas como ânions peróxido (O_2^{2-}) e hidroxila (OH^-), os radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e hidroxila ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que podem ser gerados por dois mecanismos diferentes: o mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II (Figura 9) [40, 57, 58].

No mecanismo do tipo I, o fotosensibilizador no estado tripleto (T_1), pode interagir diretamente com o substrato **RH** (molécula ou membrana) e uma transferência de elétron (ou abstração de hidrogênio) produzirá um substrato oxidado (**R \cdot**) e um fotosensibilizador na forma reduzida (**$\cdot\text{SH}$**). 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 e hidroxila, radicais superóxido e hidroxila, além de peróxido de hidrogênio [7, 39, 57].

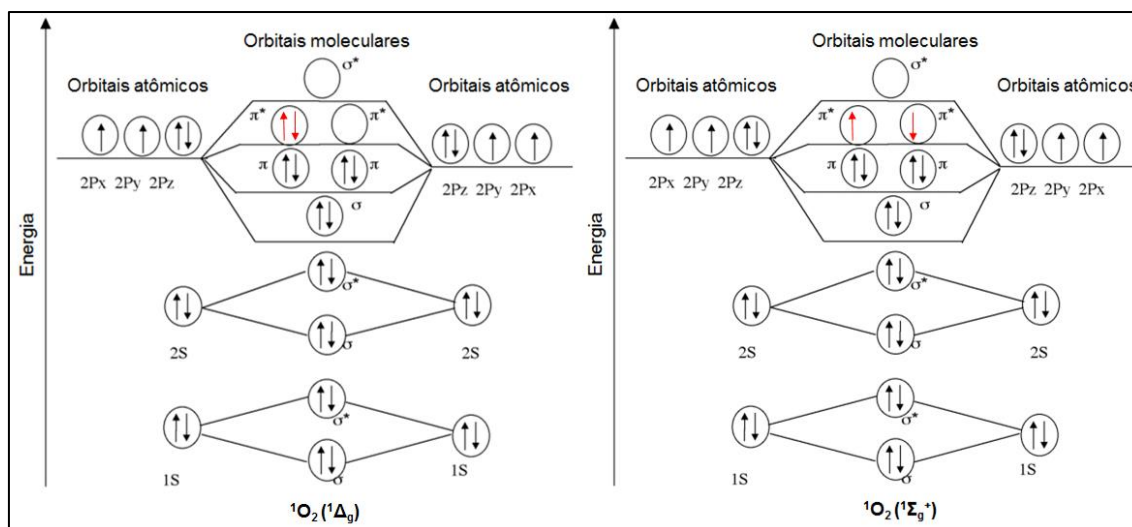
O mecanismo do tipo II envolve a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular no estado tripleto. O O_2 molecular, então, é excitado do seu estado fundamental tripleto ($^3\Sigma_g^-$) para um dos seus dois estados singleto, $^1\Delta_g$ de energia 95 kJ mol^{-1} e $^1\Sigma_g^+$ de energia 158 kJ mol^{-1} , respectivamente. O estado $^1\Delta_g$ possui um tempo de vida maior que o estado $^1\Sigma_g^+$ devido as regras de seleção por *spin* [57, 59, 60]. Relatos são de que os dois tipos de mecanismos ocorrem simultaneamente, mas com a produção do oxigênio singleto como produto majoritário [54, 59]. Além de suas energias, os estados $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$ também podem ser diferenciados pela distribuição eletrônica nos orbitais π antiligantes (Figura 10).

Figura 9 - Mecanismo de ação em terapia fotodinâmica [13, 58].



Fonte: Adaptado de Silva e colaboradores, 2015, p. 2, e Abdel-Kader, 2014, p. 36.

Figura 10 - Representação da distribuição eletrônica nos orbitais moleculares do oxigênio na forma de estado singlete $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$ [61].



Fonte: Adaptado de Min e Boff, 2002, p. 59.

Há duas formas pelas quais o oxigênio singlete pode ser determinado: direta e indiretamente. A forma direta envolve medidas do próprio oxigênio singlete e a forma indireta avalia a oxidação de um substrato presente no meio, servindo como sequestrador da própria espécie reativa [62].

As medidas de emissão de oxigênio singlete medem o decaimento de sua intensidade ao longo do tempo. Para estas medidas, a amostra é submetida a um pulso de luz e o decaimento da emissão de $^1\text{O}_2$, em aproximadamente 1.270 nm, é registrado em nanosegundos. Esta banda de emissão corresponde a transição do tipo $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ entre os níveis vibracionais de menor energia dos dois estados ($v = 0$) [33, 60, 63].

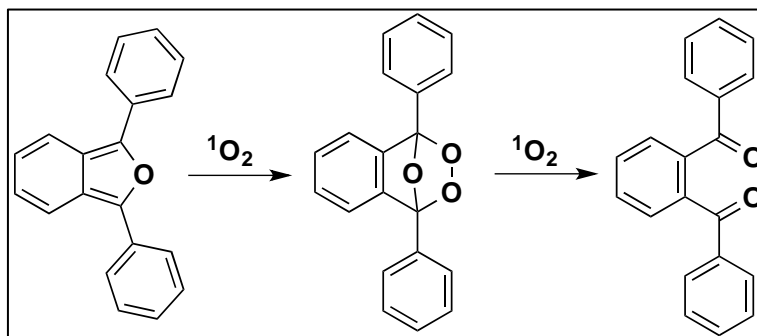
Para esta medida, são consideradas as integrais das áreas de emissão da amostra (I) e do padrão (I_{std}), o rendimento quântico de oxigênio singlete do padrão ($\Phi_{\Delta std}$), bem como seus respectivos tempos de vida de fluorescência (τ e τ_{std}), o que pode ser representado pela equação a seguir:

Equação 2 – Cálculo para rendimento quântico de oxigênio singlete.

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I \tau_{std}}{I_{std} \tau} \Phi_{\Delta std}$$

As medidas indiretas envolvem a utilização de um substrato oxidável, que podem ser o β -caroteno, o 9,10-dimetilantraceno (DMA) ou 1,3 – difenilisobenzofurano (DPBF). A título de exemplo, para o DPBF, a reação com o oxigênio singleto gera a 1,2-dibenzilbenzona (Esquema 8). O DPBF apresenta uma transição eletrônica em 415 nm e ao ser oxidado, produzindo a 1,2-dibenzilbenzona, ocorre o decréscimo da absorbância em 415 nm relativo ao DPBF e o surgimento de uma transição eletrônica em 700 nm, referente ao produto final desta oxidação. O monitoramento dessas mudanças espectrais possibilita detectar a reação entre oxigênio singleto e DPBF [60, 64].

Esquema 8 - Representação da reação entre DPBF e $^1\text{O}_2$, formando 1,2-dibenzilbenzona [60].



Fonte: Adaptado de Kruk, 1998, p. 80.

O cálculo para a determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) para o fotosensibilizador pode ser realizado pela equação a seguir:

Equação 3 - Cálculo para rendimento quântico de oxigênio singleto.

$$\Phi_\Delta = \frac{\Phi_\Delta^p \cdot k}{k^p} \cdot \frac{I^p}{I}$$

Φ_Δ^p corresponde ao rendimento quântico do padrão, k^p e k são as constantes cinéticas de fotodegradação do DPBF, e $\frac{I^p}{I} = \frac{1-10^{A_p}}{1-10^A}$, onde A_p e A são as absorbâncias do padrão (como, por exemplo, a Ftalocianina de Zn^{II} – ZnPc; $\Phi_\Delta = 0,67$ em DMSO) [65] e da amostra, respectivamente.

2.1.2.4. Interação com biomoléculas

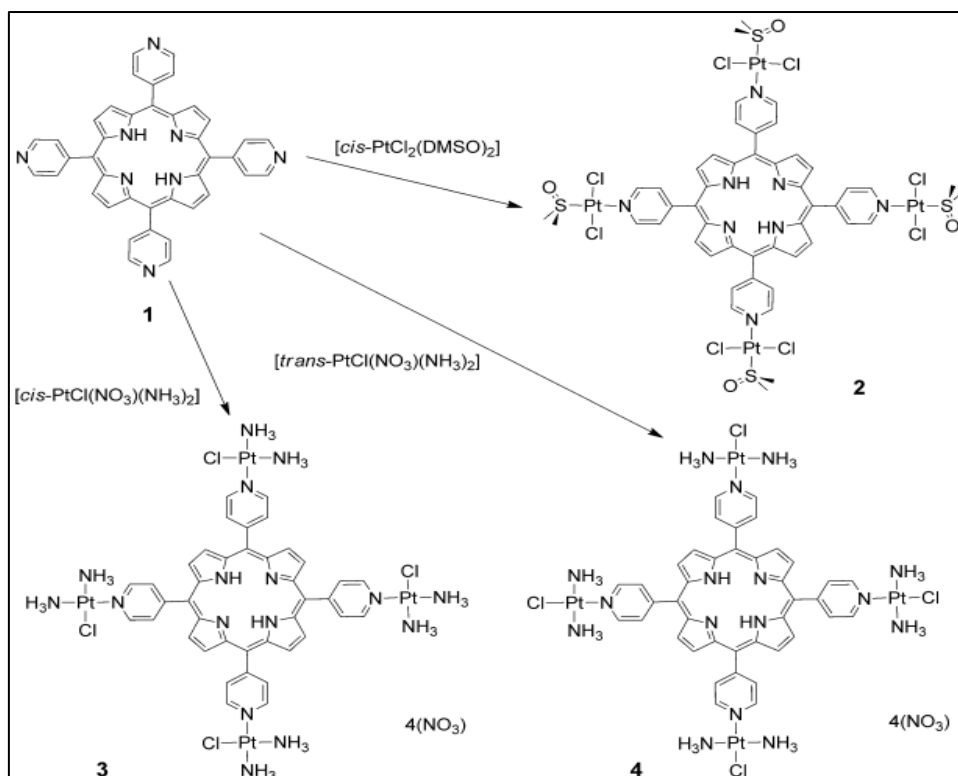
Depois de gerado, o $^1\text{O}_2$ pode reagir rapidamente com biomoléculas essenciais que estão presentes em meio biológico como lipídios insaturados, colesterol e cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Estas biomoléculas estão presentes em membranas e na parede celular e, portanto, o dano à membrana se constitui de um fator importante para o sucesso do tratamento fotodinâmico [66].

A absorção celular pode ocorrer por meio de mecanismos ativo ou passivo, dependendo do tipo do fotosensibilizador e da biomolécula em questão. No intervalo de tempo entre a acumulação do fotosensibilizador e da irradiação, a distribuição para outros alvos intracelulares ou até mesmo o transporte para fora da célula pode acontecer. A eficiência da oxidação de biomoléculas não depende somente da localização e produção de ERO, mas também de mecanismo de ação antioxidante (superóxido dismutase, por exemplo) [67] da própria célula, além do processo de autofagia quando o fotosensibilizador se localiza em organelas celulares. Geralmente, proteínas e lipídios são oxidados. O DNA é atingido somente se o fotosensibilizador estiver localizado próximo a membrana nuclear [57].

Baseado nos princípios e aplicações da terapia fotodinâmica, Naik e colaboradores (2014) [68] sintetizaram derivados porfirínicos coordenados a complexos de Pt^{II} (Esquema 9) a fim de avaliar a foto-citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais do tipo MCR-5 humana, células de câncer cervical humana (HeLa), células de carcinoma em ovário humano (A2780) e em linhagem de células resistentes à cisplatina (CP70).

Para isto, as porfirinas foram caracterizadas quanto a sua capacidade geradora de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) através da foto-oxidação do 9,10-dimetilantraceno. Com isso os Φ_{Δ} para as porfirinas foram: 1 (0,41), 2 (0,42), 3 (0,50) e 4 (0,54). Os ensaios de atividade fotodinâmica destes compostos foram realizados com radiação em 420 nm ($6,95 \text{ J cm}^{-2}$) após 4 horas de incubação com as células. As atividades frente às células na ausência de luz foram determinadas após 48 horas de incubação.

Esquema 9 - Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Naik e colaboradores [68].



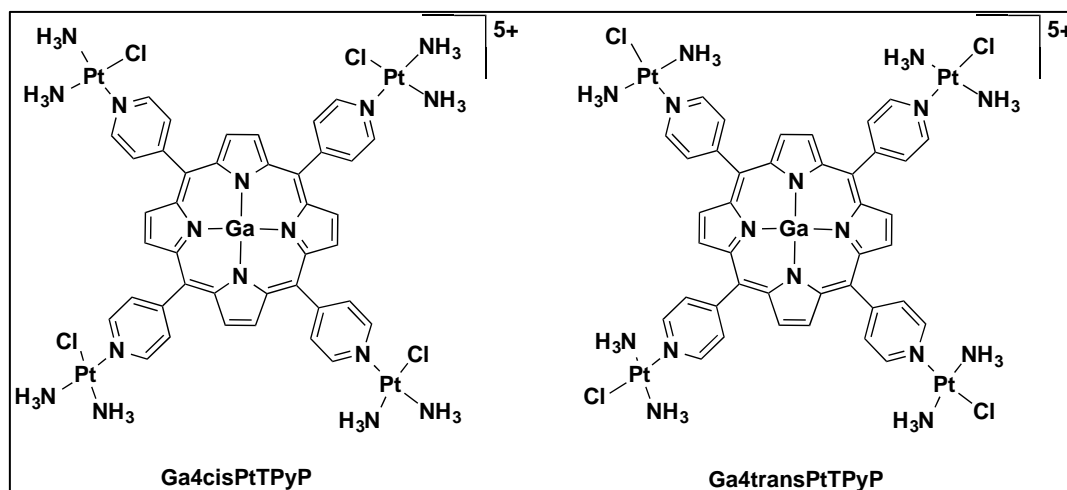
Fonte: Adaptado de Naik e colaboradores, 2014, p. 6939.

Ensaio na ausência de luz não apresentaram ou apresentaram IC_{50} elevados (acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), principalmente para células MCR-5 humana e células resistentes à cisplatina CP70. Contudo, após ensaios sob irradiação foi observado maiores atividades fotodinâmicas para todas as moléculas, alcançando, para a porfirina (4), um IC_{50} de $0,019 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um índice fototóxico acima de 5.000. Além disso, tendo em vista que a porfirina (4) se apresentou mais promissora para terapia fotodinâmica, os autores determinaram a seletividade que a porfirina apresenta quando comparada com outras estruturas, no caso, a cisplatina. Para isso, foi utilizada a técnica ICP-MS e determinou-se que 99,5% da Pt^{II} da porfirina (4) localizava-se no núcleo de células HeLa, enquanto que 94,1% da Pt^{II} da cisplatina se localizava no mesmo sítio.

Visando aumentar a biodistribuição e, conseqüentemente, a eficiência de porfirinas e metaloporfirinas em células tumorais, Hu e colaboradores (2017) [69] sintetizaram a $Ga_4cisPtTPyP$ e a $Ga_4transPtTPyP$ a partir de tetra-*meso*-(piridil)porfirinas, complexos de Pt^{II} (*cis* e *trans*) e íons Ga^{III} (Figura 11). A escolha pelo Ga^{III} foi por causa da sua característica diamagnética e por ser um íon de

camada totalmente preenchida ($[Ar]3d^{10}4s^04p^0$), o que possibilita maiores rendimentos quânticos e tempos de vida no estado tripleto [70, 71], podendo alcançar, assim, maiores rendimentos quânticos para formação de ERO.

Figura 11 - Representação estrutural de porfirinas sintetizadas por Hu e colaboradores. Os contra-íons Cl^- foram omitidos para melhor visualização [69].



Fonte: Adaptado de Hu e colaboradores, 2017, p. 3.

A maior hidrofiliçidade observada pelas metaloporfirinas (Ga4cisPtTPyP e Ga4transPtTPyP) foi justificada pela quantidade de cargas (5+) em relação às respectivas porfirinas do tipo base-livre (4cisPtTPyP e 4transPtTPyP) (4+) e da tetra-(4-piridil)porfirina de Ga^{III} (GaTPyP) (1+), além de apresentarem maiores rendimentos quânticos de oxigênio singleto em água: Ga4cisPtTPyP ($\Phi_{\Delta} = 0,84$), Ga4transPtTPyP ($\Phi_{\Delta} = 0,80$), 4cisPtTPyP ($\Phi_{\Delta} = 0,76$) e GaTPyP ($\Phi_{\Delta} = 0$). Além do efeito causado pelo íon coordenado no anel porfirínico, o Φ_{Δ} também pode ser explicado pelo efeito do átomo pesado da Pt^{II} e do Ga^{III}. Ensaio em terapia fotodinâmica destas porfirinas conduzidas com luz branca (50 W) por 30 minutos apresentaram a Ga4cisPtTPyP como a mais promissora, visto que inibiram quase que completamente tumores em ratos (Cólón 26 e Sarcoma 180) após duas semanas de tratamento.

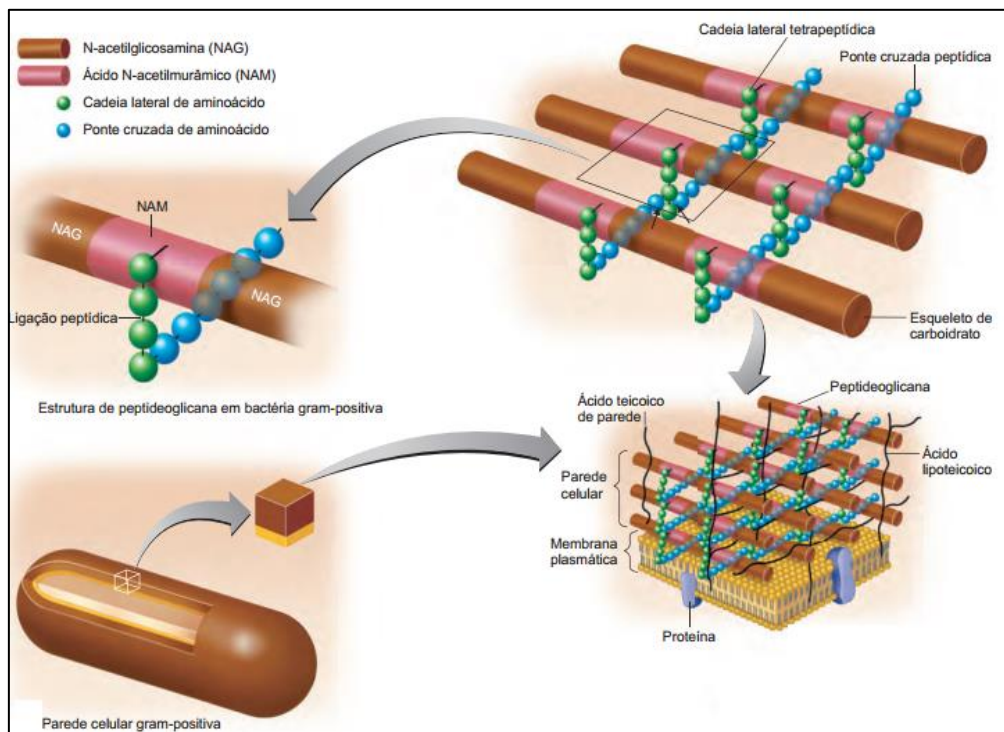
2.1.2.5. Fotoinativação de micro-organismos

Além de pesquisas relacionadas a PDT contra células tumorais, muitos derivados porfirínicos são sintetizados para avaliar a eficiência do efeito

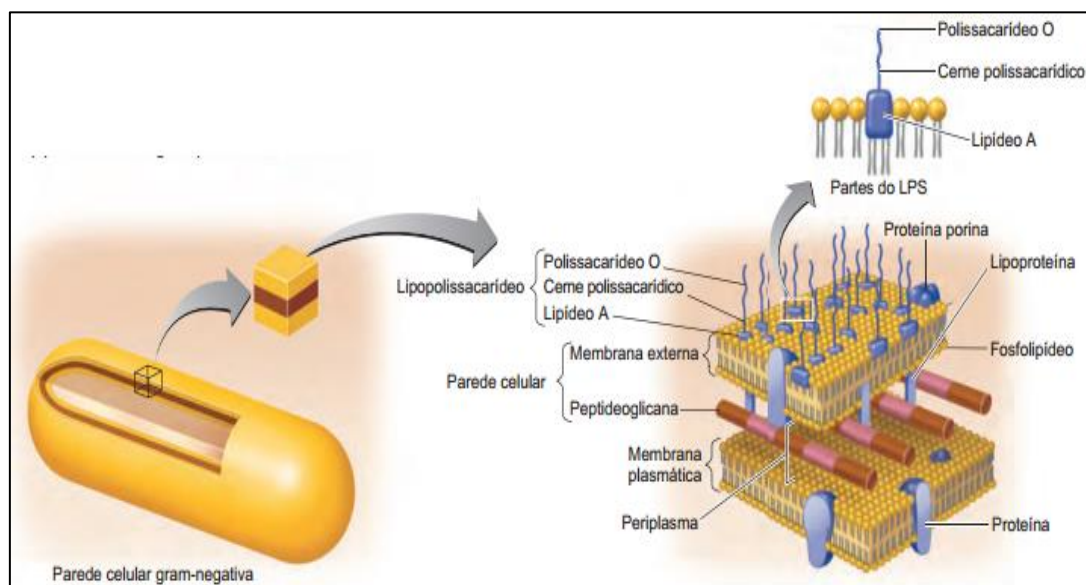
fotodinâmico em micro-organismos. Esta procura está relacionada com a preocupação na área da saúde no que diz respeito a crescente resistência aos medicamentos antimicrobianos que é adquirida por micro-organismos causadores de doenças. Esta resistência tem dificultado o tratamento de problemas de saúde, aumentando o custo do tratamento. Em vista deste cenário, porfirinas têm sido utilizadas como potenciais alternativas terapêuticas [72, 73, 74].

Pesquisas na área microbiológica, mais precisamente na área bacteriana, envolvem principalmente a fotoinativação e possível eliminação de micro-organismos como *Staphylococcus aureus* (*Gram-positiva*), *Escherichia coli* (*Gram-negativa*), *Enterococcus faecalis* (*Gram-positiva*), entre outros [75, 76]. A eficiência do tratamento depende de alguns fatores como a presença de cargas, íons metálicos coordenados ao anel porfirínico e diferentes ligantes periféricos do fotosensibilizador, além da composição da parede celular de bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas* (Figura 12 e Figura 13).

Figura 12 - Representação estrutural da parede celular de bactérias *Gram-positivas* [18].



Fonte: Adaptado de Tortora, 2012, p. 86.

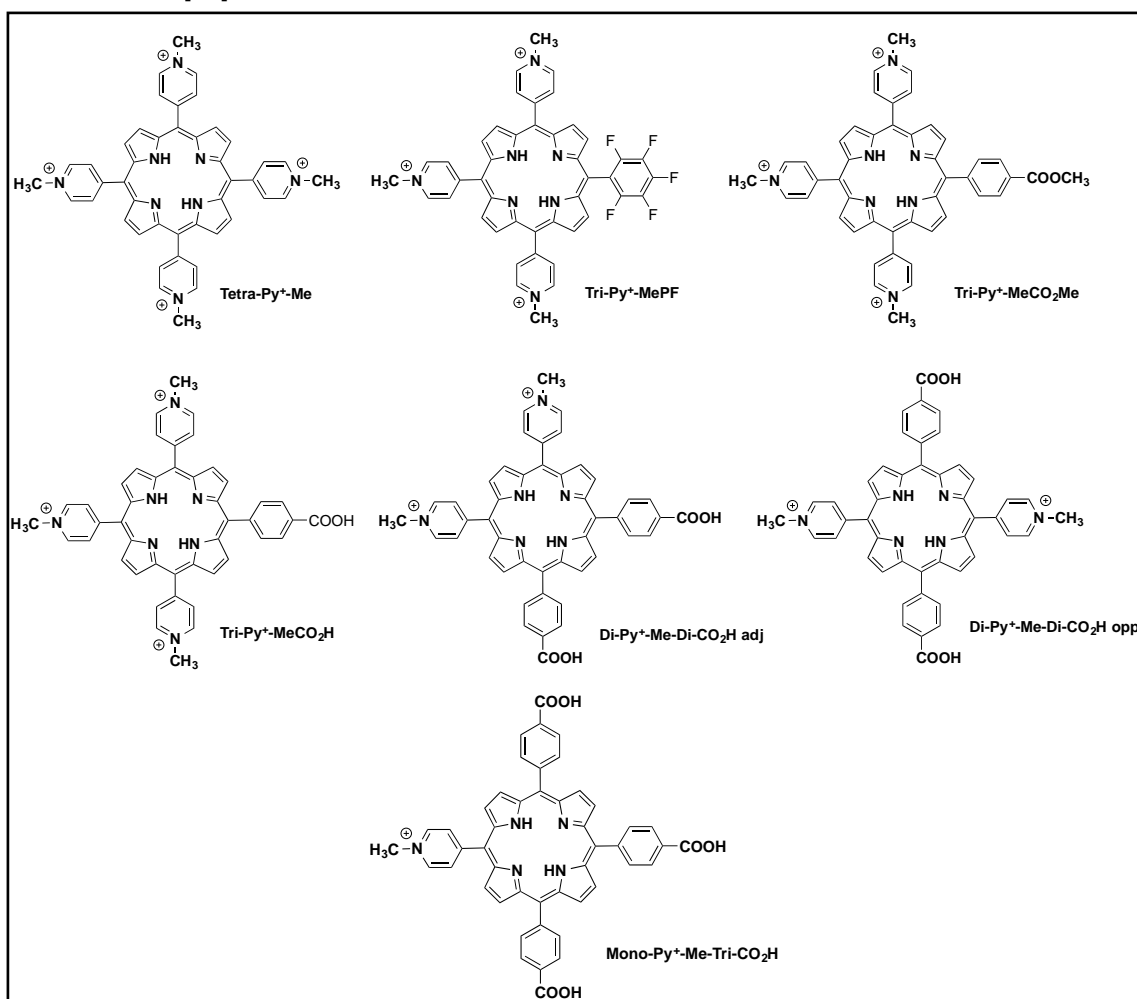
Figura 13 - Representação estrutural da parede celular de bactérias *Gram*-negativas [18].

Fonte: Adaptado de Tortora, 2012, p. 86.

Bactérias *Gram*-positivas conseguem capturar fotosensibilizadores convencionais utilizados em PDT, sendo facilmente fotoativadas. Contudo, as *Gram*-negativas são relativamente impermeáveis a espécies neutras ou aniônicas uma vez que sua parede celular é negativamente carregada devido a presença de grupos fosfatos de fosfolípidos presentes nesta parede. Sendo assim, se faz necessário a utilização de agentes desestabilizantes da parede celular bacteriana como EDTA que elimina 50% da camada lipossacarídica da célula ou CaCl_2 que promove repulsões eletrostáticas, possibilitando a penetração e possível ação de fotosensibilizadores [77, 78].

Baseado nestes fatores, Alves e colaboradores (2009) [75] sintetizaram porfirinas catiônicas (Figura 14) para comparar a eficiência na fotoativação de bactérias *E. faecalis* (*Gram*-positiva) e *E. coli* (*Gram*-negativa). As cargas foram pensadas para alcançar uma maior fotoativação frente às *Gram*-negativas, dispensando a necessidade de se utilizar agentes desestabilizantes da parede celular.

Figura 14 - Representação estrutural de derivados porfirínicos sintetizados por Alves e colaboradores [75].



Fonte: Adaptado de Alves e colaboradores, 2009, p. 4.

Os sete derivados porfirínicos apresentaram-se como bons geradores de oxigênio singlete, entretanto, o efeito de fotoativação sugeriu uma dependência da quantidade de cargas, além da natureza eletrônica dos grupos substituintes. As cargas positivas induziram a uma interação eletrostática com os sítios negativamente carregados da superfície das bactérias, aumentando assim, o efeito fotoativante. A simetria da distribuição das cargas também foi um fator relevante, pois porfirinas com cargas adjacentes (*cis* – Di-Py⁺-Me-Di-CO₂H) foram mais eficientes que as opostas (*trans* – Di-Py⁺-Me-Di-CO₂H), mesmo as duas apresentando geração de oxigênio singlete semelhante. Uma explicação plausível é de que as cargas adjacentes poderiam resultar em distorções moleculares devido a interações eletrostáticas.

2.2. SEÇÃO EXPERIMENTAL

2.2.1. Material e métodos

2.2.1.1. Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados nas sínteses foram obtidos em grau analíticos e foram usados como recebidos. O complexo *cis*-dicloro-2,2'-bipiridilplatina(II), [Pt(bipy)Cl₂] foi sintetizado através da metodologia descrita por Naue e colaboradores (2006) [79]. O 4-piridinacarboxaldeído, o 3-piridinacarboxaldeído, a trietilamina (Et₃N), o hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆), o brometo de potássio (KBr), o dimetilsulfóxido (DMSO), o *N,N'*-dimetilformamida (DMF), o ácido acético (AcOH) foram adquiridos comercialmente.

2.2.1.2. Análise elementar

As análises elementares de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram obtidas utilizando-se um equipamento Perkin-Elmer CHN 2400e, da Central Analítica do IQ-USP.

2.2.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos através de um equipamento Bruker Tensor-27 Sample Compartment RT- DLa-TGS, janela espectral de 4.000 - 400 cm⁻¹, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr), na proporção próxima de 2% composto/KBr.

2.2.1.4. Espectroscopia eletrônica na região do UV-vis

Os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV-vis 2600 Shimadzu em solução em DMSO (faixa de concentração entre 5 x 10⁻⁴ e 1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), localizado no Departamento

de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Além disso, foram calculadas as respectivas absorptividades molares (ϵ), em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, das amostras através da equação presente na Lei de Lambert-Bear, no qual A é a absorbância no comprimento de onda da respectiva transição eletrônica, l é o caminho óptico, em centímetros, e C é a concentração da amostra, em mol L^{-1} .

Equação 4 – Equação para determinação da absorptividade molar [27].

$$A = \epsilon l C$$

Fonte: Adaptado de Skoog, West, Hooler e Crouch, 2006, p. 680.

2.2.1.5. Estudo fotofísico das porfirinas

Os espectros de emissão foram obtidos por meio do Fluorímetro Cary Eclipse. Os tempos de vida de fluorescência foram determinados utilizando o Microscópio de Fluorescência Confocal Resolvida no Tempo PicoQuant com resolução de 25 picosegundos. Os rendimentos quânticos de oxigênio singleto foram determinados pelo Espectrofotômetro de fluorescência resolvida no tempo Edinburgh acoplado a um detector fotomultiplicador Hamamatsu.

Os ensaios de fotoestabilidade foram medidos por irradiação em 3,0 mL de uma solução de porfirina em DMSO (aproximadamente $6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) numa cubeta de quartzo de fluorescência (caminho óptico de 1 cm) com um sistema de laser OPO RAINBOW acoplado a um programa Magic Prism™, que pode converter o comprimento de onda do laser Nd:YAG em uma emissão continuamente sintonizável de 420 a 680 nm. As porfirinas foram irradiadas nos seus máximos de absorção da banda Soret pelo laser pulsado, em intervalos de 30 segundos durante 10 minutos, utilizando uma frequência de 10 Hz, 40 mJ de energia de pulso e largura de impulso de 5 - 10 ns. Todos estes equipamentos estão localizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo – SP.

2.2.1.6. *Micro-organismos*

Para os experimentos foram usados os seguintes micro-organismos adquiridos comercialmente da *American Type Culture Collection* (ATCC): bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739). As bactérias foram mantidas em meio de cultura com glicerol e congeladas a - 80 °C. As amostras foram descongeladas, inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas por 24 horas à 37 °C. Após, foram semeadas em ágar Nutriente e novamente incubadas por 24 horas à 37 °C. A partir das colônias crescidas, foi produzida a suspensão bacteriana em solução salina a 0,9% correspondente a 0,5 na escala McFarland que corresponde $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹).

2.2.1.7. *Ensaio de atividade fotodinâmica*

Para os ensaios de atividade fotodinâmica, foram determinadas:

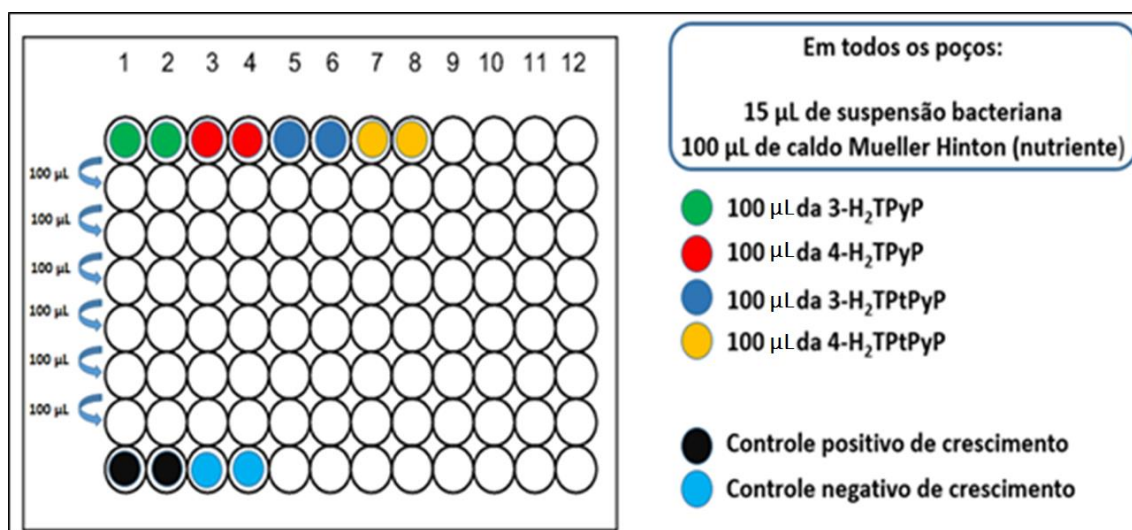
- **Concentração Inibitória Mínima (CIM):** concentração mínima na qual é possível inibir o crescimento populacional das bactérias por determinado período de tempo. Neste caso, 24 horas.
- **Concentração Bactericida Mínima (CBM):** concentração mínima na qual é possível eliminar a população de bactérias.
- **Curva de Viabilidade Celular:** contagem do número de colônias bacterianas que mantém suas atividades celulares após os ensaios. Foram determinados os seguintes intervalos para as contagens das colônias bacterianas: 0, 15, 30, 60 e 90 minutos.

Os ensaios para determinar a CIM e CBM foram realizados pela técnica de microdiluição em caldos em placas de 96 poços de acordo com o Instituto de Padrões Laboratoriais e Clínicos (CLSI, do inglês *The Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Para isto, foram preparadas duas placas de 96 poços, para cada micro-organismo, da seguinte forma: em cada poço foi adicionado 100 µL de caldo Mueller Hinton e 15 µL de suspensão bacteriana. Para as porfirinas de soluções

estoque em DMSO com concentração na faixa de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram adicionados 100 μL ao primeiro poço. Deste poço, foram retirados 100 μL e adicionados ao próximo poço, e assim por diante, de modo que as concentrações obtidas em cada poço fossem sempre a metade do anterior, ou seja, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% e 0,78% da concentração da solução estoque. Os dois últimos poços continham apenas caldo Mueller Hinton e suspensão bacteriana para controle positivo de crescimento, e apenas o caldo Mueller Hinton para controle negativo de crescimento. O controle positivo foi utilizado para verificar se a bactéria conseguia se reproduzir na ausência da porfirina, e o controle negativo serviu para observar se houve contaminação externa por outro tipo de micro-organismo indesejável. Além disso, o DMSO foi adicionado a um poço para verificar a atividade frente às colônias. A Figura 15 representa a metodologia descrita acima.

Figura 15 – Representação da metodologia para determinar CIM e CBM.



Sendo assim, a atividade das porfirinas frente aos micro-organismos foi determinada com ensaios realizados na ausência de luz e sob luz branca (26 mW cm^{-2}) por 90 minutos de irradiação. Em seguida, as soluções presentes nas placas foram incubadas, em estufa bacteriológica, por 24 horas à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Estes ensaios foram realizados em triplicata. Ao fim de 24 horas de incubação, às placas foram adicionadas cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2,3,5-TTC), o qual desenvolve coloração vermelha ao poço cujo houve crescimento bacteriano. Para cada porfirina, a concentração mínima onde o poço não desenvolveu cor

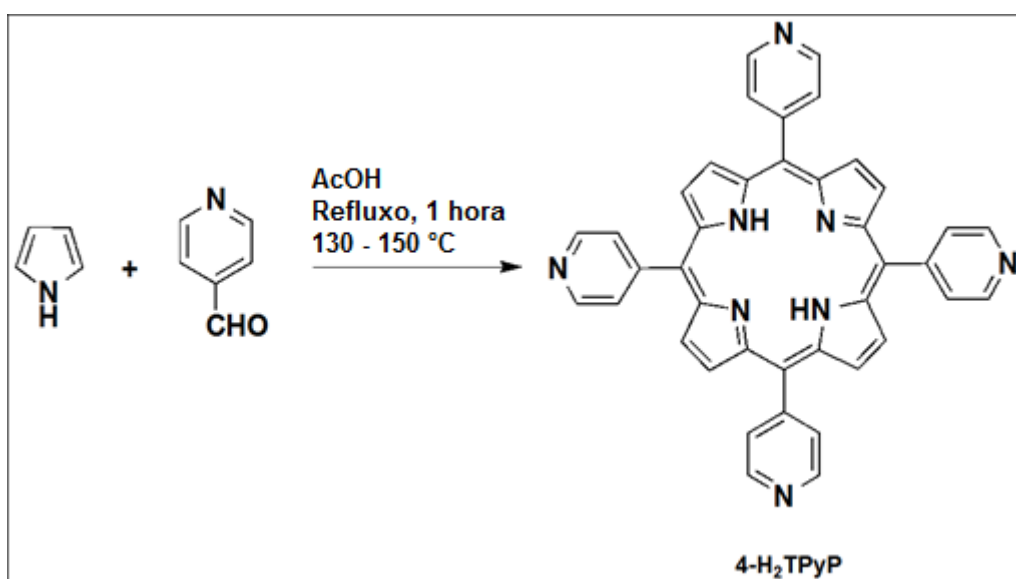
avermelhada foi considerada a concentração inibitória mínima. Para a concentração bactericida mínima, uma alíquota de 1 μL de cada poço foi retirada, semeada em Ágar Nutriente e incubada, em estufa bacteriológica, por mais 24 horas à 37 °C. Após este período, as colônias bacterianas foram contabilizadas e a menor concentração de cada porfirina que não apresentou crescimento bacteriano foi considerada como CBM.

Para determinar a curva de viabilidade celular, ensaios adaptados de Lopes e colaboradores (2016) [80] foram realizados para determinar o tempo necessário de exposição à luz para fotoinativar os micro-organismos. Para isto, foram utilizadas as placas com as bactérias incubadas que foram expostas à luz branca e placas com bactérias que não foram expostas a luz. Após intervalos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos, uma alíquota de 1 μL foi retirada de cada poço e semeada em ágar Nutriente, as quais foram, posteriormente, incubadas em estufa bacteriológica, por 24 horas à 37 °C. Após isto, as colônias de bactérias foram contabilizadas. Poços contendo somente caldo BHI foram considerados como controle negativo e os poços com BHI e o micro-organismo foram considerados como controle positivo. Os ensaios foram feitos em triplicatas.

2.2.2. Sínteses

2.2.2.1. Síntese da Tetra-meso-(4-piridil)porfirina (**4-H₂TPyP**)

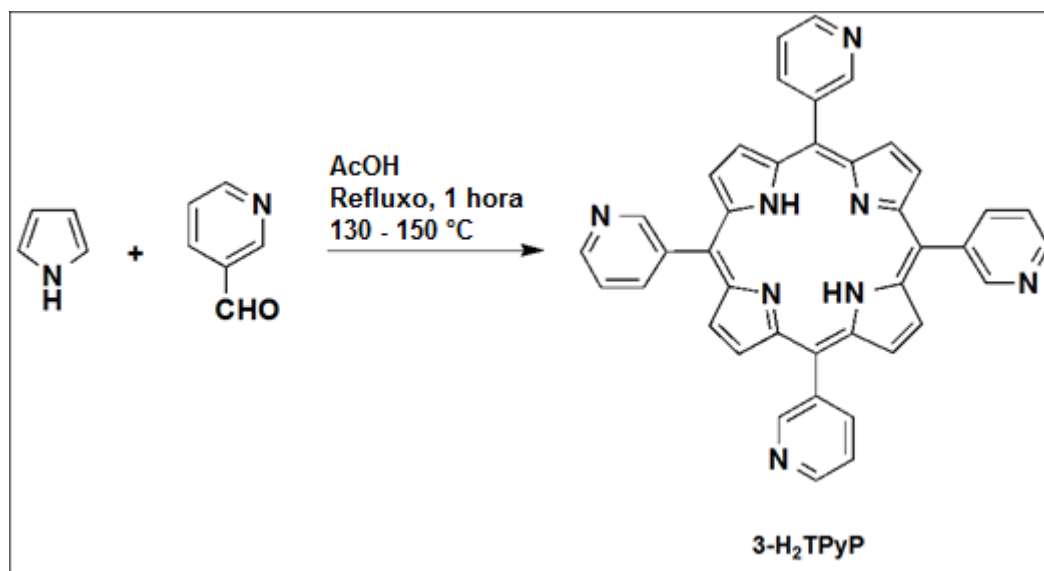
Esquema 10 - Rota sintética para síntese da **4-H₂TPyP**.



Em um balão de uma boca de 250 mL foram adicionados 130 mL de ácido acético e 5,275 mL (56 mmol) de 4-piridinacarboxaldeído. A solução foi colocada sob condição de refluxo com aquecimento em torno de 130 - 150 °C. Após isto, 3,95 mL (57 mmol) de pirrol foram diluídos em 20 mL de ácido acético e gotejados na solução. Após o tempo de uma hora, a solução da reação foi levada ao rota-evaporador para remoção do solvente. Em seguida, 1 mL de trietilamina foi adicionado ao sólido resultante com o objetivo de neutralizar o produto formado. A precipitação e a separação da porfirina foram realizadas adicionando-se 200 mL de etanol, deixando-a em repouso por um dia. Por fim, foi feita uma filtração a vácuo utilizando funil de placa sinterizada (nº 4) e o sólido resultante lavado com etanol para eliminar impurezas de polipirrol formado durante a reação. Foi obtido um sólido de cor púrpura brilhante. Rendimento: 1,60 % (0,547 g; 0,88 mmol). Análise Elementar: (C₄₀H₂₆N₈ · H₂O) (calc.) Exp.: %C: (75,45) 75,47; %H: (4,55) 4,55; %N: (17,60) 17,69.

2.2.2.2. Síntese da Tetra-meso-(3-piridil)porfirina (3-H₂TPyP)

Esquema 11 - Rota sintética para síntese da 3-H₂TPyP.

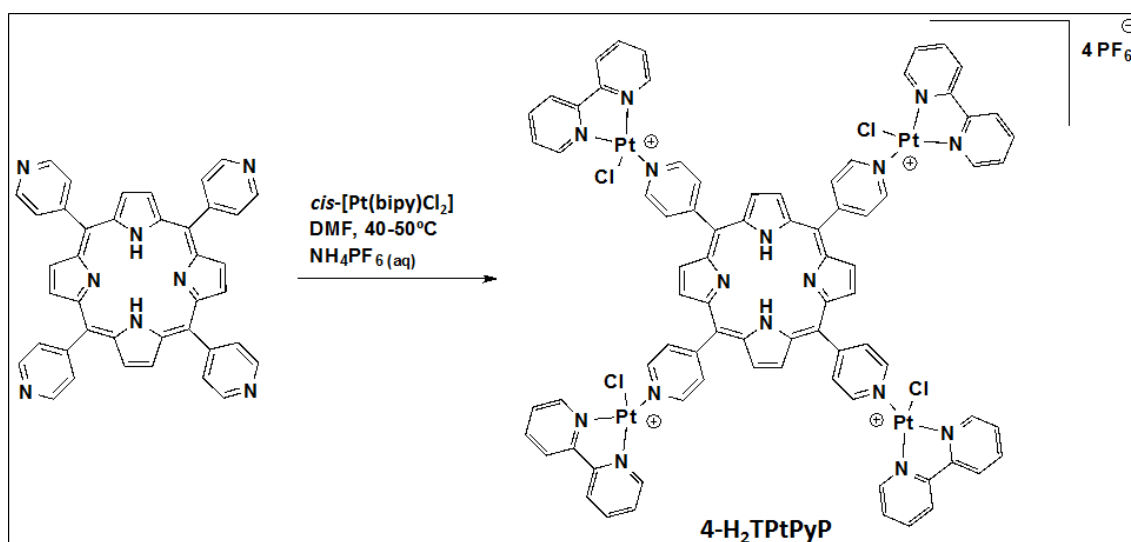


Em um balão de uma boca de 250 mL foram adicionados 130 mL de ácido acético e 5,25 mL (56 mmol) de 3-piridinacarboxaldeído. A solução foi colocada em refluxo com aquecimento em torno de 130 - 150 °C. Após, 3,95 mL (57 mmol) de pirrol foram diluídos em 20 mL de ácido acético e gotejados na solução. Após

o tempo de uma hora, a solução foi levada ao rota-evaporador para remover o solvente. 1 mL de trietilamina foi adicionado ao sólido resultante com o objetivo de neutralizar o produto formado. A precipitação e a separação da porfirina foram realizadas adicionando-se 200 mL de etanol, deixando em repouso por um dia. Foi feita uma filtração a vácuo utilizando funil de placa sinterizada (nº 4) e lavado com etanol para eliminar impurezas de polipirrol formado durante a reação. Foi obtido um sólido de cor púrpura. Rendimento: 1% (0,113 g; 0,182 mmol). Análise Elemental: (C₄₀H₂₆N₈ · 2H₂O) (calc.) Exp.: %C: (73,37) 73,44; %H: (4,62) 4,55; %N: (17,11) 17,18.

2.2.2.3. Síntese da Tetra-meso-[(4-piridil)-cloro-(2,2'-bipiridil)-platina(II)]porfirina (**4-H₂TPtPyP**)

Esquema 12 - Rota sintética para síntese da **4-H₂TPtPyP**.

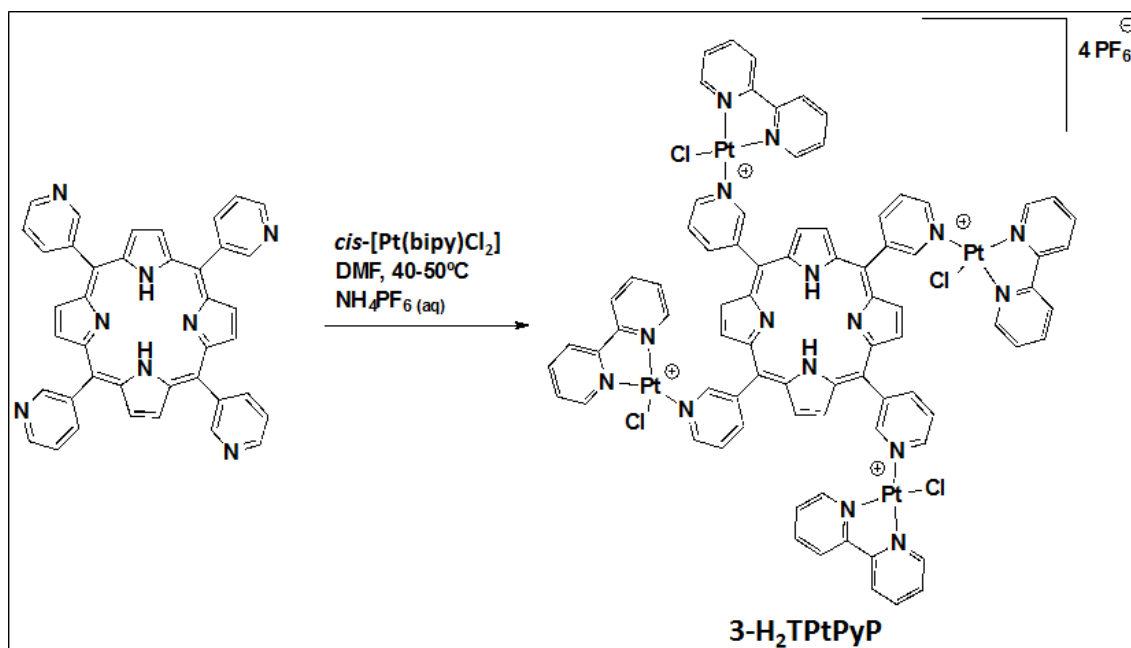


Em balão de uma boca de 250 mL foram adicionados 61,87 mg (0,10 mmol) da **4-H₂TPtPyP** sintetizada na seção 2.2.2.1, 173,09 mg (0,41 mmol) de [Pt(bipy)Cl₂] e 10,0 mL de DMF. O balão contendo a solução foi pré-aquecido entre 40 e 50 °C e deixado para reagir por 36 horas sobre aquecimento e mais 24 horas em temperatura ambiente. Após evaporar o solvente, uma solução aquosa supersaturada de hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) foi adicionada a solução para precipitar e isolar o composto desejado. Foi feita uma filtração a vácuo utilizando funil de placa sinterizada (nº 4) e o sólido resultante lavado com água destilada para eliminar as impurezas. Desta forma, foi obtido um sólido de

cor azul-marinho escuro. Rendimento: 92,3% (0,252 g; 0,092 mmol). Análise Elemental: $[C_{80}H_{58}Cl_4N_{16}Pt_4](PF_6)_4 \cdot 8H_2O$ (calc.) Exp.: %C: (33,25) 33,28; %H: (2,58) 2,60; %N: (7,76) 7,80.

2.2.2.4. Síntese da Tetra-meso-[(3-piridil)-cloro-(2,2'-bipiridil)-platina(II)]porfirina (**3-H₂TPtPyP**)

Esquema 13 - Rota sintética para síntese da **3-H₂TPtPyP**.



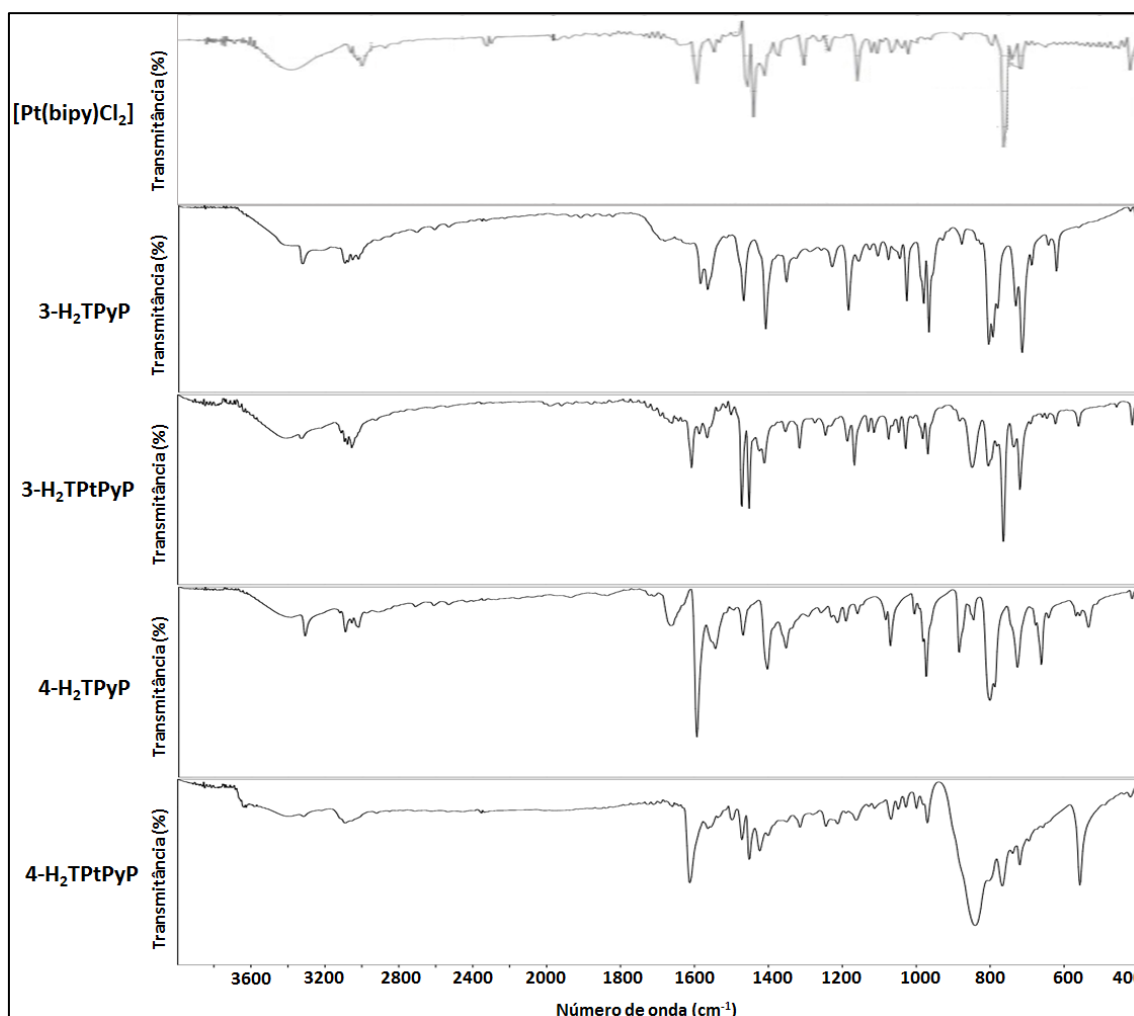
Em balão de 250 mL foram adicionados 50 mg (0,08 mmol) da **3-H₂TPyP** sintetizada na seção 2.2.2.2, 139,32 mg (0,33 mmol) de $[Pt(bipy)Cl_2]$ e 8,0 mL de DMF. O balão contendo a solução foi pré-aquecido entre 40 e 50 °C e deixado para reagir por 36 horas sobre aquecimento e mais 24 horas em temperatura ambiente. Após evaporar o solvente, uma solução aquosa supersaturada de hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6) foi adicionada a solução para precipitar e isolar o composto desejado. Foi feita uma filtração a vácuo utilizando funil de placa sinterizada (nº 4) e lavado com água destilada para eliminar as impurezas. Foi obtido um sólido de cor azul-escuro. Rendimento: 62% (0,170 g; 0,062 mmol). Análise Elemental: $[C_{80}H_{58}Cl_4N_{16}Pt_4](PF_6)_4 \cdot 8H_2O$ (calc.) Exp.: %C: (33,25) 33,29; %H: (2,58) 2,62; %N: (7,76) 7,90.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1. Espectroscopia eletrônica na região do infravermelho

As porfirinas possuem um padrão de absorção complexo no infravermelho, e mesmo uma porfirina simples não-substituída como a porfina possui 105 modos de vibração fundamental que podem estar associados a (1) deformações estruturais simétricas e assimétricas do anel macrocíclico, (2) vibrações de átomos de hidrogênio ligados a carbonos (CH) e nitrogênio (NH) e, no caso de piridil-porfirinas, (3) distorções dos grupos piridil fora do plano do anel porfirínico [81, 82]. A Figura 16 apresenta os espectros das porfirinas sintetizadas e do complexo [Pt(bipy)Cl₂].

Figura 16 – Espectros de infravermelho das porfirinas sintetizadas e do complexo [Pt(bipy)Cl₂].



As bandas dos nitrogênios da biperidina coordenados ao íon Pt^{II} , bem como dos nitrogênios dos grupos piridina da porfirina à Pt^{II} não são visíveis na janela espectral utilizada ($4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), e desse modo, o espectro do complexo $[Pt(bipy)Cl_2]$ é dominado apenas pelas vibrações do ligante biperidina. Assim, em número de onda próximo a 3.060 cm^{-1} são observados os estiramentos ν_{C-H} . Entre $1.600 - 1.400 \text{ cm}^{-1}$ têm-se as bandas de deformação atribuídas a $\delta_{C=C}$ e $\delta_{C=N}$. Entre $900 - 700 \text{ cm}^{-1}$ observaram-se bandas de deformação δ_{C-H} . Estas vibrações estão em concordância com aquelas determinadas por Naue e colaboradores, em 2006 [79].

A Tabela 1 apresenta os principais estiramentos (ν) e deformações (δ) encontrados para as moléculas estudadas.

Tabela 1 - Principais estiramentos e deformações, em número de onda (cm^{-1}) para as porfirinas **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP**, **4-H₂TPtPyP** e o complexo $[Pt(bipy)Cl_2]$.

Estiramentos e					
Deformações	$[Pt(bipy)Cl_2]$	3-H₂TPyP	4-H₂TPyP	3-H₂TPtPyP	4-H₂TPtPyP
ν_{C-H}	3.078 e 3047	3.096	3.091	3.076 e 3.053	3.090
$\nu_{C=C}$	1.604	1.635	1.664	1.659	1.612
ν_{N-H}	-----	3.327	3.310	3.326	3.314
δ_{C-H}	717, 740, 763 e 794	715, 732, 795 e 805	724, 798 e 843	716, 734, 761 e 802	720, 767 e 840
$\delta_{C=N}$	1.560	1.586	1.593	1.585	1.563
$\delta_{C=C}$ aromático	1.450, 1.465, 1.543	1.354, 1.410 e 1.470,	1.351, 1.401 e 1.468	1.352, 1.409 e 1.450	1.423, 1.452 e 1.471

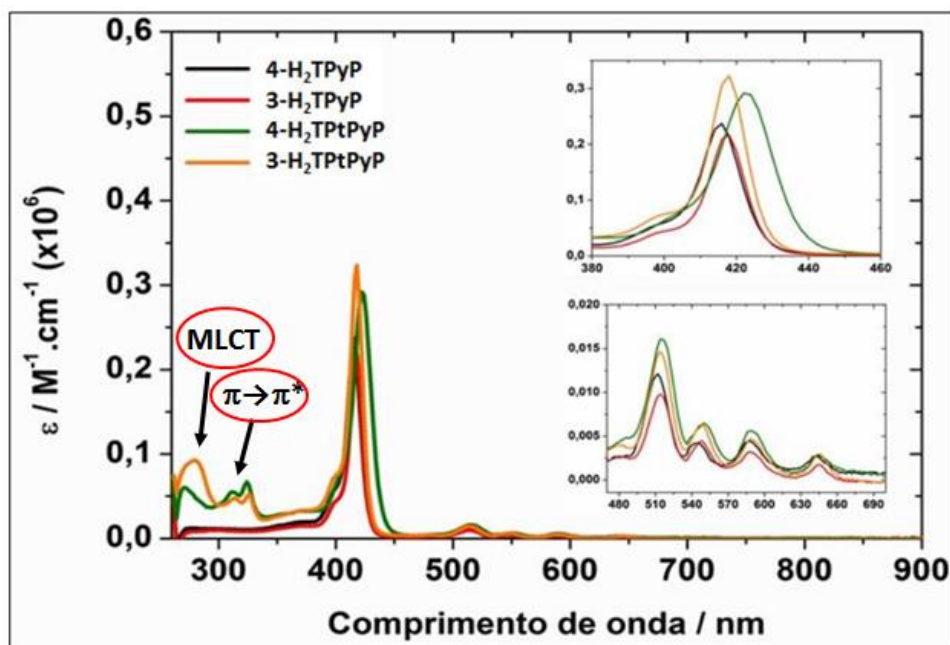
As bandas observadas entre $1.700 - 700 \text{ cm}^{-1}$ para a **4-H₂TPyP** e **3-H₂TPyP** devem-se aos estiramentos $\nu_{C=C}$, $\nu_{C=N}$ e deformações δ_{C-H} e $\delta_{C=C}$

aromático. Os espectros no infravermelho dos compostos **4-H₂TPtPyP** e **3-H₂TPtPyP** possuem um perfil equivalente ao somatório dos espectros da [Pt(bipy)Cl₂] e das respectivas porfirinas **3-H₂TPyP** e **4-H₂TPyP**, promovendo apenas pequenos deslocamentos e variação na intensidade relativa das bandas. Na região entre 3.309 – 3.327 cm⁻¹ é possível observar o estiramento ν_{N-H} que corresponde ao nitrogênio do pirrol e o hidrogênio interno ao anel porfírico. Estes números de onda determinados se aproximam dos valores apresentados por Naue e colaboradores, em 2006 [79].

2.3.2. Espectroscopia eletrônica na região do UV-vis

A Figura 17 apresenta os espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para porfirinas sintetizadas.

Figura 17 - Espectro na região do UV-vis das porfirinas **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPtPyP** e **3-H₂TPtPyP**, em solução de DMSO.



A Tabela 2 apresenta as respectivas transições e valores das absorptividades molares ($\log \epsilon$) para a **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**.

Tabela 2 - Transições eletrônicas, em nm, e absorvidades molares ($\log \epsilon$) para as porfirinas **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** em DMSO.

Composto	MLCT	$\pi \rightarrow \pi^*$	Soret	Q _x (0-1)	Q _x (0-0)	Q _y (0-1)	Q _y (0-0)
3-H₂TPyP	-----	-----	418 (5,08)	514 (3,76)	548 (3,41)	588 (3,28)	644 (3,07)
4-H₂TPyP	-----	-----	416 (4,21)	512 (2,91)	542 (2,52)	586 (2,49)	642 (2,29)
3-H₂TPtPyP	280 (5,02)	314 (4,73) e 324 (4,78)	418 (5,56)	514 (4,23)	548 (3,86)	588 (3,74)	646 (3,55)
4-H₂TPtPyP	266 (4,85)	324 (4,85) e 376 (4,53)	424 (5,49)	516 (4,24)	550 (3,81)	590 (3,75)	642 (3,37)

De maneira geral, todas as porfirinas aqui estudadas apresentam transições eletrônicas na região entre 300 - 800 nm, transições estas que estão em conformidades com aquelas determinadas por Naue e colaboradores, em 2006 [79]. Para as porfirinas **3-H₂TPyP** e **4-H₂TPyP** são observadas um conjunto de cinco transições cada, sendo a banda Soret na região entre 415 - 420 nm e as bandas Q na região entre 510 - 650 nm. No caso das porfirinas contendo os complexos bipyridínicos de platina(II), a **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**, são observadas, além das transições eletrônicas na região do visível já citadas, transições na região do ultravioleta. As transições observadas na região entre 280 - 300 nm podem ser atribuídas a bandas do tipo transferência de carga metal-ligante (MLCT), envolvendo a transição $Pt(d\pi) \rightarrow bipy(p\pi^*)$. Transições intraligantes ($\pi \rightarrow \pi^*$), característico de ligantes bipyridínicos, são observadas entre 310 - 380 nm, respectivamente.

2.3.3. Propriedades fotofísicas

2.3.3.1. Fluorescência

Os espectros de emissão das porfirinas, nos quais é possível observar as bandas de emissões clássicas Q_(0,0) e Q_(0,1) entre 600 e 800 nm, são apresentados na Figura 18. Além disso, as informações relativas ao rendimento

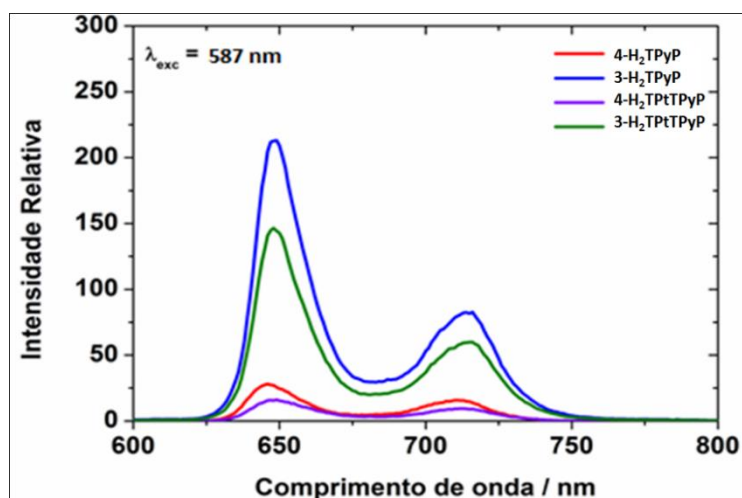
quântico de fluorescência (Φ_F) e tempos de vida de emissão (τ_f) são fornecidos na Tabela 3. O solvente para todas as amostras foi o DMSO. A espécie utilizada como referência foi o violeta de cresilo, também em DMSO ($\Phi_F = 0,54$) [83]. O comprimento de onda de excitação para determinar os tempos de vida foi 587 nm.

Tabela 3 - Resultados fotofísicos obtidos para as porfirinas sintetizadas, em $\lambda_{exc} = 587$ nm.

Porfirinas	Emissão ($\lambda_{exc} = 420$ nm)	Emissão ($\lambda_{exc} = 587$ nm)	Φ_F^a	τ_f (ns)
3-H₂TPyP	648 e 714 nm	647 e 714 nm	0,06	11,82
4-H₂TPyP	646 e 711 nm	649 e 712 nm	0,07	8,5
3-H₂TPtPyP	647 e 715 nm	647 e 715 nm	0,03	8,13
4-H₂TPtPyP	647 e 713 nm	650 e 713 nm	0,003	1,92
Violeta de Cresilo	-----	-----	0,54	-----
<i>m</i>-THPP	-----	-----	0,12 ^b	-----
TPP	648 e 712 nm	-----	0,10 ^c	-----

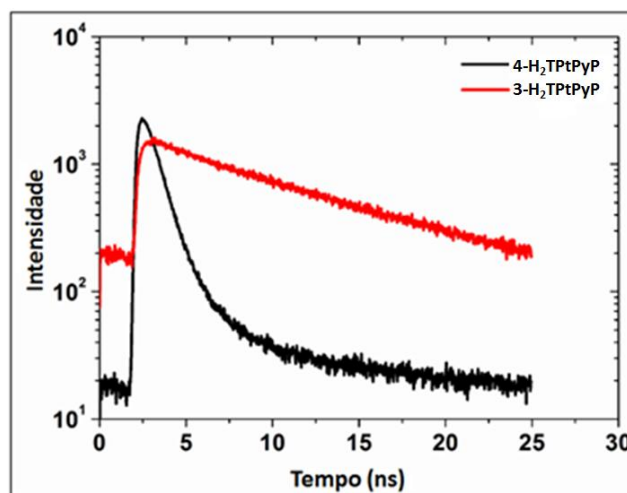
^a Utilizando como padrão o composto Violeta de Cresilo em MeOH ($\Phi_F = 0,54$) [83]; ^b Φ_F da Tetra-*meso*-(hidroxifenil)porfirina em MeOH [83]; ^c Φ_F da Tetra-*meso*-(fenil)porfirina em DCM [83].

Figura 18 - Espectros de emissão das porfirinas **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** em DMSO.



O gráfico com os tempos de vida de fluorescência das porfirinas platinadas podem ser conferidos na Figura 19.

Figura 19 - Tempos de vida de fluorescência das porfirinas **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**.



Em comparação com as bandas de emissão das porfirinas **3-H₂TPyP** e **4-H₂TPyP**, as bandas de emissão das porfirinas de platina(II), **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**, deslocam-se 1 nm, em média.

De maneira geral, as porfirinas **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** apresentaram rendimentos quânticos de emissão menores em comparação com os seus precursores. Isto pode estar relacionado a alguns fatores: (1) a coordenação do nitrogênio do grupo piridil à Pt^{II} desloca a densidade eletrônica em direção ao íon metálico. Este deslocamento pode ocasionar em um novo deslocamento

eletrônico, desta vez partindo do anel porfirínico em direção aos nitrogênios das piridinas, reduzindo, assim, a densidade eletrônica no anel porfirínico e, conseqüentemente, o rendimento quântico de fluorescência, (2) a presença dos íons Pt^{II} pode promover, pelo efeito do átomo pesado, o acoplamento *spin*-órbita, que pode ou facilitar o cruzamento intersistemas entre estados singlete e tripleto ou facilitar a desativação do estado singlete excitado devido a maior sobreposição dos níveis eletrônicos proporcionado pelos ligantes $[Pt(bipy)Cl_2]$ [32].

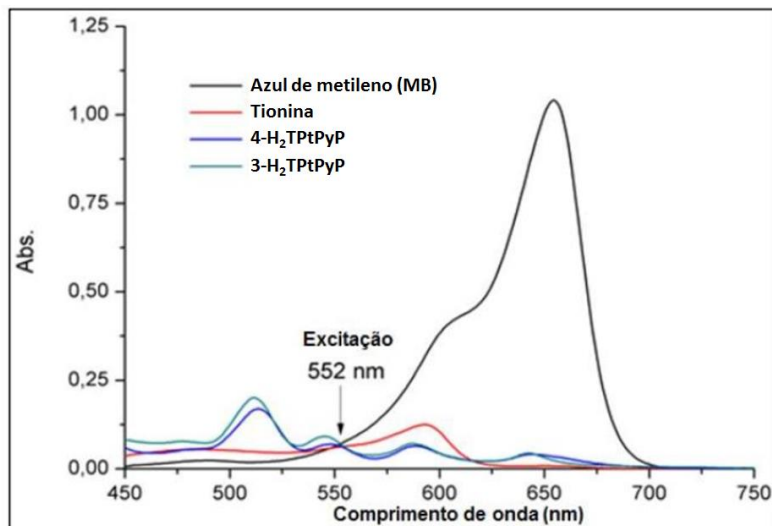
Quando os rendimentos quânticos de fluorescência e tempos de vida de fluorescência dos isômeros **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** são comparados entre si, é possível observar que o isômero *para* apresenta dez vezes menos fluorescência e tempo de vida, aproximadamente, quatro vezes menor que o isômero *meta*. O fator que pode estar associado com este evento é a vetorização eletrônica que as conformações *meta* e *para* apresentam. A conformação mais plana apresentada pela **4-H₂TPtPyP** permite que haja uma maior sobreposição de orbitais, fazendo com que a molécula seja desativada mais fácil e rapidamente. O mesmo não ocorre com a **3-H₂TPtPyP**, pois a conformação “saddle” não permite uma sobreposição de orbitais tão efetiva e, conseqüentemente, maiores rendimentos quânticos de fluorescência e tempo de vida fluorescente são observados [32].

2.3.3.2. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ})

Para a determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, a molécula utilizada como referência para o cálculo foi a azul de metileno (MB). A escolha por esta molécula ocorreu pelo fato do azul de metileno já estar envolvido em pesquisas relacionadas a terapia fotodinâmica e é uma molécula que é capaz de gerar 52% de oxigênio singlete em acetonitrila ($\Phi_{\Delta} = 0,52$) [84, 85]. Uma observação deve ser feita: o comprimento de onda de excitação dos compostos deve apresentar absorvância semelhante à molécula de referência para que, assim, o número de fótons absorvidos seja similar entre si. Fotosensibilizadores que apresentam semelhança quanto a absorção de fótons permite um comparativo mais fidedigno dos rendimentos quânticos de

geração de oxigênio singlete. Para a determinação deste parâmetro, o comprimento de onda escolhido foi 552 nm (Figura 20).

Figura 20 - Espectro de absorção eletrônica, apresentando o comprimento de onda selecionado para excitação para geração de oxigênio singlete.



A determinação do Φ_{Δ} foi realizada medindo a luminescência direta do $^1\text{O}_2$ em aproximadamente 1.270 nm (região do infravermelho próximo). A Figura 21 apresenta o espectro de emissão do oxigênio singlete para cada porfirina, e a Tabela 4 exhibe os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singlete obtidos para cada molécula estudada.

Figura 21 - Espectro de emissão do oxigênio singlete gerado pelas porfirinas, comparado com o padrão de referência azul de metileno (MB).

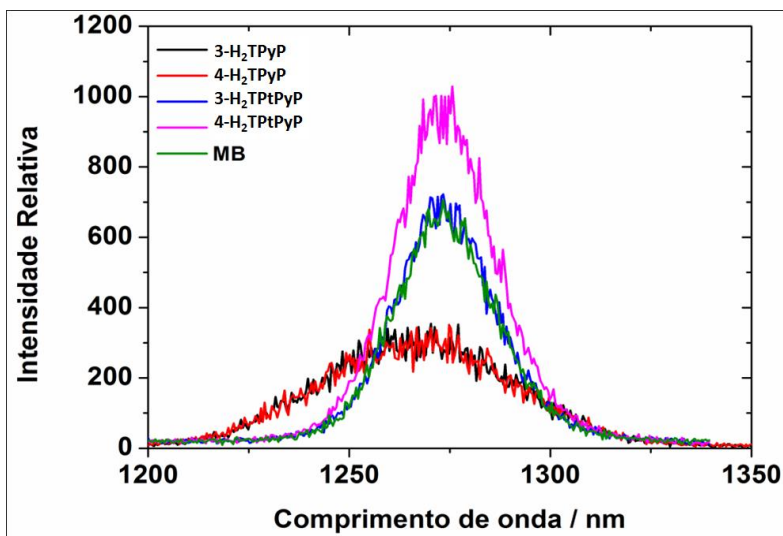


Tabela 4 - Rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto obtido para os compostos **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** calculado utilizando azul de metileno (MB) como referência ($\Phi_{\Delta} = 0,52$) [84].

Molécula	Azul de metileno	3-H ₂ TPyP	4-H ₂ TPyP	3-H ₂ TPtPyP	4-H ₂ TPtPyP
Φ_{Δ}	0,54	0,81	0,76	0,63	0,71

Conforme o que pôde ser observado na Tabela 4, as porfirinas apresentam maior rendimento quântico de oxigênio singleto que a molécula de referência, sendo a geração de oxigênio singleto entre 16 a 50% maior que o azul de metileno. A presença dos complexos [Pt(bipy)Cl⁺] causa um decréscimo no rendimento quântico, o que pode ser explicado pela presença dos íons Pt^{II} que ao invés de facilitarem o cruzamento intersistemas entre estados singleto e tripleto, estão facilitando a desativação do estado singleto excitado da molécula. Entretanto, quando estas porfirinas, mais precisamente as porfirinas tetraplatinadas, são comparadas com as porfirinas coordenadas a complexos de platina(II) sintetizadas por Naik e colaboradores, em 2014 [68], elas apresentam maior rendimento quântico, uma vez que a porfirina com maior rendimento quântico apresentado por Naik e colaboradores foi de 0,54. Quando as porfirinas tetraplatinadas são comparadas com a porfirina base-livre (4cisPtTPyP) sintetizada por Hu e colaboradores (2017) [69], elas apresentaram Φ_{Δ} similares, visto que a porfirina 4cisPtTPyP dos autores apresentou $\Phi_{\Delta} = 0,76$.

2.3.3.3. Fotoestabilidade

A fotoestabilidade de um fotosensibilizador é parâmetro importante em terapia fotodinâmica. Moléculas que são mais fotoestáveis tendem a manter suas características fotofísicas (Φ_F , Φ_{Δ} , τ_f , entre outras) por um período maior após serem submetidas a determinada irradiação. Uma espécie que sofre fotobranqueamento pode se submeter a reações paralelas de modo que sua estrutura pode ser modificada, deixando, assim, de absorver luz nos comprimentos de onda os quais absorveria antes de sofrer este processo [14, 66]. Acredita-se que o principal causador do fotobranqueamento seja o oxigênio

singleto gerado pela própria molécula a qual deu origem, contudo a irradiação também pode fotobranquear a molécula [66, 86]. A fotoestabilidade pode ser acompanhada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível ou pela espectroscopia de fluorescência [87].

Os ensaios para determinar o coeficiente de fotobranqueamento foi realizado em soluções da porfirina em DMSO, na presença de laser monocromático em dois comprimentos de onda distintos: 417 nm (Banda Soret) e 587 nm (Banda Q). Os espectros de UV-vis com irradiações nestes dois comprimentos de onda são apresentados nas Figura 22 e Figura 23. Os espectros de fotobranqueamento da porfirina **3-H₂TPyP** e **4-H₂TPyP** foram omitidos, pois apresentaram um perfil de fotobranqueamento semelhante às suas respectivas porfirinas platinadas, ou seja, apenas com o decréscimo das bandas no espectro eletrônico.

O coeficiente de fotobranqueamento (ϕ_{FB}) foi determinado a partir da equação a seguir:

Equação 5 – Equação para determinar o coeficiente de fotobranqueamento.

$$\phi_{FB} = (C_0 - C_t) \cdot V / t \cdot N_p \cdot (1 - 10^{-A})$$

C₀ e **C_t** são as concentrações relativas ao fotosensibilizador no tempo zero (inicial) e no tempo “t” (segundos) após o início da irradiação, **V** é o volume na cubeta, em litros, **t** refere-se ao tempo de irradiação em segundos, **N_p** é o fluxo de fótons (Einstein s⁻¹) que atravessa a cubeta e **A** corresponde a absorção da porfirina no comprimento de onda de excitação no tempo zero.

Figura 22 - Ensaio de fotobranqueamento via espectroscopia na região do UV-vis da porfirina **3-H₂TPtPyP**, em DMSO, quando irradiada com laser em 417 nm e 587 nm.

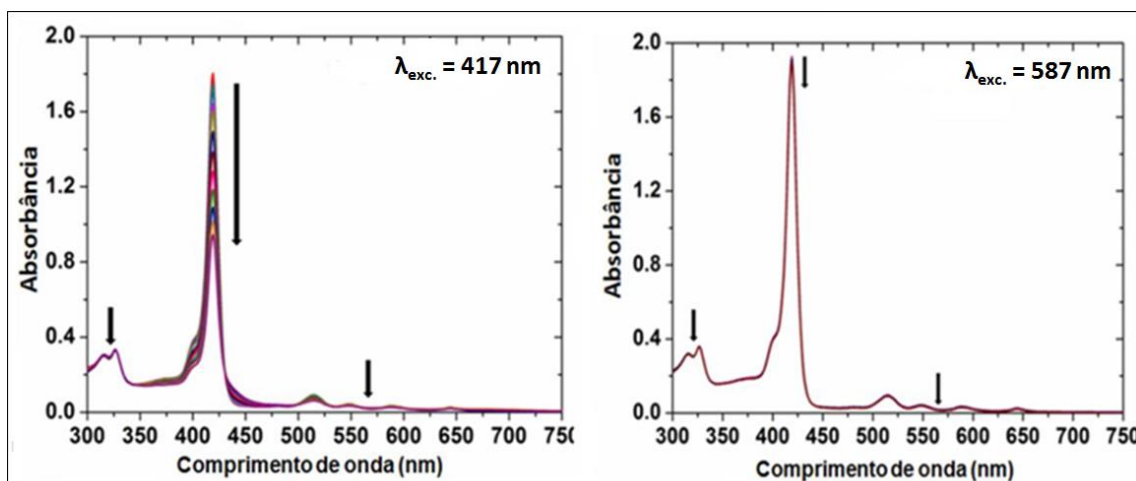
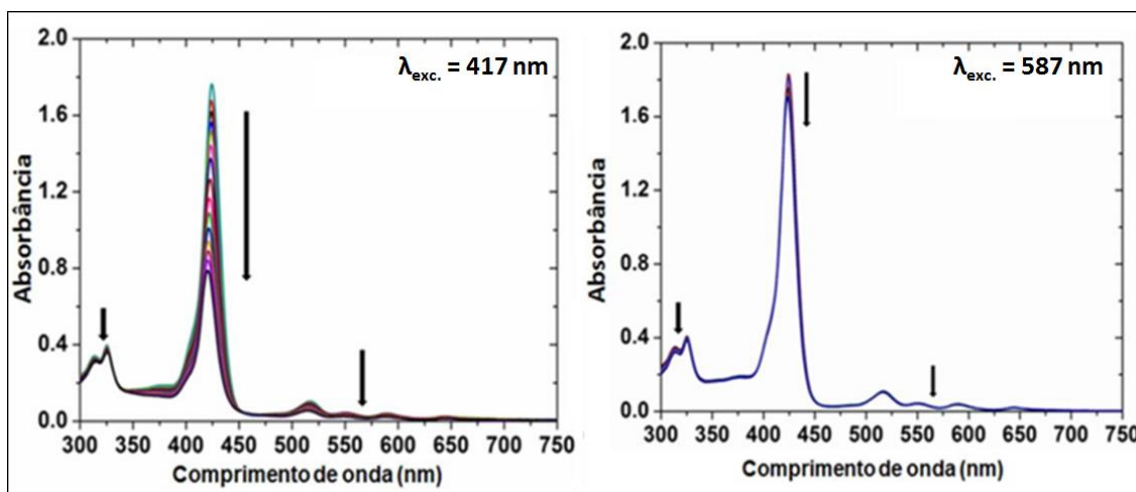


Figura 23 - Ensaio de fotobranqueamento via espectroscopia na região do UV-vis da porfirina **4-H₂TPtPyP**, em DMSO, quando irradiada com laser em 417 nm e 587 nm.



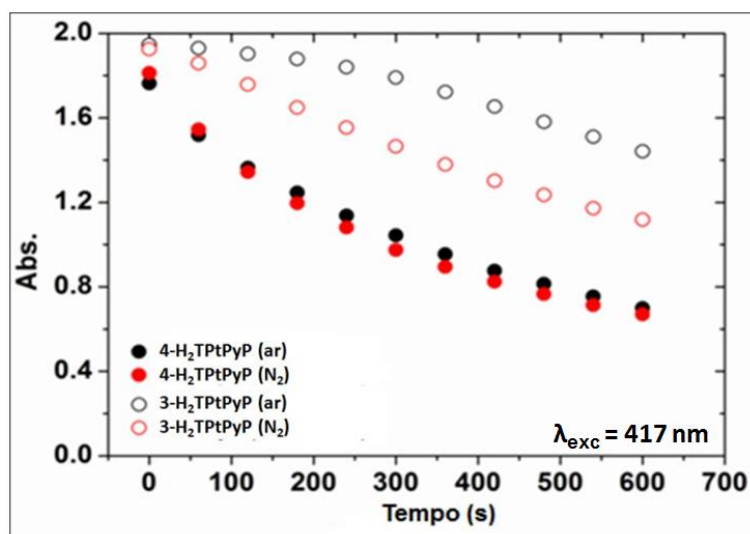
A Tabela 5 apresenta os respectivos coeficientes de fotobranqueamento calculados para os compostos **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**, após irradiações em 417 nm e 587 nm, atmosfera ambiente. Além disso, com o objetivo de determinar se a fotodegradação ocorre pela presença de espécies reativas de oxigênio ou pela fonte luminosa, ensaios de fotobranqueamento foram realizados em atmosfera ambiente e inerte (N₂). Para isto, cada porfirina tetraplatinada foi submetida a irradiações em 417 nm (banda Soret) por um tempo máximo de dez minutos, com intervalos a cada minuto para determinar a absorbância da banda Soret. O gráfico da Figura 24 apresenta a plotagem das absorbâncias da banda Soret das respectivas porfirinas

tetracatiônicas a cada um minuto de irradiação, e a Tabela 5 exibe os coeficientes de fotobranqueamento calculados para as porfirinas estudadas nos respectivos comprimentos de onda de irradiação.

Tabela 5 – Coeficientes de fotobranqueamento das porfirinas após irradiações na Banda Soret (417 nm) e Banda Q (587 nm).

Porfirina	Coeficientes de Fotobranqueamento ($\times 10^4$)	
	Excitação (417 nm)	Excitação (587 nm)
3-H ₂ TPyP	14,6	0
4-H ₂ TPyP	8,9	0
3-H ₂ TPtPyP	2,3	0,34
4-H ₂ TPtPyP	17,0	2,8

Figura 24 - Gráfico comparativo dos ensaios de fotobranqueamento para a 3-H₂TPtPyP e a 4-H₂TPtPyP em atmosfera ambiente e atmosfera inerte (N₂) após irradiação em 417 nm por dez minutos.



Pôde ser observado nos espectros de UV-vis e pelos coeficientes de fotobranqueamento que em irradiações em 417 nm, ocorreu maior redução das bandas de absorção das espécies. Este fato deve-se a maior absorvância das porfirinas na região da Banda Soret e da fonte luminosa que é mais energética nesta região do que a fonte luminosa em 587 nm. Entre as porfirinas tetraplatinadas, a 3-H₂TPtPyP apresentou-se como a porfirina mais fotoestável tanto em irradiações em 417 nm quanto em 587 nm. Outro detalhe a ser destacado é que o fotobranqueamento das porfirinas ocorreu, basicamente, pela

ação da irradiação empregada no procedimento e não pela geração de ERO provenientes do fotosensibilizador, pois ensaios realizados em atmosfera ambiente e inerte (N₂) levaram a resultados próximos, além de que o perfil do espectro de absorção das porfirinas se manteve o mesmo durante os ensaios, ou seja, sem surgimento de novas transições, não indicando algum produto da fotodegradação. Como não houve o surgimento de nenhuma nova transição, acreditou-se que o fotobranqueamento esteve relacionado com o processo de abertura do anel porfirínico devido a energia da fonte luminosa ou a fotoredução da porfirina por meio da transferência de elétron para a mesma [87].

2.3.4. Fotoativação de micro-organismos

2.3.4.1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

As Tabela 6 e Tabela 7 apresentam os resultados após ensaios de microdiluição na ausência e na presença de luz (26 mW cm⁻²) por 90 minutos, respectivamente. A Tetra-meso-(4-metilpiridil)porfirina (TMePyP) foi utilizada para avaliar o efeito que a presença de Pt^{II} pode causar à fotoativação dos micro-organismos, uma vez que a TMePyP também é uma porfirina tetracatiônica, além de ser uma molécula que apresenta potencial atividade fotodinâmica frente a micro-organismos e células tumorais [88]. O solvente DMSO não apresentou toxicidade às bactérias.

Tabela 6 - CIM e CBM para a 3-H₂TPyP, 4-H₂TPyP, 3-H₂TPtPyP, 4-H₂TPtPyP e TMePyP em testes realizados na ausência de luz.

Porfirina	<i>E. coli</i> (Gram-negativa)		<i>S. aureus</i> (Gram-positiva)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)	($\mu\text{mol L}^{-1}$)
3-H ₂ TPyP	-----	-----	-----	498
4-H ₂ TPyP	-----	-----	-----	498
3-H ₂ TPtPyP	-----	-----	-----	629
4-H ₂ TPtPyP	-----	-----	-----	629
TMePyP	368	737	184	737

Tabela 7 - CIM e CBM para a **3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP**, **4-H₂TPtPyP** e TMePyP em testes realizados na presença de luz branca (26 mW cm⁻²).

Porfirinas	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	(Gram-negativa)		(Gram-positiva)	
	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
3-H₂TPyP	124	249	62	124
4-H₂TPyP	124	249	249	498
3-H₂TPtPyP	17,5	35,6	17,5	35,6
4-H₂TPtPyP	17,5	35,6	17,5	35,6
TMePyP	113	227	56	113

O ensaio de microdiluição na placa sem irradiação mostrou que as porfirinas não inibiram o crescimento microbiano com exceção da molécula de referência TMePyP. A determinação da CBM, no escuro, demonstrou que para *S. aureus*, todas as porfirinas sintetizadas foram capazes de eliminar as bactérias Gram-positivas, em concentrações consideradas altas (acima de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Para o ensaio realizado sob irradiação, as porfirinas apresentaram atividade fotodinâmica para as duas colônias de bactérias, sendo a **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**, aproximadamente, sete vezes mais eficientes que a **3-H₂TPyP** e **4-H₂TPyP**, para testes com *E. coli*. Em procedimentos realizados com *S. aureus*, a **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** foram, aproximadamente, três vezes mais eficazes que as precursoras. É possível observar que a CBM é sempre duas vezes o valor da CIM para as respectivas bactérias. O valor destoante da **4-H₂TPyP** para a CIM (249 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para *S. aureus* pode estar associado a baixa solubilidade inerente da própria **4-H₂TPyP** no solvente utilizado para o ensaio (DMSO).

Além da luz irradiada, foi possível observar que a presença de cargas também exerce papel importante na fotoativação destas bactérias, provavelmente devido à interação eletrostática entre as porfirinas e os grupos fosfato negativamente carregados que estão presentes nas paredes celulares destes micro-organismos, facilitando a assimilação das porfirinas carregadas para dentro da parede celular. Outro fator a ser destacado é o efeito causado pelos complexos bipyridínicos de Pt^{II}. As porfirinas tetracatiônicas **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP** quando comparadas com a TMePyP (porfirina tetracatiônica),

apresentaram melhores resultados, provavelmente por aumentarem a interação com componentes da membrana celular (fosfolipídeos), possivelmente por interações que obedecem a Teoria de Pearson, na qual a Pt^{II} (ácido macio) pode interagir com átomos como, por exemplo, o fósforo (base macia) dos grupos fosfatos da parede celular bacteriana, aumentando a permeabilidade da porfirina através das bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas.

2.3.4.2. Curva de viabilidade celular

Da Figura 25 a Figura 28 é apresentado a contagem das colônias de bactéria após o tratamento na ausência de luz e sob luz branca (26 mW cm^{-2}).

Figura 25 - Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL^{-1}) de *E. coli* após o tratamento com as porfirinas sintetizadas e a TMePyP, na ausência de luz.

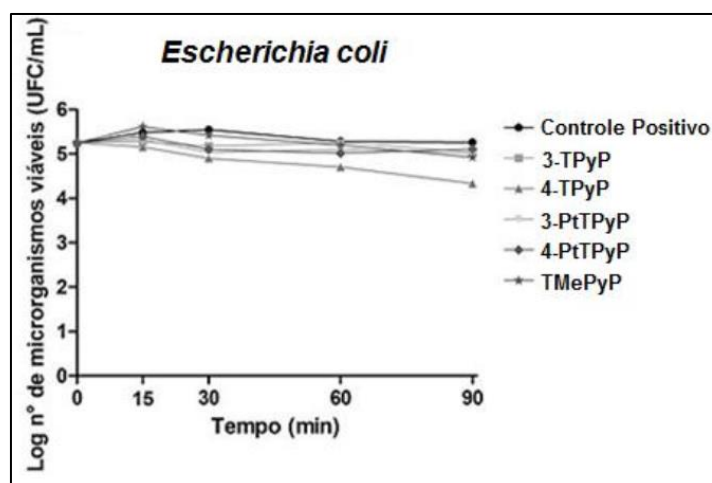


Figura 26 - Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL^{-1}) de *S. aureus* após o tratamento com as porfirinas sintetizadas e a TMePyP, na ausência de luz.

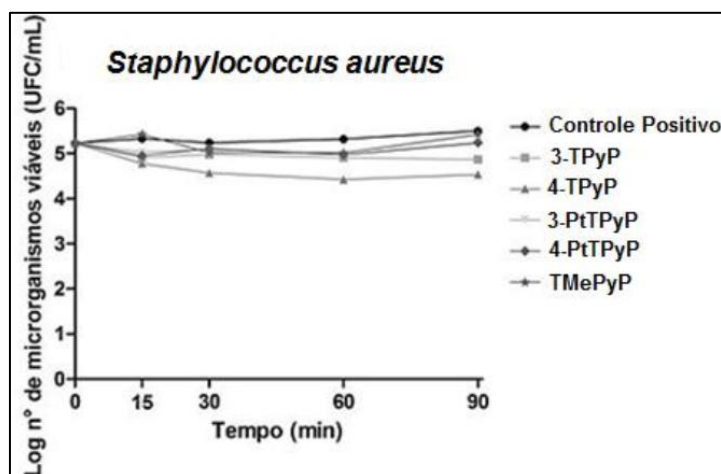


Figura 27 - Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL⁻¹) de *E. coli* após o tratamento com as porfirinas, na presença de luz branca (26 mW cm⁻²).

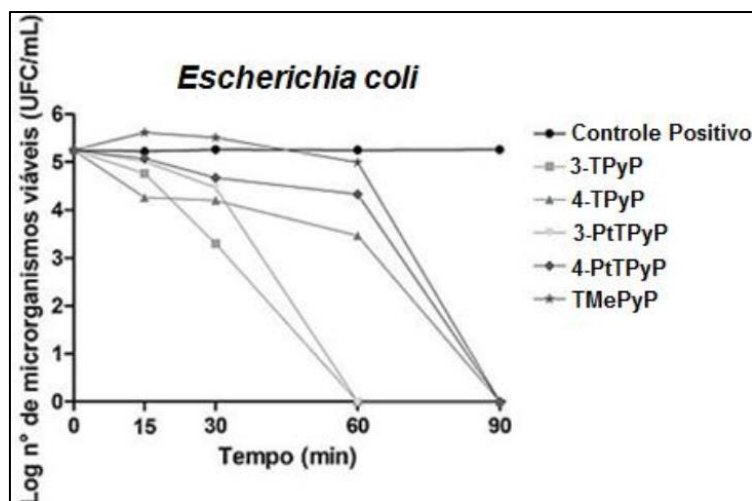
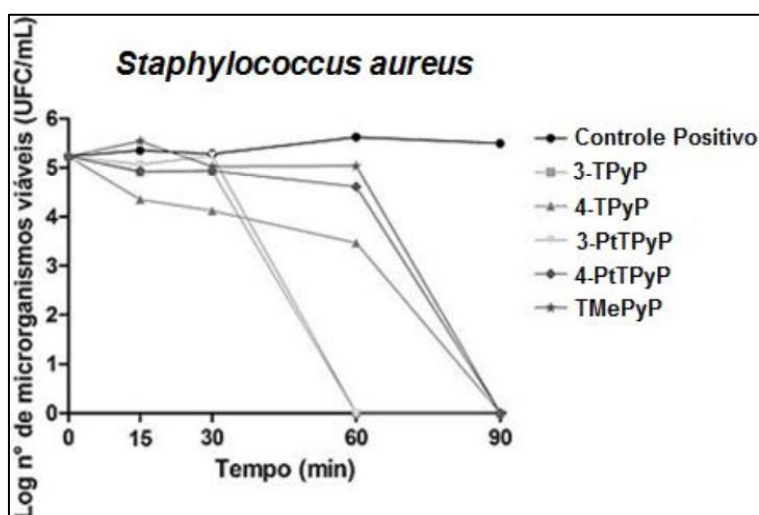


Figura 28 - Gráfico representando a contagem de colônias (UFC mL⁻¹) de *S. aureus* após o tratamento com as porfirinas, na presença de luz branca (26 mW cm⁻²).



Após a contagem das colônias, foi possível observar que sem a radiação houve uma queda no número de micro-organismos viáveis, porém, nenhum tratamento eliminou por completo as bactérias estudadas nos tempos determinados. A contagem dos micro-organismos expostos à luz branca demonstrou que as porfirinas **3-H₂TPyP** e **3-H₂TPtPyP** foram capazes de eliminar as bactérias em 60 minutos de exposição, enquanto a **4-H₂TPyP** e **4-H₂TPtPyP** eliminaram em 90 minutos, provavelmente pelo fato de que a conformação em “saddle” adquirida pela **3-H₂TPtPyP** pode proporcionar uma maior interação com os componentes da parede celular bacteriana.

As Figura 29 e Figura 30 apresentam imagens das contagens de colônias bacterianas em placas de petri após ensaios de atividade fotodinâmica e ensaios na ausência de luz, nas quais é possível observar o desaparecimento das colônias após o tratamento realizado sob luz branca.

Figura 29 - Contagem de colônias de *E. coli*, após 90 minutos de tratamento na ausência de luz (A) e sob irradiação (26 mW cm^{-2}) (B). Manchas brancas em (B) foram consideradas contaminações, visto que o tamanho das colônias difere daquelas presentes em (A).

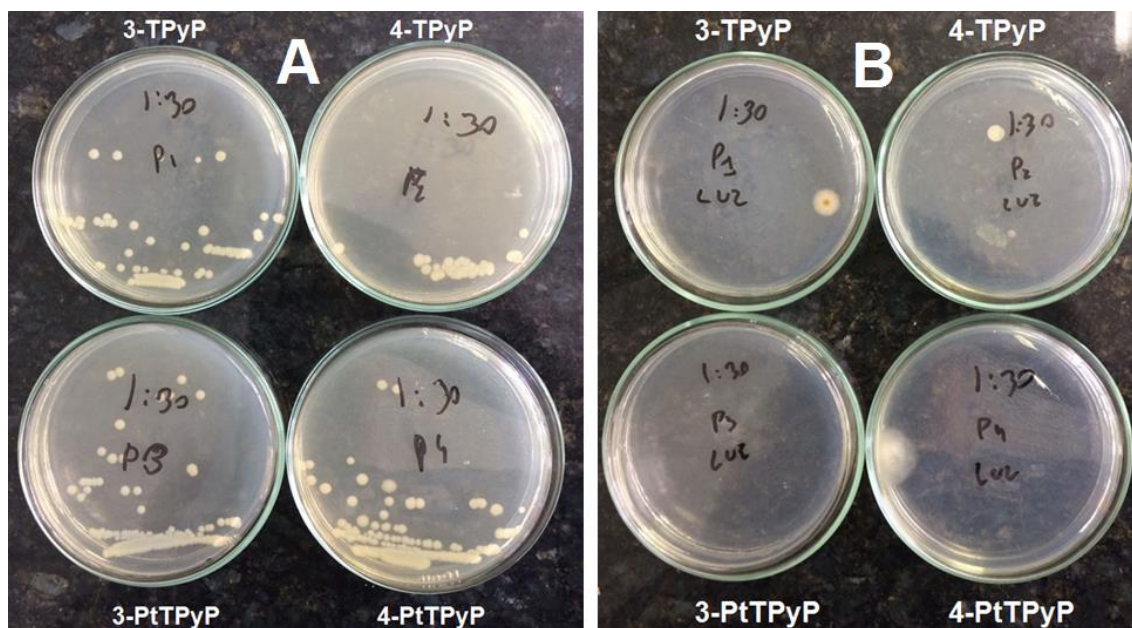
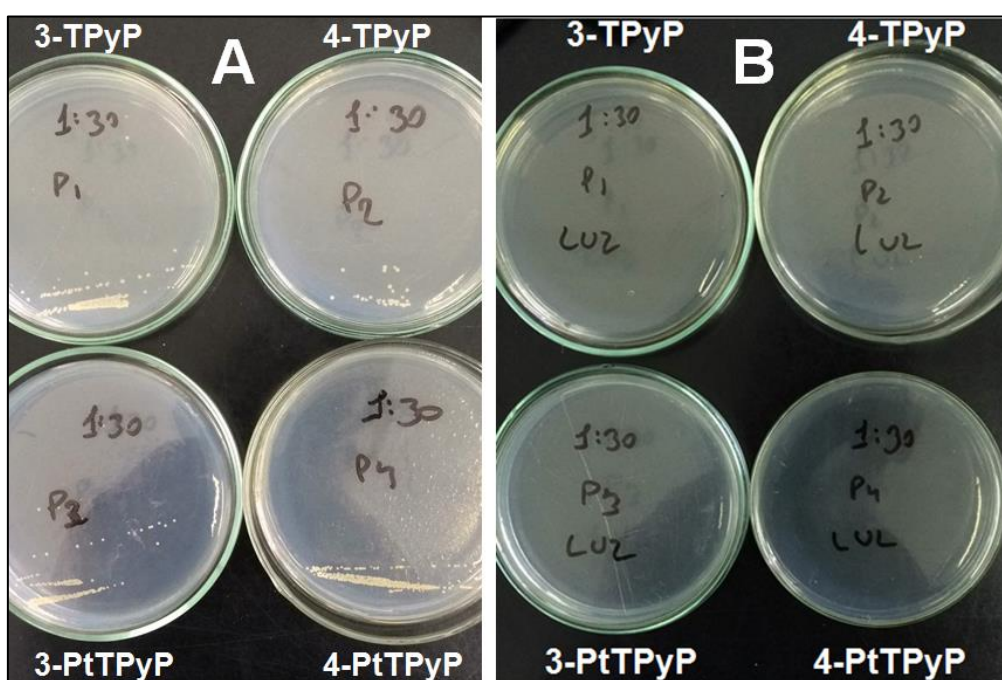


Figura 30 - Contagem de colônias de *S. aureus*, após 90 minutos de tratamento na ausência de luz (A) e sob irradiação (26 mW cm^{-2}) (B).



3. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia sintética proposta por Naue e colaboradores (2009), porfirinas tetra-*meso*-substituídas (**3-H₂TPyP**, **4-H₂TPyP**, **3-H₂TPtPyP** e **4-H₂TPtPyP**) foram sintetizadas e caracterizadas por análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta/visível e do infravermelho, além de suas propriedades fotofísicas como rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico de geração de ¹O₂ e coeficiente de fotobranqueamento.

Apesar das porfirinas apresentarem baixos rendimentos quânticos de fluorescência, elas foram consideradas boas geradoras de oxigênio singleto sendo importantes para a fotoinativação de micro-organismos como as bactérias *Escherichia coli* (*Gram*-negativa) e *Staphylococcus aureus* (*Gram*-positiva). Entretanto, porfirinas associadas a complexos de Pt^{II} apresentaram tempos de vida menores que as precursoras, o que pode estar relacionado com o efeito do átomo pesado causado pela presença de átomos de Pt^{II} que estaria facilitando o processo de desativação dos estados excitados das moléculas.

A atividade das porfirinas frente a estes micro-organismos foi mais evidente após a irradiação com luz branca (26 mW cm⁻²), promovendo a eliminação das bactérias em até 90 minutos de iluminação. Além disso, a presença de cargas positivas presentes na molécula se mostrou importante para a fotoinativação, uma vez que as bactérias apresentam grupos fosfato negativamente carregados na parede celular e são capazes de interagir eletrostaticamente com as porfirinas. Outro fator que pode potencializar a fotoinativação é a possibilidade da Pt^{II} interagir com o fósforo de modo a respeitar a Teoria de Pearson e facilitar a assimilação das porfirinas para dentro das células bacterianas e, conseqüentemente, alcançar melhores atividades fotodinâmicas.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pesquisas futuras envolvendo outros micro-organismos poderão ser realizadas em colaboração com outros departamentos de pesquisa da UFSM. Além disso, a coordenação ao anel porfirínico de piridil-porfirinas por diferentes centros metálicos como, por exemplo, os íons Zn^{II} , o Cu^{II} , o Ni^{II} , poderá ser realizada para avaliar as diferenças nas atividades fotodinâmicas quando se coordena diferentes íons metálicos. As atividades fotodinâmicas exibidas pelas porfirinas sintetizadas neste trabalho apresentaram-se promissoras e as credenciam para ensaios com micro-organismos como vírus, fungos e até outras bactérias mais resistentes que as utilizadas, além de testes que poderão ser realizados em células tumorais.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ - H. Toma. *Química Bioinorgânica e Ambiental*, volume 1, **2015**, 270.
- ² - L. R. Milgrom. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, volume 1, **1997**, 249.
- ³ - P. Rothemund. *Journal of the American Chemical Society*, **1935**, 57, 2010 – 2011.
- ⁴ - A. D. Adler, F. R. Longo, W. Shergalis. *Journal of the American Chemical Society*, **1964**, 86, 3145 – 3149.
- ⁵ - J. S. Lindsey, I. C. Schreiman, H. C. Hsu. *Tetrahedron Letters*, **1986**, 27, 4969 – 4970.
- ⁶ - A. Satake, Y. Kobuke. *Tetrahedron*. **2005**, 61, 13 – 41.
- ⁷ - I. J. Macdonald, T. J. Dougherty. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105 – 129.
- ⁸ - R. Song, Y. Kim, C. O. Lee, Y. S. Sohn. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 1537 – 1540.
- ⁹ - B. Rosenberg. *Platinum Metals Review*, **1971**, 15, 42 – 51.
- ¹⁰ - T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard. *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 3436 – 3486.
- ¹¹ - A. Bhargava, U. N. Vaishampayan. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2009**, 18, 1787 – 1797.
- ¹² - X. Wang, Z. Gou. *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42, 202 – 224.
- ¹³ - M. H. Abdel-Kader. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*. Primeira Ed., **2014**, 312.
- ¹⁴ - F. I. Simplício, F. Maionchi, N. Hioka. *Química Nova*, **2002**, 25, 801 – 807.
- ¹⁵ - J. A. Naue, S. H. Toma, J. A. Bonacin, K. Araki, H. E. Toma. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2009**, 103, 182 – 189.
- ¹⁶ - T. J. Foster. *Nature*. **2005**, 3, 948 – 958.
- ¹⁷ - J. B. Kaper, J. B. J. P. Nataro, H. L. T. Mobley. *Nature*, **2004**, 2, 123 – 140.

-
- ¹⁸ - G. J. Tortora, B. R. Funke, L. C. Case. *Microbiologia*, Décima Ed., **2012**, 940.
- ¹⁹ - I. J. Macdonald, T. J. Dougherty. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105 – 129.
- ²⁰ - M. B. Smith, J. March. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. Sexta Ed., **2007**, 2357.
- ²¹ - K. Kadish, K. Smith, R. Guilard. *The Porphyrins Handbook*, Primeira Ed., **1999**, 405.
- ²² - B. A. Iglesias. *Síntese e Propriedades Espectroscópicas e Eletroquímicas de uma Triazeno-Porfirina*, Tese (Doutorado Química), **2012**, 234.
- ²³ - M. Gouterman. *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, 6, 138 – 163.
- ²⁴ - X. Huang, K. Nakanishi, N. Berova. *Chirality*, **2000**, 12, 237 – 255.
- ²⁵ - N, Faria de Sales, H. S. Mansur. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2009**, 9, 688 – 691.
- ²⁶ - J. C. Manton, C. Long, L. G. Vos, M. T. Pryce. *Dalton Transactions*, **2014**, 43, 3576 – 3583.
- ²⁷ - D. A. Skoog. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*, Oitava Ed., **2006**, 1026.
- ²⁸ - A. S. A. Aziz, C. E. J. Carraher, P. D. Harvey, C. U. J. Pittman, M. Zeldin. *Macromolecules Containing Metal and Metal-like Elements: Photophysics and Photochemistry of Metal-Containing Polymers*. Décima Ed., **2010**, 432.
- ²⁹ - M. Kasha. *Discussions on the Faraday Society*. **1950**, 9, 14 – 19.
- ³⁰ - A. J. Maestrin, A. Tedesco, C. R. Neri, M. F. Gandini, O. A. Serra, Y. Iamamoto. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2004**, 15, 708 – 713.
- ³¹ - L. G. Arnaut. *Chemistry: A European Journal*, **2014**, 20, 5346 – 5357.
- ³² - N. Nijegorodov, P. V. C. Luhanga, J. S. Nkoma, D. P. Winkoun. *Spectrochimica Acta Part A*, **2006**, 64, 1 – 5.
- ³³ - J. R. Lakovicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Terceira Ed., **2006**, 954.

-
- ³⁴ - T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard. *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 3436 – 3486.
- ³⁵ - R. G. Pearson. *Journal of the American Chemical Society*, **1963**, 85, 3533 – 3539.
- ³⁶ - X. Wang, Z. Gou. *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42, 202 – 224.
- ³⁷ - L. M. O. Lourenço, B. A. Iglesias, P. M. R. Pereira, H. Girão, R. Fernandes, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, J. P. C. Tomé. *Dalton Transactions*, **2015**, 44, 530 – 538.
- ³⁸ - V. A. Oliveira, B. A. Iglesias, B. L. Auras, A. Neves, H. Terenzi. *Dalton Transactions*, **2017**, 46, 1660 – 1669.
- ³⁹ - D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain. *Nature*, **2003**, 3, 380 – 387.
- ⁴⁰ - A. E. H Machado. *Química Nova*, **2000**, 23, 237 – 243.
- ⁴¹ - G. Jori. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1996**, 36, 87 – 93.
- ⁴² - M. R. Hamblin, T. Hasan. *Photochemical and Photobiological Science*, **2004**, 3, 436 -450.
- ⁴³ - J. R. Perussi. *Química Nova*, **2007**, 30, 988 – 994.
- ⁴⁴ - O. Raab. *Zeitung Biology*, **1900**, 39, 524 – 526.
- ⁴⁵ - H. Von Tappeiner, A. Jesionek. *Munchener Medizinische Wochenschrift*, **1903**, 47, 2042 – 2044.
- ⁴⁶ - W. Hausmann. *Biochem Zeitung*, **1911**, 30, 276 – 316.
- ⁴⁷ - F. Meyer-betz. *Dtsch Arch Klin*, **1913**, 112, 476 – 503.
- ⁴⁸ - T. Dougherty. *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, 90, 889 – 905.
- ⁴⁹ - L. M. Baltazar, A. Ray, D. A. Santos, P. S. Cisalpino, A. J. Friedman, J. D. Nosanchuk. *Frontiers of Microbiology*, **2015**, 6, 1 – 11.
- ⁵⁰ - J. N. Ribeiro, A. V. Flores. *Physicae*, **2005**, 5, 5 – 14.
- ⁵¹ - P. Agostinis et al. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2011**, 61, 250 – 281.
- ⁵² - L. B. Josefsen, R. W. Boyle. *Metal-Based Drugs*, **2008**, 2008, 1 -24.

-
- ⁵³ - M. Triesschejin, P. Bass, J. H. M. Schellens, F. A. Stewart. *The Oncologist*, **2006**, 11, 1034 – 1044.
- ⁵⁴ - R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. Hu, C. J. H. Childs, C. H. Sibata. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 27 – 42.
- ⁵⁵ - L. Li, K. M. Huh. *Biomaterials Research*, **2014**, 18, 1 – 14.
- ⁵⁶ - A. Master, M. Livingston, A. S. Gupta. *Journal of Controlled Release*, **2013**, 168, 88 – 102.
- ⁵⁷ - J. P. Muller, B. C. Wilson. *Seminars in Surgical Oncology*, **1995**, 11, 346 – 354.
- ⁵⁸ - J. Z. S. Silva, S. K. Bussadori, K. P. S. Fernandes, Y. Huang, M. R. Hamblin. *Bioscience Report*, **2015**, 35, 1 – 14.
- ⁵⁹ - M. C. Derosa, R. J. Crutchley. *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233 – 234, 351 -371.
- ⁶⁰ - I. Kruk. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Segunda Ed., **1998**, 264
- ⁶¹ - D. B. Min, J. M. Boff. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2002**, 58 – 72.
- ⁶² - J. Ribeiro. *Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinâmicos da Ftalocianina de Zinco em meios Homogêneo e Microheterogêneo*, Dissertação (Mestrado Química), **2003**, 119.
- ⁶³ - F. Wilkinson, P. W. Helman, A. B. Ross. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **2009**, 24, 663 -1021.
- ⁶⁴ - C. R. Pivetta, B. L. Auras, B. de Souza, A. Neves, F. S. Nunes, L. H. Z. Cocca, L. de Boni, B. A. Iglesias. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2017**, 332, 306 – 315.
- ⁶⁵ - A. Ogunsipe, D. Maree, T. Nyokong. *Journal of Molecular Structure*, **2003**, 650, 131 – 140.
- ⁶⁶ - R. Bonnet, G. Martínez. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9513 – 9547.
- ⁶⁷ - J. Golab et al. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 407 – 414.

-
- ⁶⁸ - A Naik, R. Rubbiani, G. Gasser, B. Spingler. *Angewandte Chemie International Edition*, **2014**, 53, 6938 – 6941.
- ⁶⁹ - X. Hu, K. Ogawa, T. Kiwada, A. Odani. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2017**, 170, 1 – 7.
- ⁷⁰ - M. Durmus, V. Ahsen. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2010**, 104, 297 – 209.
- ⁷¹ - B. R. Vummidi, F. Noreen, J. Alzeer, K. Moelling, N. W. Luedtke. *ACS Chemical Biology*, **2013**, 8, 1737 – 1746.
- ⁷² - E. Reddi, M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini, U. Muzzucato. *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75, 462 – 470.
- ⁷³ - S. Schastak, S. Zinganshyna, B. Gitter, P. Wiedemann, T. Claudepierre. *PLoS ONE*, **2010**, 5, 1 – 8.
- ⁷⁴ - Y. Liu, R. Qin, S. A. J. Saat, E. Breukink, M. Heger. *Journal of Clinical and Translational Research*, **2015**, 1, 140 – 167.
- ⁷⁵ - E. Alves, L. Costa, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha, A. Almeida. *BMC Microbiology*, **2009**, 9, 1 -13.
- ⁷⁶ - E. Alves, L. Costa, C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tomé, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha, A. Almeida. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 35, 1447 – 1454.
- ⁷⁷ - G. Jori, S. B. BROWN. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2004**, 3, 403 – 405.
- ⁷⁸ - F. F. Sperandio, Y. Huang, M. R. Hamblin. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **2013**, 8, 108 – 120.
- ⁷⁹ - A. J. Naue. *Química Supramolecular de Tetrapiridilporfirinas Associadas a Complexos de Platina(II)*, Tese (Doutorado Química Inorgânica), **2006**, 175.
- ⁸⁰ - L. Q. S. Lopes, C. G. Santos, R. A. Vaucher, L. Gende, R. P. Raffin, R. C. V. Santos. *Microbial Pathogenesis*, **2016**, 97, 183 – 188.

-
- ⁸¹ - K Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, Sexta Ed., **2009**, 408.
- ⁸² - M. T. STAUFFER. *Applications of Molecular Spectroscopy to Current Research in the Chemical and Biological Sciences*, **2016**, 428.
- ⁸³ - A. M. Brouwer. *Pure and Applied Chemistry*, **2011**, 83, 2213 – 2228.
- ⁸⁴ - Y. Usui. *Chemistry Letters*, **1973**, 2, 743 – 744.
- ⁸⁵ - E. J. Lim, C. Oak, J. Heo, Y. Kim. *Oncology Reports*, **2013**, 30, 856 – 862.
- ⁸⁶ - R. Bonnet, et al. *Tetrahedron*, **1999**, 53, 136 – 143.
- ⁸⁷ - R. Ratomskis, S. Bagdonas, G. Streckyte. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **1996**, 33, 61 – 67.
- ⁸⁸ - A. Hanakova, K. Bogdanova, K. Tomankova, K. Pizova, J. Malohlava, S. Binter, R. Bajgar, K. Langova, M. Kolar , J. Mosinger, H. Kolarova. *Microbiological Research*, **2014**, 169, 163 – 170.