

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

Carolina Hahn da Silveira

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO INTERATIVO COM DNA
DE *MESO*-TETRA(1-NAFTIL)PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS**

Santa Maria, RS
2018

Carolina Hahn da Silveira

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO INTERATIVO COM DNA
DE *MESO*-TETRA(1-NAFTIL)PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS**

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
2018

Hahn da Silveira , Carolina
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO INTERATIVO COM DNA
DE MESO-TETRA(1-NAFTIL)PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS /
Carolina Hahn da Silveira .- 2018.
100 p.; 30 cm

Orientador: Bernardo Almeida Iglesias
Coorientador: Gilson Rogerio Zeni
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2018

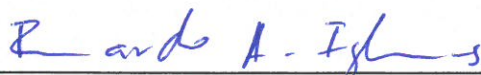
1. Porfirina, metaloporfirina, DNA. I. Almeida
Iglesias, Bernardo II. Rogerio Zeni, Gilson III. Título.

Carolina Hahn da Silveira

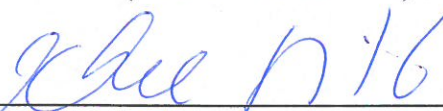
**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO INTERATIVO COM DNA
DE MESO-TETRA(1-NAFTIL)PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS**

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.

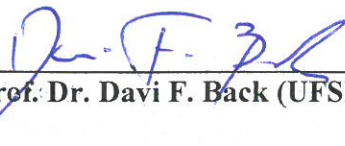
Aprovado em 05/07/2018 :



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



Profa. Dra. Michele Sagrillo (UFN)



Prof. Dr. Davi F. Back (UFSM)

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo por possibilitar a minha chegada até aqui.

Ao meu professor orientador Bernardo Almeida Iglesias, pelos ensinamentos, paciência e suporte para que esse trabalho pudesse ser feito da melhor maneira possível.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao professor Roberto Christ Vianna Santos e Márcia Ebling da UFSM, pelo auxílio na pesquisa de aplicação em microrganismos.

Ao Paulo F. B. Gonçalves (UFRGS), Munique Rodrigues Pereira (UFRGS) e Otávio Augusto Chaves (UFRRJ), por terem contribuído de maneira a engrandecer esta pesquisa com seus estudos.

Ao Laboratório de Análises Químicas LACHEM, por disponibilizar equipamento para uso.

Ao professor Davi Fernando Back pelos ensinamentos, atenção e por sempre se dispor a ajudar no que precisei.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Josiéli, Sid, Chico, Renne, Joice, Thiago, Manu, Letícia, Vithória, Gilvana, Lucas, Jennyfer, Tanize, pela amizade, paciência, conversas e ensinamentos.

As meninas, amigas e companheiras de apartamento, Fernanda e Jéssica.

Ao Guilherme, amigo de todas as horas, pela força que me deu nos momentos difíceis que passei.

Um agradecimento especial as funcionárias de laboratório e amigas, Daniela, Maria e Rosangela pelas conversas descontraídas.

A minha mãe por não ter desistido de me ensinar a ler, escrever e calcular. Ao meu pai por ter dado apoio tanto emocional quanto financeiro. Agradeço a minha irmã por ser a melhor amiga e irmã.

“O indivíduo pacífico permanece calmo até quando necessita trabalhar; então ele passa à ação. E tão logo termina, volta ao seu centro de calma. Seja sempre calmo, como o pêndulo, que é imóvel, mas pronto para agir sempre que necessário.”

Paramahansa Yogananda

RESUMO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO INTERATIVO COM DNA DE *MESO*-TETRA(1-NAFTIL)PORFIRINAS E SEUS COMPLEXOS

AUTOR: Carolina Hahn da Silveira
ORIENTADOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

Este trabalho teve como intuito a síntese da *meso*-tetra(1-naftil)porfirina e seus derivados metalados com metais da primeira série de transição (Zn^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} , Co^{III} , Mn^{III}). Os compostos foram caracterizados por análise elementar, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de 1H e ^{13}C , espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta-visível e do infravermelho, espectroscopia de emissão fluorescente e voltametria cíclica. Somando-se a isso, também foram desenvolvidos estudos de agregação das porfirinas em solução, fotoestabilidade, geração de oxigênio singlete e cálculos teóricos por DFT. A interação das porfirinas com o ct-DNA foi avaliada tanto experimentalmente (via espectroscopia UV-vis e de emissão), quanto através de *docking* molecular. Em ambos, observou-se a capacidade dos derivados estabelecerem interações, sendo as principais forças de ligação as interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas. Além disso, também foi feita a avaliação prévia da atividade fotodinâmica destes compostos frente a microrganismos.

Palavras-chave: Porfirina, metaloporfirina, DNA.

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND DNA INTERACTIVE STUDY WITH *MESO*-TETRA(1-NAFTIL)PORPHYRINES AND ITS COMPLEXES

AUTHOR: Carolina Hahn da Silveira

ADVISOR: Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias

This study aimed to synthesize *meso*-tetra(1-naphthyl)porphyrin and its metalloporphyrin derivatives with metals of the first transition series (Zn^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} , Co^{III} , Mn^{III}). The compounds were characterized by elemental analysis, mass spectrometry, 1H e ^{13}C nuclear magnetic resonance, electron spectroscopy in ultraviolet- visible and infrared regions, fluorescence emission spectroscopy and cyclic voltammetry. In addition, studies of porphyrin aggregation in solution, photostability, singlet oxygen generation and theoretical calculations by DFT were also evaluated. The interaction of the porphyrin compounds with the ct-DNA were evaluated for experimentally (via UV-vis and emission spectroscopy) and through molecular docking. In both, the ability of the derivatives to establish interactions was observed, with the main binding forces being the Van der Waals interactions and hydrophobic interactions. In addition, the previous photodynamic activity of these compounds against microorganisms was also evaluated.

Keywords: porphyrins, metalloporphyrins, DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação geral das estruturas dos compostos sintetizados.....	25
Figura 2: Representação estrutural de um anel macrociclo de uma porfirina.	27
Figura 3: Imagem representativa dos tipos de interações com o DNA.	32
Figura 4:(a) Espectros de absorção UV-vis e (b) Espectros de emissão fluorescente em soluções de DMSO.....	50
Figura 5: Vista frontal das estruturas otimizadas dos compostos estudados obtidos pelo conjunto de base DFT//cc-pVDZ.	56
Figura 6: Vista lateral das estruturas otimizadas dos compostos estudados obtidos pelo conjunto de base DFT//cc-pVDZ.	56
Figura 7: (a) Voltamograma cíclico comparativo de compostos das porfirinas e (b) processos de oxidação das porfirinas, em diclorometano anidro contendo 0,1 mol/L de TBAPF ₆ , como eletrólito de suporte, utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV/s.	58
Figura 8: Estudo de agregação para MnCITNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 470 nm em função da concentração.	59
Figura 9: Espectros de absorção UV-visível das porfirinas (a) TNafPor e (b) CuTNafPor, com concentração crescente de ct-DNA variando de 0,0 a 100 µM em DMSO (2%) - solução tampão Tris-HCl.....	62
Figura 10: Espectro de emissão de fluorescência em estado estacionário de EB ligado a ct-DNA na presença de (a) CuTNafPor e (b) MnCITNafPor, numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.	64
Figura 11: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos.	65
Figura 12: Curva de morte para os microrganismos Streptococcus mutans IC e o Streptococcus oralis IC, durante período de irradiação de 60 minutos.....	70

LISTA DE FIGURAS ANEXO

Figura Anexo 1: Espectro HRMS-ESI obtido para TNafPor.	76
Figura Anexo 2: Espectro HRMS-ESI obtido para ZnTNafPor.	77
Figura Anexo 3: Espectro HRMS-ESI obtido para CuTNafPor.	78
Figura Anexo 4: Espectro HRMS-ESI obtido para NiTNafPor.	78
Figura Anexo 5: Espectro HRMS-ESI obtido para CoCITNafPor.	79
Figura Anexo 6: Espectro HRMS-ESI obtido para MnCITNafPor.	79
Figura Anexo 7: Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da TNafPor, em CDCl_3 . * e ** = picos residuais.	80
Figura Anexo 8: Espectro de ^{13}C RMN (100 MHz) da TNafPor, em CDCl_3	80
Figura Anexo 9: Espectro de infravermelho da TNafPor em pastilha de KBr.	81
Figura Anexo 10: Espectro de infravermelho da ZnTNafPor em pastilha de KBr.	81
Figura Anexo 11: Espectro de infravermelho da CuTNafPor em pastilha de KBr.	82
Figura Anexo 12: Espectro de infravermelho da NiTNafPor em pastilha de KBr.	82
Figura Anexo 13: Espectro de infravermelho da CoCITNafPor em pastilha de KBr.	83
Figura Anexo 14: Espectro de infravermelho da MnCITNafPor em pastilha de KBr.	83
Figura Anexo 15: Espectro teórico para o composto TNafPor.	84
Figura Anexo 16: Espectro teórico para o composto ZnTNafPor.	84
Figura Anexo 17: Espectro teórico para o composto CuTNafPor.	85
Figura Anexo 18: Espectro teórico para o composto NiTNafPor.	85
Figura Anexo 19: Espectro teórico para o composto CoCITNafPor.	85
Figura Anexo 20: Espectro teórico para o composto MnCITNafPor.	86
Figura Anexo 21: Estudo de agregação para TNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 423 nm em função da concentração.	86
Figura Anexo 22: Estudo de agregação para ZnTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 432 nm em função da concentração.	87
Figura Anexo 23: Estudo de agregação para CuTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 424 nm em função da concentração.	87

Figura Anexo 24: Estudo de agregação para NiTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 420 nm em função da concentração.	88
Figura Anexo 25: Estudo de agregação para CoCITNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 424 nm em função da concentração.....	88
Figura Anexo 26:Espectros de absorção UV-vis de ZnTNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μ M. A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.	89
Figura Anexo 27:Espectros de absorção UV-vis de NiTNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μ M. A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.	89
Figura Anexo 28:Espectros de absorção UV-vis de CoCITNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μ M. A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.	90
Figura Anexo 29:Espectros de absorção UV-vis de CoCITNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μ M. A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.	90
Figura Anexo 30: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de TNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra	91
Figura Anexo 31: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de ZnTNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra	91
Figura Anexo 32: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de NiTNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.	92
Figura Anexo 33: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de CoCITNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.	92
Figura Anexo 34: Curva de morte para o microrganismo <i>Candida albicans</i> , durante período de irradiação de 60 minutos.....	93
Figura Anexo 35: Curva de morte para o microrganismo <i>Streptococcus salivarius</i> , durante período de irradiação de 60 minutos.....	93

Figura Anexo 36: Estrutura da 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).....	93
Figura Anexo 37: Representação estrutural do Photofrin [®]	94
Figura Anexo 38: Estrutura da ftalocianina de zinco.	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Representação da rota sintética geral de uma meso-tetra-(aril)porfirina proposta por Adler e colaboradores.	28
Esquema 2: Representação geral da rota sintética proposta por Lindsey e colaboradores.....	29
Esquema 3: Esquema da rota de síntese da meso-tetra(1-naftil)porfirina (TNafPor).	42
Esquema 4: Esquema geral da rota de síntese das metaloporfirinas utilizando acetato metálico.	44
Esquema 5: Esquema geral da rota de síntese utilizando cloreto metálico.	45
Esquema 6: Esquema representativo da reação do DPBF e $^1\text{O}_2$	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores encontrado para análise elementar.	47
Tabela 2: HRMS-ESI-(+)-TOF-MS das porfirinas (erro experimental < 5 ppm).	48
Tabela 3: Principais estiramentos (ν) e deformações (δ) na região do infravermelho (em pastilha de KBr).	49
Tabela 4: Dados fotofísicos de absorção e emissão fluorescente das porfirinas estudadas.	51
Tabela 5: Dados teóricos obtidos utilizando o cálculo ω B97XD/jun-cc-pVTZ calculado em DMSO.	53
Tabela 6: Valores de energia (em eV) calculados teoricamente para os orbitais HOMO e LUMO.	55
Tabela 7: Dados eletroquímicos da porfirina base-livre e metaloporfirinas em diclorometano anidro (versus Fc^+/Fc).	58
Tabela 8: Dados de rendimento quântico de oxigênio singleto das porfirinas, através da foto-oxidação do DPBF.	60
Tabela 9: Estudo de fotoestabilidade para as porfirinas em solução de DMSO.	61
Tabela 10: Dados espectrais para a interação de porfirinas com ct-DNA por absorção UV-vis e análise de emissão fluorescente no estado estacionário.	64
Tabela 11: Susceptibilidade bacteriana e fúngica das porfirinas através da disco de difusão.	67
Tabela 12: Concentração inibitória mínima (MIC) para as porfirinas meso-tetra(1-naftil) substituídas.	69
Tabela 13: Concentração bactericida mínima (CBM) para as porfirinas meso-tetra(1-naftil) substituídas.	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo para determinar rendimento quântico de oxigênio singleto.....	37
Equação 2: Cálculo das constantes intrínsecas de ligação (K_b) com o DNA.....	38
Equação 3: Cálculo das constantes de extinção de fluorescência de Stern-Volmer (K_{sv}).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TNafPor	<i>meso</i> -tetra(1-naftil)porfirina
ZnTNafPor	<i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]zinco(II)
CuTNafPor	<i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]cobre(II)
NiTNafPor	<i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]níquel(II)
CoCITNafPor	<i>meso</i> -tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}cobalto(III)
MnCITNafPor	<i>meso</i> -tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}mangans(III)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV-vis	Ultravioleta-visível
IV	Infravermelho
DCM	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
TFA	2,2,2-ácido trifluoracético
BF ₃ Et ₂ O	eterato de trifluoreto de boro
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
ESI	ionização via electrospray
δ	deslocamentos químicos
Ppm	parte por milhão
TMS	Tetrametilsilano
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
<i>J</i>	constante de acoplamento
Hz	Hertz
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
Φ_{Δ}	rendimento quântico de geração de oxigênio singlete
MIC	concentração mínima inibitória
CBM	concentração bactericida mínima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS.....	25
OBJETIVOS GERAIS.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1. Aspectos gerais	27
3.2. Metodologias de síntese de obtenção de porfirinas	27
3.3 Metaloporfirinas.....	29
3.4 Terapia fotodinâmica	30
3.5 Interação com DNA	31
4. EXPERIMENTAL	34
4.1 Reagentes	34
4.2 Ponto de Fusão.....	34
4.3 Análise Elementar.....	34
4.4 Espectrometria de massas	34
4.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
4.6 Espectroscopia na região do infravermelho.....	35
4.7 Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-vis)	35
4.8 Espectroscopia de emissão.....	35
4.9 Cálculo teórico.....	36
4.10 Voltametria Cíclica.....	36
4.11 Estudo de agregação	37
4.12 Fotoestabilidade	37
4.13 Geração de oxigênio singleto (Ensaio DPBF)	37
4.14 Ensaio de interação com biomoléculas	38
4.14.1 Análise de cálculo de <i>docking</i> molecular.....	39

4.15	Microrganismos	40
4.15.1	Avaliação da atividade antimicrobiana por disco de difusão	40
4.15.2	Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM)	40
4.15.3	Curva de morte	41
4.16	Síntese da <i>meso</i> -tetra(1-naftil)porfirina (TNafPor)	41
4.17	Sínteses: <i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]zinco(II) (ZnTNafPor), <i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]cobre(II) (CuTNafPor) e <i>meso</i> -tetra[(1-naftil)porfirinato]níquel(II) (NiTNafPor).....	42
4.18	Sínteses: <i>meso</i> -tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}cobalto(III) (CoCITNafPor) e <i>meso</i> -tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}manganês(III) (MnCITNafPor).	44
5.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	47
5.1	Síntese.....	47
5.2	Ponto de fusão e Análise elementar (CHN%).....	47
5.3	Espectrometria de Massas.....	47
5.4	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	48
5.5	Espectroscopia na região do Infravermelho.....	48
5.6	Espectroscopia de absorção na região do UV-vis e de emissão fluorescente.....	49
5.7	Cálculos teóricos DFT	51
5.8	Eletroquímica.....	57
5.9	Estudo de agregação das porfirinas.....	58
5.10	Rendimento quântico de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e fotoestabilidade das porfirinas.....	59
5.11	Interação com DNA	62
5.11.1	Estudos de absorção UV-vis com ct-DNA.....	62
5.11.2	Ensaio competitivo de emissão fluorescente de EB-DNA.....	63
5.11.3	<i>Docking</i> molecular	65
5.12	Estudo de interação com microrganismos	67
5.12.1	Teste de disco de difusão	67

5.12.2	Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM).	68
5.12.3	Curva de morte dos microrganismos.....	70
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	74
8.	ANEXOS.....	76
8.1	Espectros de massas	76
8.2	Espectros de Ressonância Magnética Nuclear.....	80
8.3	Espectros na região do Infravermelho	81
8.4	Espectros teóricos para a região do UV-vis.....	84
8.5	Espectros de absorção na região do UV-vis para estudos de agregação.....	86
8.6	Espectros de absorção UV-vis de estudos de interação com DNA	89
8.7	Espectros de emissão de estudos de interação com DNA.....	91
8.8	Curva de morte dos microrganismos	93
8.9	Estruturas	93
9.	REFERÊNCIAS	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os estudos das porfirinas estão nas mais diversas áreas, incluindo bioquímica, química, medicina, entre outras [1]. As porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos que estão presentes em sistemas biológicos, desempenhando funções específicas, como por exemplo a hemoglobina (transporte de oxigênio no sangue) e clorofila (captação de energia luminosa) [2].

Desde a síntese e comprovação da *heme* (porfirina complexada com íons Fe^{II} , presente na hemoglobina), novos estudos que possibilitam a obtenção desses compostos em laboratório, a partir do pirrol, vem sendo relatados desde a década de 1930, quando Rothemund e colaboradores [3] publicaram seus primeiros trabalhos. Porém, somente em 1980, Lindsey e colaboradores [4], dando continuidade aos estudos de Adler e colaboradores [5], sugeriram uma rota sintética na qual porfirinas *meso*-tetra-substituídas fossem o produto majoritário.

Para a síntese da porfirina *meso*-tetra-substituída desse trabalho, utilizou-se o método proposto por Gonsalves e colaboradores [6, 7]. A metodologia é análoga a de Adler [5], no entanto empregando uma mistura de ácido acético e nitrobenzeno como solvente. O nitrobenzeno é empregado como auxiliar na oxidação do porfirinogênio, intermediário na síntese da porfirina. Além disso, reduzindo ou evitando a formação de clorina.

Tendo em vista a aplicação em, por exemplo, terapia fotodinâmica, mimetização de moléculas fotossintéticas e interação com DNA [8, 9, 10], estudos que investigam as propriedades eletrônicas, químicas e fotofísicas de compostos porfirínicos vem sendo desenvolvidos.

A interação de macrociclos tetrapirrólicos com biomoléculas (como DNA, proteínas) consiste no objetivo de vários estudos de *design* de fármacos [11, 12]. Neste sentido, as porfirinas e metaloporfirinas representam uma classe importante de compostos que interagem com o DNA [13, 14]. Metaloporfirinas tem sido utilizada em vários campos de análise de interação com DNA, como mecanismo de quebras de DNA [15], sondas fluorescentes de DNA [16] e atividade enzimática de reparo de DNA [17].

Há um crescente interesse no estudo de complexos de metais de transição devido às suas diferentes geometrias de coordenação, processos redox e a capacidade diferenciada de interagir com o DNA, podendo ser interações dos tipos covalente ou não covalente [18]. Nas interações covalentes, a ligação pode ser irreversível, ocasionando a substituição de ligantes do complexo, interligação inter e intra-cadeia ou possível alquilação de bases nitrogenadas do DNA [19]. No caso dos processos não covalentes, há uma interação reversível na qual o composto interage

com biomoléculas por meio de intercalação, forças eletrostáticas ou interação no sulco maior/menor, desencadeando mudanças na estereoquímica do DNA, quebra de fita ou ainda inibindo a ligação ou interação proteína-DNA [20].

Uma outra abordagem do emprego de porfirinas é como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (PDT). O princípio da PDT baseia-se no emprego de uma molécula fotossensibilizadora que na presença de oxigênio e luz pode gerar espécies reativas de oxigênio, capazes de interagir com um substrato [9, 21, 22, 23]. Entre os propósitos da PDT estão a destruição de células cancerígenas, bem como a inativação e eliminação de microrganismos causadores de doenças [24, 25, 26].

Objetivos

2. OBJETIVOS

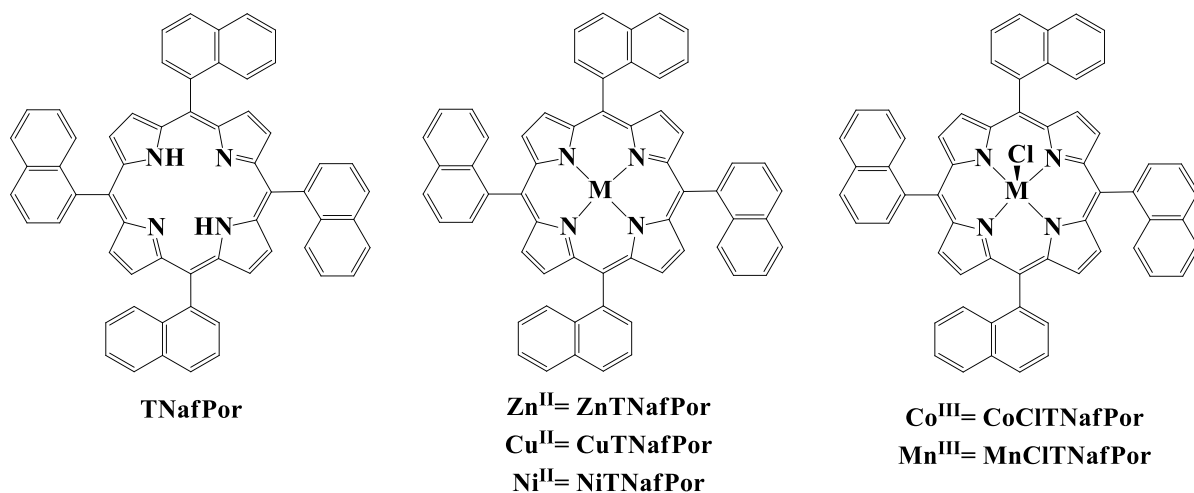
OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar metalo-naftil-porfirinas com metais da primeira série de transição, além da porfirina base-livre. Caracterizá-las utilizando técnicas espectroscópicas e eletroquímicas, avaliar a interação com biomoléculas e o efeito fotodinâmico em micro-organismos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar *meso*-tetra(1-naftil)porfirina
- Sintetizar metaloporfirinas de zinco(II), cobre(II), níquel(II), cobalto(III) e manganês(III).
- Caracterizar os compostos sintetizados utilizando técnicas como: análise elementar CHN%, espectrometria de massas de alta resolução (HRMS-ESI(+)), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , espectroscopia eletrônica nas regiões do ultravioleta-visível (UV-vis) e infravermelho (IV), espectroscopia de emissão fluorescente, eletroquímica.
- Avaliar propriedades fotofísicas por emissão fluorescente, rendimentos quânticos de fluorescência, fotoestabilidade e geração de oxigênio singleto.
- Analisar a interação desses compostos com ct-DNA por técnicas espectrofotométricas, bem como através de modelagem molecular.
- Avaliar o efeito fotodinâmico sobre microrganismos (bactérias e fungos).

Figura 1: Representação geral das estruturas dos compostos sintetizados.



Revisão de Literatura

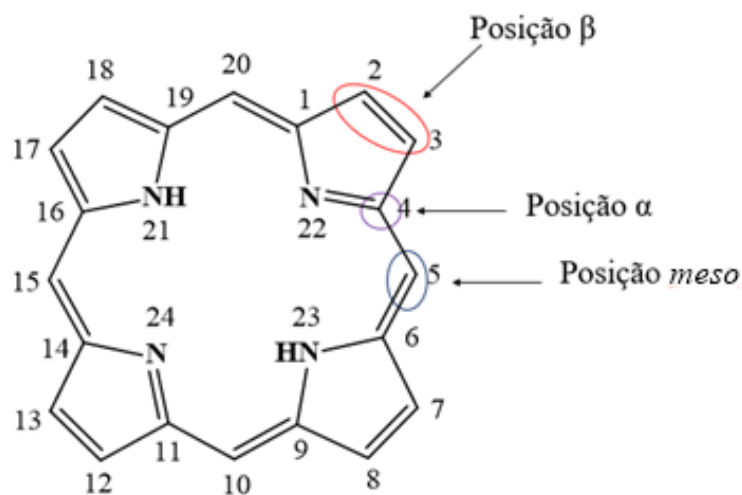
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais

A origem da palavra porfirina vem do grego “*porphura*”, cujo significado se refere à cor púrpura, que é uma característica principal dessa classe de compostos [1].

O anel porfirínico é constituído por quatro anéis pirrólicos conjugados, ligados entre si por ponte do tipo metenil (CH). Quando não apresenta nenhum substituinte é denominada de porfina [1]. Apresenta 11 ligações duplas (22 elétrons π), onde apenas 18 elétrons π estão conjugados, cumprindo a regra de aromaticidade de Hückel ($4n + 2$), tal fato confere estabilidade ao anel. A Figura 2 traz a representação ilustrativa de um anel porfirínico, onde mostra a classificação dos átomos de carbonos α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19), β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18) e *meso* (5, 10, 15, 20). Além disso, na forma neutra a porfirina é chamada de “base-livre” [1, 7, 27].

Figura 2: Representação estrutural de um anel macrociclo de uma porfirina.



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

3.2. Metodologias de síntese de obtenção de porfirinas

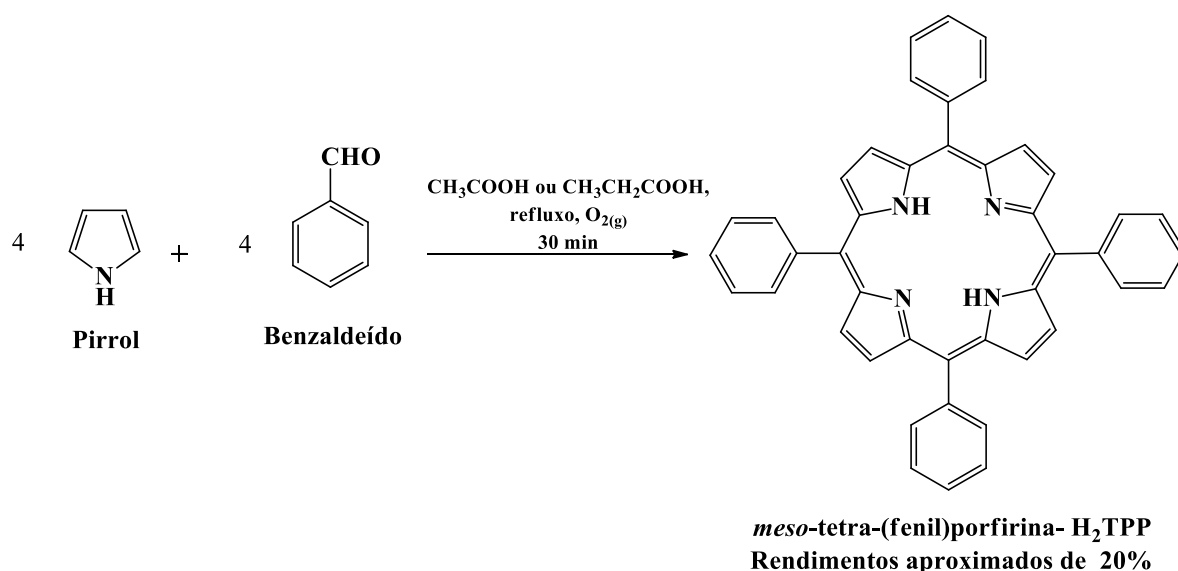
Em 1912, Küster propôs a primeira estrutura de uma porfirina, porém por ser uma estrutura de alta massa molecular, acreditava-se não ser estável. Em 1929, Fischer e colaboradores sintetizaram a *heme*, porfirina complexada com íons Fe^{II} , tendo a comprovação

da estrutura por difração de raios X [1]. Baseando-se nesses estudos, várias metodologias sintéticas de porfirinas foram relatadas.

Em 1935, Rothermund propôs uma rota de síntese para obtenção de porfirinas *meso*-substituídas, tendo como material de partida pirrol e benzaldeído. A síntese envolvia o emprego de metanol como solvente e pequenas quantidades de piridina, o sistema era mantido em refluxo, por 48 horas [3]. O rendimento obtido para essa reação era de 9%, entretanto, continha cerca de 5% de clorina como impureza.

Com objetivos de alcançar melhores rendimentos para a mesma síntese, Adler e colaboradores utilizaram meio ácido (ácido acético ou ácido propiônico) em sistema aberto, sob refluxo por 30 minutos [5]. O Esquema 1 traz a representação da síntese.

Esquema 1: Representação da rota sintética geral de uma *meso*-tetra-(aril)porfirina proposta por Adler e colaboradores.

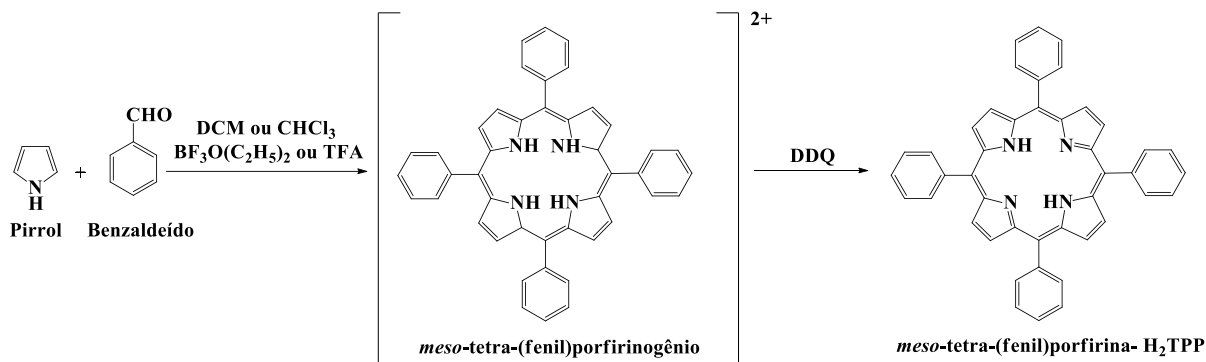


Fonte: Adaptado de Adler, Longo e Shergalis, 1964.

Como aprimoramento das metodologias já existentes, alguns anos mais tarde, Lindsey e colaboradores buscaram desenvolver uma nova rota de síntese [4]. Nessa nova metodologia, publicada em 1986, a reação ocorre em duas etapas: a primeira 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 ($\text{BF}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, como ácido de Lewis), em temperatura ambiente. A reação gera um intermediário porfirinogênio, onde possui os quatro nitrogênios internos protonado. Na etapa seguinte, um agente oxidante é utilizado para oxidar o intermediário porfirinogênio, geralmente 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

(DDQ, estrutura no Anexo 8.9), produzindo a *meso*-tetra(fenil)porfirina. Os autores relatam que o rendimento obtido para este experimento foi de, aproximadamente, 45% [4]. O Esquema 2 traz uma representação da rota de síntese.

Esquema 2: Representação geral da rota sintética proposta por Lindsey e colaboradores.



Fonte: Adaptado de Lindsey, Schreiman e Hsu, 1986.

3.3 Metaloporfirinas

As porfirinas “base-livre” podem atuar como ligantes na formação de complexos estáveis com a maioria dos metais, principalmente metais da primeira série de transição. Para a reação de metalação, onde acontece a complexação no centro da porfirina, geralmente é realizada com um sal do metal (acetato ou cloreto), levando a formação de uma metaloporfirina. Os cátions metálicos coordenados nas porfirinas podem estar em estados de oxidação variável de dois a seis. Dessa forma, essa classe de compostos oferece uma versatilidade e aplicabilidade ampla na área de química de coordenação [28].

Em geral, a metalação envolve a reação entre um sal metálico de interesse MX_n (M= íon de metal, X = Cl, Br, OAc) com as porfirinas na forma de base-livre, gerando uma metaloporfirina. As reações podem ocorrer em meio orgânico utilizando solvente como clorofórmio, tolueno ou DMF. Ao longo dos anos, diversos métodos foram desenvolvidos para a síntese das metaloporfirinas, dependendo principalmente da natureza do íon metálico [29, 30]. Dentre eles, pode-se destacar três metodologias:

(1) método do acetato, que utiliza ácido acético como solvente, possibilitando uma maior solubilidade da porfirina e do sal metálico. Nesse método a reação acontece em refluxo de ácido acético e sal do metal em questão, em atmosfera inerte.

(2) método da piridina, onde a mesma atua como solvente e catalisador básico, comumente empregada para metais divalentes.

(3) método do acetilacetato (acac), em solventes orgânicos, sendo esse um método de fácil purificação por cromatografia direta, sendo mais adequado para metais em altos estados de oxidação.

3.4 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy, PDT) é um processo considerado fotodinâmico pois, relaciona a combinação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular com o objetivo de ocasionar destruição seletiva de um alvo biológico. Esses alvos biológicos podem ser células tumorais ou infecções localizadas provocadas por microrganismos [31]. Sendo assim, a terapia fotodinâmica surge como uma possível alternativa para o tratamento do câncer, diferentemente aos métodos convencionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), uma vez que a administração pode ocorrer também por via parenteral (injeções intravenosas, intra-arterial, subcutânea, entre outras) [21, 23].

O primeiro estudo do uso da PDT foi relatado por Oscar Raab em 1900, empregando luz visível em combinação com o corante acridina para destruir organismos vivos (*Paramecium caudatum*, um protozoário) [32]. Posteriormente, vários relatos de uso de uma fonte de luz para tratamento de doenças e eliminação de microrganismos foram apresentados.

Em 1913, Friedrich Meyer-Betz realizou o primeiro estudo de terapia fotodinâmica em humanos utilizando hematoporfirinas aplicando a substância na própria mão [33]. Porém, somente em 1975, Thomas Dougherty conseguiu obter com sucesso o tratamento de câncer de pele, o que possibilitou anos mais tarde realizar o primeiro estudo clínico controlado em pacientes humanos [34]. O Photofrin[®] (representação estrutural no Anexo 8.9) foi um dos primeiros fármacos aprovados para utilização na terapia fotodinâmica, empregado no tratamento de câncer de esôfago [35].

Em relação à utilização de porfirinas como fotossensibilizadores, Bonnett e Martínez [36] relataram as seguintes vantagens: estabilidade química gerada pela aromaticidade presente na estrutura básica, rendimentos apreciáveis de oxigênio singlete e baixa toxicidade. Sendo assim, novos derivados porfirínicos têm sido alvo de estudos com o intuito do aumento da seletividade, para reduzir o possível dano a células saudáveis.

Além de pesquisas relacionadas a PDT contra células tumorais, muitos derivados porfirínicos são sintetizados para avaliar a eficiência do efeito fotodinâmico em microrganismos [37, 38, 39].

3.5 Interação com DNA

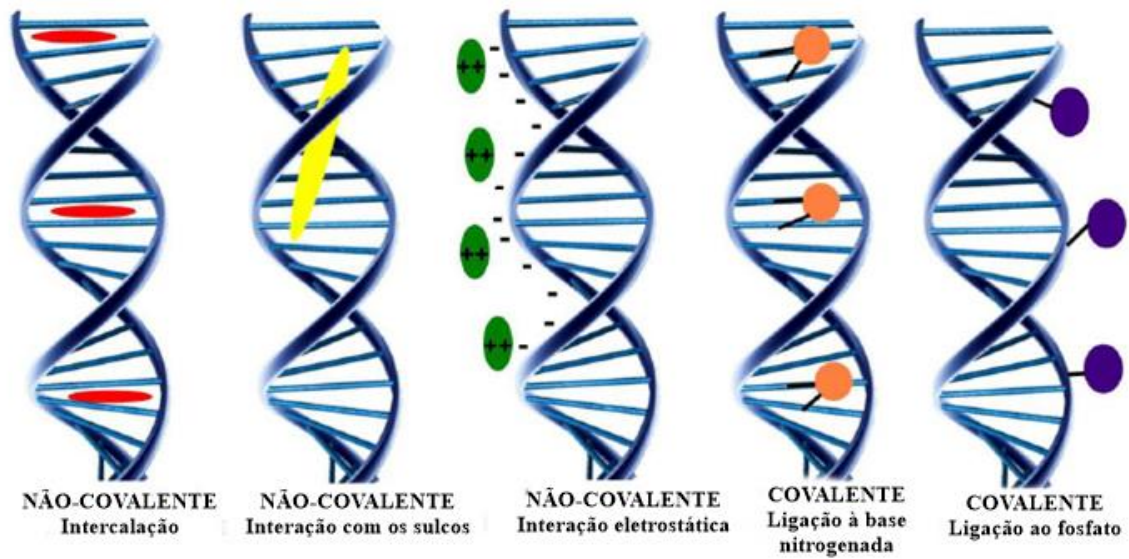
O DNA é considerado um alvo de ação importante a ser atingido pelos fármacos. O modelo que descreve a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) é o da dupla hélice publicado por James Watson e Francis Crick, em 1953 [40]. Nessa estrutura as duas fitas do DNA se enrolam formando uma dupla hélice, com cavidades que diferem no tamanho.

O DNA é constituído por bases nitrogenadas, responsáveis pelo código genético, derivadas de anéis de purina como adenina (A) e guanina (G) e de pirimidina como citosina (C) e timina (T) [41]. Outro componente estrutural importante é a desoxirribose classificada como pentose, responsável pelo comando das funções celulares dos ácidos nucleicos. As pentoses ligam-se entre si através de um grupo fosfato, formando ligações fosfodiésteres.

As bases nitrogenadas estão orientadas para o lado de dentro da dupla fita, devido aos anéis aromáticos serem hidrofóbicos, enquanto que as desoxirriboses ficam na parte externa, em contato com o meio aquoso [40]. A estrutura do DNA é mantida através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita, pareando uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina [42].

Devido a estrutura química do DNA exibir grande quantidade de ânions fosfatos e grupos doadores de elétrons, como oxigênio e nitrogênio, favorece a interação com cátions metálicos de complexos que podem apresentar atividade em clivar o DNA. Dessa forma, o estudo de interação de compostos com o DNA torna-se importante, uma vez que o DNA pode ser alvo de agentes farmacológicos. O reconhecimento desses complexos pode ocorrer através de interações eletrostáticas em que o íon metálico está carregado positivamente e o esqueleto carbono-fosfato do DNA está carregado negativamente, por intercalação onde ocorre quando inserção entre os pares de bases nitrogenadas, tornando-se estáveis por interações não-covalente, por ligação às cavidades do DNA por interações covalentes, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas, como ilustrado na Figura 3 [43, 44, 45, 46].

Figura 3: Imagem representativa dos tipos de interações com o DNA.



Fonte: Adaptado de Barra e Netto, 2015.

O processo de formação das interações entre compostos e o DNA segue os princípios básicos de química geral e de coordenação, destacando-se os seguintes: átomos de oxigênio e nitrogênio presentes nas bases nitrogenadas e nos grupos fosfato representam pontos para a formação de ligações com o centro metálico (íons de metais); complexos formados por íons metálicos menores e pouco polarizáveis ligam-se a átomos de oxigênio, enquanto que os íons metálicos maiores e polarizáveis se ligam preferencialmente ao nitrogênio (teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson); fatores como impedimento estérico e possibilidade de ligação de hidrogênio podem ser determinantes no tipo de interação observada; a labilidade dos ligantes presentes no complexo está diretamente relacionado a capacidade de atingir o alvo farmacológico e também a tendência na formação da ligação covalente com o DNA; além disso, as características estruturais e eletrônicas dos ligantes, por exemplo, ligantes planares rígidos ricos em elétrons π favorecem a intercalação [44, 47, 48, 49, 50].

Experimental

4. EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Os reagentes, solventes e ct-DNA utilizados foram adquiridos em grau analítico e utilizados sem tratamento prévio. A cromatografia em coluna foi realizada usando sílica-flash 230-400. A cromatografia de camada delgada (TLC) foi realizada em folhas de alumínio (1,0 mm de espessura) com sílica-gel.

4.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram medidos em um aparelho digital Microquímica modelo MQAPEF-301 pertencente ao laboratório de Materiais Inorgânicos da Universidade Federal de Santa Maria.

4.3 Análise Elementar

As análises elementares de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram realizadas pela Central Analítica do IQ-USP, utilizando-se um equipamento Perkin-Elmer CHN 2400. No Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Todas as análises foram feitas em duplicata, utilizando em torno de 3 mg de cada composto (massa por medida).

4.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de alta resolução dos compostos, foram obtidos em um micrOTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, MA), com ionização electrospray (ESI), no modo positivo, no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, sob a supervisão do Prof. Dr. Thiago Barcelos. Os espectros de massa foram registados com soluções metanólicas de cerca de 500 ppb de concentração com um fluxo de 180 μ L/min e capilares de 4000 V.

4.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX- 400 MHz, pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Santa Maria. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados por parte por milhão (ppm), em relação ao pico residual de tetrametilsilano (TMS), utilizados como padrão interno para os espectros de próton, em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Colocando-se entre parênteses os dados de: multiplicidade (s = simpleto, d = duplete, t = tripleto, quart = quarteto, quint = quinteto, sex = sexteto e m = multiplete), o número de hidrogênios deduzido da integral relativa e a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

4.6 Espectroscopia na região do infravermelho

As análises para obter os espectros na região do infravermelho foram realizadas através de um equipamento Bruker Tensor-27 Sample Compartment RT- DLa-TGS, janela espectral de $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Para a realização, as amostras foram preparadas em pastilhas contendo 1% de composto e 99% de brometo de potássio (KBr), sendo as massas medidas em balança analítica.

4.7 Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e do visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV-vis 2600 Shimadzu, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. As soluções foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A partir disso, pode-se calcular o valor de coeficiente de absorvidade molar (ϵ , em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando a equação $A = \epsilon bc$, onde A é a absorbância, b o caminho ótico (cm^{-1}), c a concentração (mol L^{-1}).

4.8 Espectroscopia de emissão

Os espectros de emissão fluorescente foram obtidos em um Cary50 Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies). No laboratório de análises químicas

LACHEM da Universidade de Santa Maria. As soluções utilizadas para análises foram em concentrações de 10^{-4} mol L⁻¹.

4.9 Cálculo teórico

De modo a confrontar os dados experimentais obtidos, os cálculos teóricos foram realizados no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo F.G. Gonçalves, utilizando o software Gaussian, versão 16, revisão B.01 [51]. Para otimizações geométricas e análise vibracional fundamental, a metodologia DFT (*Density Functional Theory*) foi usada com o conjunto de base cc-pVDZ. As otimizações de geometria e análise vibracional no primeiro estado excitado foram realizadas utilizando a Teoria Funcional de Densidade Dependente do Tempo (*Time Dependent Density Functional Theory*; TD-DFT) e a função de base jun-cc-pVTZ. O conjunto de base *jun*, chamado de "conjunto de base de calendário", é recomendado por Truhlar e colaboradores [52] como melhor opção para conjuntos de bases aumentadas, por apresentar um menor custo computacional. Os cálculos foram realizados como um híbrido de correlação-correlação funcional, ω B97XD, que inclui um modelo de dispersão empírica, mostrando melhor concordância para a descrição dos estados excitados, de acordo com trabalhos anteriores [53]. O efeito do solvente foi considerado em todos os cálculos usando o Modelo de Polarizabilidade Contínua (*Polarizable Continuum Model*; PCM), o solvente utilizado foi o DMSO. As imagens das geometrias e orbitais moleculares foram geradas usando o programa ChemCraft 1.8 [54].

4.10 Voltametria Cíclica

As medidas voltamétricas foram feitas em um Potenciostato/Galvanostato EcoChemie AutoLab PGSTAT 32N, localizado na Universidade Federal de Santa Maria, em solução de diclorometano (DCM), utilizando hexafluorofosfato de tetrabutílamônio como eletrólito suporte (0,1 mol L⁻¹ em solução de DCM). Estes experimentos foram realizados empregando um sistema padrão de três componentes: um eletrodo de trabalho de carbono vítreo; um eletrodo auxiliar (fio de platina) e um eletrodo de *pseudo*-referência de platina. Para monitorar o eletrodo de referência, o par redox (Fc⁺/Fc = 0,64 V vs SHE) foi utilizado como referência interna, e os voltamogramas estão expressos em função do mesmo.

4.11 Estudo de agregação

Os estudos de agregação das porfirinas foram feitos em um espectrofotômetro UV-vis 2600 Shimadzu, localizado na Universidade Federal de Santa Maria. Os espectros de absorção UV-vis foram medidos em função da concentração usando DMSO como solvente, em concentrações variadas de 10 μM a 100 μM de cada porfirina. As mudanças nos λ_{max} das bandas de transição foram monitoradas.

4.12 Fotoestabilidade

Os ensaios de fotoestabilidade dos compostos foram feitas utilizando uma placa de LED branco (50 mW cm^{-2}), monitoradas durante 60 min. Em espectrofotômetro UV-vis 2600 Shimadzu, localizado na Universidade Federal de Santa Maria. As soluções na concentração de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas em DMSO.

4.13 Geração de oxigênio singleto (Ensaio DPBF)

O ensaio utilizado para avaliar a geração de oxigênio singleto, foi através da fotodegradação de 1,3-difenilisobenzofurano (*1,3-Diphenylisobenzofuran*, DPBF) [55], onde 1,5 mL de uma solução estoque de 100 μM de DPBF em DMSO foi misturado com 0,5 mL (50 μM) de uma solução dos derivados de porfirina. A cubeta foi completada com 2,0 mL de DMSO até um volume final de 4,0 mL. Para medir a geração de $^1\text{O}_2$, os espectros UV-vis das soluções (amostras e padrão) foram registrados para diferentes tempos de exposição usando um laser de diodo ($\lambda = 660 \text{ nm}$) posicionado a 1,0 cm da amostra (TheraLaser DMC, São Carlos, SP, Brasil), com uma potência média de 100 mW. Os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) foram calculados utilizando a Equação 1.

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{std}} \frac{k}{k^{\text{std}}} \cdot \frac{I^{\text{std}}}{I} \quad (1)$$

onde, $I^{\text{std}}/I = (1 - 10^{A_{\text{std}}})/(1 - 10^A)$, $\Phi_{\Delta}^{\text{std}}$ é o rendimento quântico de oxigênio singleto da amostra padrão (nesse caso, Ftalocianina de Zinco (ZnPc) dissolvido em DMSO, $\Phi_{\Delta}^{\text{std}} = 0.67$) [56], k e k^{std} são as constantes cinéticas de fotodegradação para porfirinas e ZnPc (padrão), respectivamente, e A_{std} e A são as absorvâncias para ZnPc (padrão) e porfirina.

4.14 Ensaio de interação com biomoléculas

As análises de interações das porfirinas, base-livre e metaloporfirinas, com DNA de timo de bezerro (ct-DNA) foram realizadas por medidas de UV-vis em temperatura ambiente em uma mistura de DMSO (2%)-Tris-HCl (pH 7,4). As soluções estoques dos compostos foram feitas em DMSO na faixa de 10^{-4} mol L⁻¹. As concentrações de par de base de DNA de baixo peso molecular de timo de bezerro (ct-DNA) foi determinada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis, usando coeficiente de absorvidade molar 6.600 L.mol cm⁻¹ (por par de base) em 260 nm, Os ensaios foram conduzidos com soluções dos derivados de porfirinas em mistura de solução de DMSO e Tris-HCl, em pH 7,4, onde houve a titulação com concentrações crescentes de DNA (de 0-100 μM). Os espectros de absorção foram adquiridos na faixa de comprimento de onda entre 300-800 nm. As constantes intrínsecas de ligação (K_b) foram calculadas de acordo com o decaimento das bandas de absorção dos compostos usando a Equação 2, através de um gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$.

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (2)$$

onde $[DNA]$ é a concentração de DNA nos pares de bases, ϵ_a é o coeficiente de absorvidade molar ($A_{obs} / [composto]$), ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de absorvidade molar das formas ligada e totalmente livre, respectivamente. Através do gráfico entre $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$, K_b é obtido pela razão entre a inclinação e a interceptação da equação da reta.

Os estudos de competição no DNA foram realizados usando experimentos de emissão de fluorescência com ct-DNA na presença de brometo de etídio (EB) (Brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio). A partir de uma solução estoque das porfirinas, em DMSO, houve a adição gradual desta na cubeta de quartzo de quatro faces (comprimento do caminho de 1,0 cm) contendo brometo de etídio (EB, $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) e ct-DNA ($1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) numa solução tampão Tris-HCl pH 7,4. As concentrações das porfirinas variaram de 0 a 100 μM. As amostras foram excitadas em $\lambda_{exc} = 510$ nm e os espectros de emissão foram registrados na faixa de 550 a 800 nm, após cada adição de alíquota de porfirina, 5 minutos foi o tempo de espera necessário a cada medida para permitir a incubação com o DNA. As constantes de extinção de fluorescência de Stern-Volmer (K_{SV}) dos compostos foram calculadas de acordo com o

decaimento das bandas de emissão de EB-DNA usando a Equação 3 através de um gráfico de F_0/F versus [DNA],

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3)$$

onde [Q] é a concentração de compostos de porfirina, F_0 e F são as intensidades inicial e final de emissão, respectivamente. Através de um gráfico entre F_0/F versus [porfirina], o valor de K_{SV} é obtido pela razão entre a inclinação e a interceptação da equação da reta.

4.14.1 Análise de cálculo de *docking* molecular

As análises teóricas por *docking* molecular foram conduzidas na Universidade Rural do Rio de Janeiro, sob a supervisão do Prof. Otávio A. Chaves. As estruturas das porfirinas base-livre (TNafPor) e metaloporfirina (ZnTNafPor, CuTNafPor, NiTNafPor, CoCITNafPor e MnCITNafPor) foram analisadas e minimizadas energeticamente pelos cálculos de DFT, usando o potencial B3LYP e o conjunto de bases 6-31G*, disponível no programa Spartan'14. A estrutura cristalográfica do DNA foi obtida no Banco de Dados de Proteína com o identificador 1BNA (resolução de 1,90 Å) [57]. Os estudos de *docking* molecular foram realizados com o programa GOLD 5.2 (CCDC, Cambridge Crystallographic Data Center).

Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura do DNA de acordo com os dados inferidos pelo programa GOLD 5.2 nos estados de ionização e tautoméricos. O local de ancoragem molecular para cada ligante no DNA foi definido na dupla hélice do DNA com um raio de 5,0 Å. O número de operações genéticas (cruzamento, migração, mutação) em cada corrida de ancoragem usada no procedimento de pesquisa foi definido como 100.000. A função de pontuação usada foi “ChemPLP”, que é a função padrão do programa GOLD 5.2 [58]. A pontuação de cada pose identificado foi calculado como o negativo da soma de uma série de termos de energia envolvidas no processo de interação macromolécula-ligante, assim, mais positiva a pontuação significa melhor interação [59]. Os resultados de *docking* molecular foram gerados pelo PyMOL Molecular Graphics System 1.1eval (programa Delano Scientific LLC, Palo Alto, CA, EUA).

4.15 Microrganismos

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM, sob a supervisão do Prof. Dr. Roberto C. V. Santos e da aluna de doutorado Márcia Ebling. Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35985, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705, *Providencia rettgeri* ATCC 2994, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Aeromonas caviae* IC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Shigella flexneri* ATCC 12022323^a, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* PNCQ Proex 340, *Burkholderia cepacia* IC, *Candida albicans* ATCC 14053, *Streptococcus salivarius* IC, *Streptococcus oralis* IC, *Streptococcus mutans* IC, pertencentes a bacterioteca/micoteca do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Os microrganismos foram mantidos em meio de cultura com glicerol e arrefeceu-se a -80°C. A amostra foi descongelada, inoculada em caldo de infusão de coração do cérebro (BHI) e incubada durante 24h. Depois, foram semeados em agar nutriente e incubados durante 24h a 37 °C.

4.15.1 Avaliação da atividade antimicrobiana por disco de difusão

O teste de suscetibilidade preliminar foi realizado empregando-se a técnica de disco de difusão proposta por Bauer e colaboradores [60] em ágar Mueller-Hinton (MHB). Os inóculos contendo os diferentes microrganismos foram semeados em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton (MHB). Após, 20 µL de cada formulação foram adicionados aos discos que por sua vez foram depositados na placa. Após adicionar os discos, a placa foi incubada por 24h a 37 °C em estufa bacteriológica. Após este período, os halos foram medidos (em mm). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.15.2 Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada pelo método de micro-diluição em placas de 96 poços [61]. Onde, diferentes concentrações de porfirinas foram adicionadas em poços com caldo Mueller-Hinton (MHB) [62] e a suspensão com microrganismo. O controle positivo foi considerado o poço com a suspensão e MHB enquanto o controle negativo foi

apenas MHB. Foram preparadas duas placas da mesma maneira: uma foi irradiada por uma placa de LED (luz branca; 5,0 cm de distância; 50 mW/cm²) por 60 minutos e outra por 60 minutos no escuro. Depois, as placas foram incubadas durante 24h a 37 °C. O ensaio foi revelado com cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC), que desenvolve uma cor vermelha no crescimento microbiano. A concentração mais baixa que não mostrou alteração na cor foi considerada como MIC.

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) foi tomada uma alíquota de 1 µL de cada poço, semeada em placa de agar nutriente e incubada por 24h. Depois, as colônias foram identificadas e a menor concentração que não demonstrou crescimento microbiano foi considerada a CBM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.15.3 Curva de morte

O ensaio de curva de morte foi realizado de acordo com Lopes e colaboradores [62] com modificações, para determinar o tempo necessário para que as porfirinas eliminem os microrganismos. O mesmo método de experiência utilizado no item anterior foi aplicado para este estudo. Os poços contendo caldo MHB e porfirinas na concentração de CBM foram incubados a 37 °C, sendo que uma das placas foi exposta a luz branca (50 mW/cm²), e a outra placa sem exposição (escuro). Nos tempos de 0, 15, 30 e 60 minutos, uma amostra foi coletada e semeada em placa com agar nutriente. A placa foi mantida a 37 °C durante 24h e as colônias foram contadas. O controle positivo foi considerado o poço com caldo MHB e o microrganismo em questão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

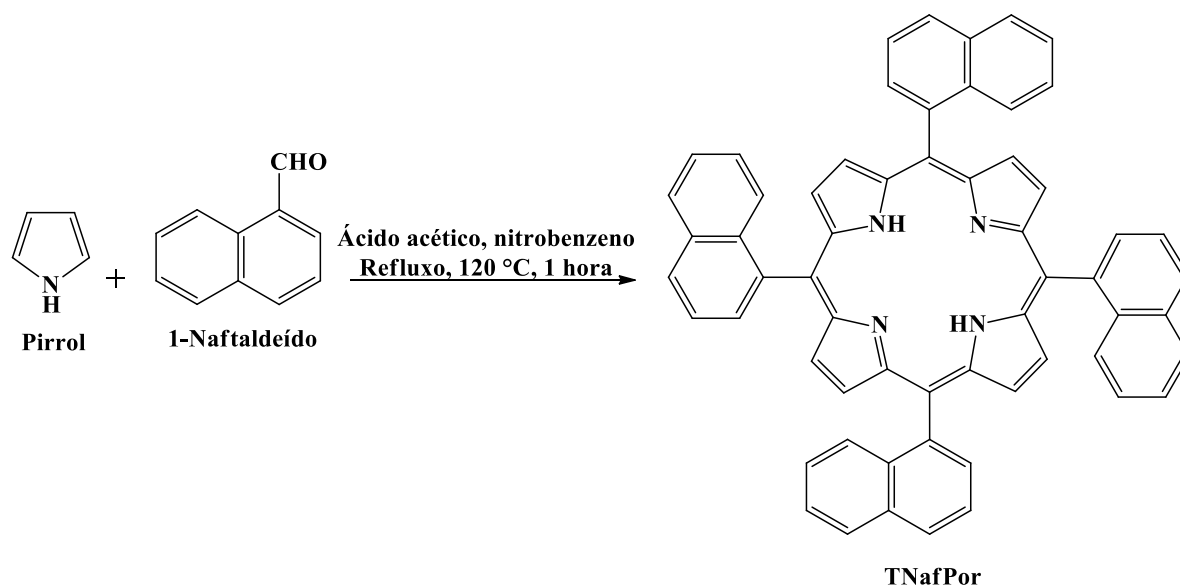
4.16 Síntese da *meso*-tetra(1-naftil)porfirina (TNafPor)

Primeiramente, em um balão de fundo redondo de 250 mL, solubilizou-se 3,92 mL do 1-naftaldeído (28,86 mmol, 1 equivalente) na mistura de ácido acético glacial e nitrobenzeno (75 mL/35 mL). O pirrol (2,0 mL, 28,86 mmol, 1 equivalente) foi previamente solubilizado em ácido acético glacial e adicionado lentamente à solução contendo o aldeído (gota a gota). A reação foi mantida em condição de refluxo de 1h a temperatura de 120 °C. O sistema foi resfriado até temperatura ambiente, o ácido acético e nitrobenzeno foram removidos por destilação sob pressão reduzida, seguido da adição de metanol para ocorrer a precipitação da porfirina. Após o período de 24 horas, filtrou-se a solução e o sólido obtido foi lavado com metanol para eliminar as impurezas de polipirróis gerados. O produto obtido foi solubilizado

em diclorometano e purificado por cromatografia em coluna (sílica-gel), utilizando uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexano (2:1) como eluente, seguido de uma recristalização em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:3). A primeira fração foi identificada por TLC como *meso*-tetra-(1-naftil)porfirina, como demonstrado no Esquema 3.

Dados espectroscópicos para a porfirina TNafPor: sólido púrpura (1,20 g, 1,473 mmol, 5% de rendimento). T.F. > 300 °C (decomp.). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = -2,24$ (bs, 2H, NH interna), 7,11-7,21 (m, 8H), 7,45-7,49 (m, 4H), 7,79-7,84 (m, 4H), 8,09 (d, 4H, $J = 10,2$ Hz), 8,21-8,28 (m, 8H) e 8,48 (s, 8H, -H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 117,7, 119,6, 124,2, 124,7, 125,7, 126,3, 127,8, 128,2, 128,7, 129,2, 130,8, 132,8, 133,3, 134,6, 135,9, 136,4, 136,7, 137,0, 139,1, 146,8$. Infravermelho (pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3315 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3044 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1709 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1578 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1344 ($\delta_{\text{C-C}}$), 950 ($\delta_{\text{C-H}}$), 790 ($\delta_{\text{C-N}}$). Anal. calc.: para $\text{C}_{60}\text{H}_{40}\text{N}_4$: C 88,43%; H 4,70%; N 6,87%. Encontrado: C 88,52%; H 4,78%; N 6,90%. HRMS-ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 815,3161$ (calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{40}\text{N}_4 + \text{H}^+$: 815,3169).

Esquema 3: Esquema da rota de síntese da *meso*-tetra(1-naftil)porfirina (TNafPor).



4.17 Sínteses: *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]zinco(II) (ZnTNafPor), *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]cobre(II) (CuTNafPor) e *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]níquel(II) (NiTNafPor)

O Esquema 4 retrata de maneira geral as sínteses das metaloporfirinas de Zn^{II} , Cu^{II} e Ni^{II} correspondentes, onde em um balão de fundo redondo de 50 mL, solubilizou-se 80 mg de

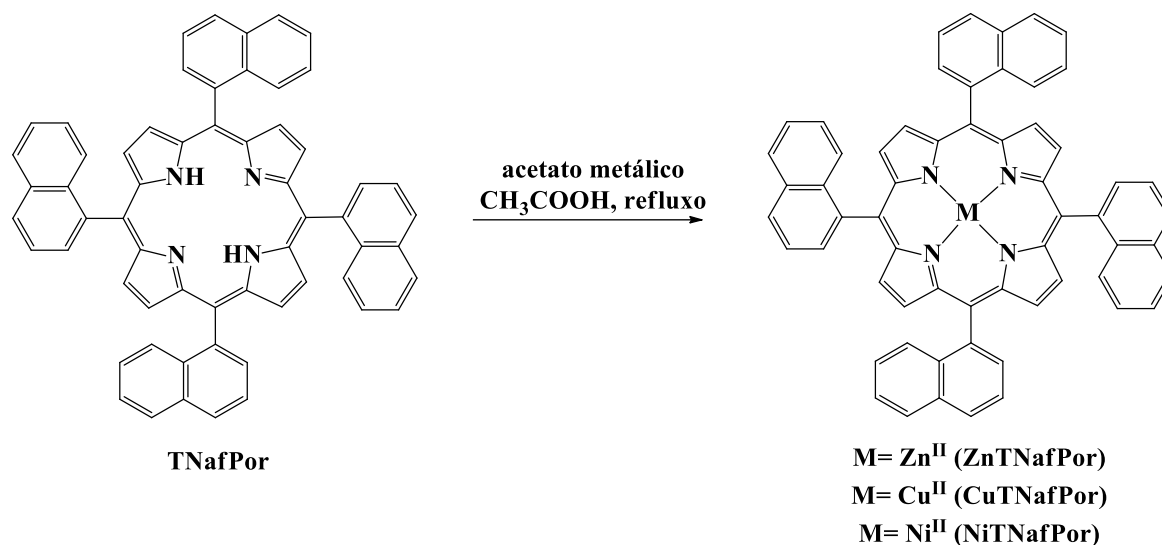
TNafPor base-livre (0,091 mmol, 1 equivalente) e 5 equivalentes de acetato do metal em estado de oxidação 2+ (zinco 100 mg, cobre 90 mg e níquel 113 mg) em condição de refluxo utilizando ácido acético glacial como solvente (10 mL), por um período de 1 a 5 horas. O monitoramento das reações foi feito via espectroscopia na região do UV-vis. Após termino da reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e purificado por cromatografia em coluna (sílica-gel), utilizando CH_2Cl_2 como eluente. Os sólidos obtidos foram lavados com água destilada e secos em dessecador sob vácuo.

Dados espectroscópicos para metaloporfirina ZnTNafPor: Sólido púrpura (0,076 g, 0,087 mmol, 95% de rendimento). T.F. > 300 °C (decomp.). Infravermelho (pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3043 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1813 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1590 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1338 ($\delta_{\text{C-C}}$), 977 ($\delta_{\text{C-H}}$), 794 ($\delta_{\text{C-N}}$). Anal. calc.: para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Zn}$: C 82,05%; H 4,13%; N 6,33%. Encontrado: C 82,07%; H 4,13%; N 6,38%. HRMS-ESI $[\text{M}]^+$ e $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 876,2225$ e $m/z = 877,2217$ (calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Zn}$: 876,2225 e $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Zn} + \text{H}^+$: 877,2304).

Dados espectroscópicos para metaloporfirina CuTNafPor: sólido púrpura escuro (0,064 g, 0,074 mmol, 81% de rendimento). T.F. > 300 °C (decomp.). Infravermelho (pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3043 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1814 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1590 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1341 ($\delta_{\text{C-C}}$), 978 ($\delta_{\text{C-H}}$), 795 ($\delta_{\text{C-N}}$). Anal. calc.: para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Cu} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 78,97%; H 4,14%; N 6,15%. Encontrado: C 82,22%; H 4,44%; N 6,39%. HRMS-ESI $[\text{M}]^+$ e $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 875,2155$ e $m/z = 876,2262$ (calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Cu}$: 875,2230 e $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Cu} + \text{H}^+$: 876,2308).

Dados espectroscópicos para metaloporfirina NiTNafPor: sólido castanho (0,060 g, 0,069 mmol, 76% de rendimento T.F. > 300 °C (decomp.). Infravermelho (pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3044 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1810 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1503 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1345 ($\delta_{\text{C-C}}$), 980 ($\delta_{\text{C-H}}$), 794 ($\delta_{\text{C-N}}$). Anal. calc.: para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Ni} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: C 73,57%; H 4,16%; N 5,75%. Encontrado: C 82,68%; H 4,95%; N 6,43%. HRMS-ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 871,2255$ (calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Ni} + \text{H}^+$: 871,2366).

Esquema 4: Esquema geral da rota de síntese das metaloporfirinas utilizando acetato metálico.



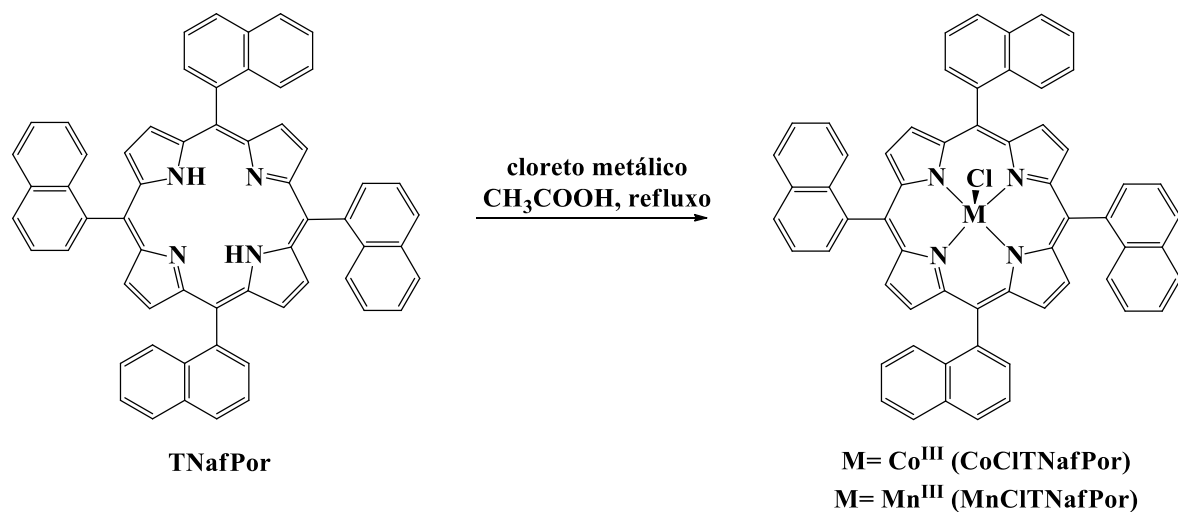
4.18 Sínteses: *meso*-tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}cobalto(III) (CoCITNafPor) e *meso*-tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}manganês(III) (MnCITNafPor).

O Esquema 5 apresenta de maneira geral a sínteses propostas para as metaloporfirinas contendo íons Co^{III} e Mn^{III}, realizadas em um balão de fundo redondo de 50 mL, onde adicionou-se TNafPor base-livre (0,091 mmol, 80 mg, 1 equivalente) e 5 equivalentes do cloreto metálico em questão (de cobalto 108,25 mg e de manganês 90 mg), sob condição de refluxo em ácido acético glacial como solvente (10 mL), por um período de 1 a 5 horas. Os cloretos metálicos de Co e de Mn, estado de oxidação 2+, foram oxidados durante a reação em sistema aberto pelo oxigênio. As reações foram acompanhadas via espectroscopia na região do UV-vis. Após termino da reação, o solvente foi removido em evaporador rotatório e purificado por cromatografia em coluna (sílica-gel), utilizando uma mistura de CH₂Cl₂/*n*-hexano (1:1) como eluente. Os sólidos obtidos foram lavados com água destilada e secos em dessecador sob vácuo.

Dados espectroscópicos para metaloporfirina CoCITNafPor: sólido castanho-escuro (0,050 g, 0,055 mmol, 60% de rendimento). T.F. > 300 °C (decomp.). Infravermelho (pastilhas de KBr, cm⁻¹): 3044 (ν_{C-H}), 1812 (ν_{C-C}), 1591 (ν_{C=C}), 1345 (δ_{C-C}), 981 (δ_{C-H}), 794 (δ_{C-N}). Anal. calc.: para C₆₀H₃₈N₄CoCl₄H₂O: C 73,55%; H 4,00%; N 5,75%. Encontrado: C 79,42%; H 4,54%; N 6,17%. HRMS-ESI [M-Cl]⁺: *m/z* = 871,2254 (calculado para C₆₀H₃₈N₄Co: 871,2266).

Dados espectroscópicos para metaloporfirina MnCITNafPor: sólido castanho-escuro (0,044 g, 0,049 mmol, 54% de rendimento). T.F. > 300 °C (decomp.). Infravermelho (pastilhas de KBr, cm^{-1}): 3053 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1591 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1502 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1340 ($\delta_{\text{C-C}}$), 983 ($\delta_{\text{C-H}}$), 797 ($\delta_{\text{C-N}}$). Anal. calc.: para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{MnCl}_7\text{H}_2\text{O}$: C 70,05%; H 4,02%; N 5,44%. Encontrado: C 79,77%; H 4,94%; N 6,20%. HRMS-ESI $[\text{M-Cl}]^+$: $m/z = 867,2308$ (calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{Mn}$: 867,2314).

Esquema 5: Esquema geral da rota de síntese utilizando cloreto metálico.



Discussão dos Resultados

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Síntese

Para a síntese da porfirina neste trabalho foi utilizada a metodologia desenvolvida por Rocha Gonsalves e colaboradores [6]. Nesta metodologia, o aldeído e o pirrol são solubilizados em ácido acético glacial na presença de nitrobenzeno na condição de refluxo, seguidos de purificação direta e recristalização. O nitrobenzeno foi utilizado como agente oxidante, promovendo a oxidação do porfirinogênio em porfirina [7]. Os complexos de metais de transição foram preparados em reação de refluxo da porfirina (TNafPor) na presença de um sal metálico na forma de acetato ou cloreto, utilizando ácido acético como solvente.

5.2 Ponto de fusão e Análise elementar (CHN%)

A Tabela 1 mostra os dados obtidos das análises elementares para os compostos desse trabalho. Nota-se que as metaloporfirinas CuTNafPor, NiTNafPor, CoCITNafPor e MnCITNafPor apresentam águas de hidratação. As análises por ponto de fusão para todos os compostos foram superiores a 300 °C, indicando decomposição com o gradiente de temperatura.

Tabela 1: Valores encontrado para análise elementar.

Porfirina	C% (teor.)	H% (teor.)	N% (teor.)	Fórmula Molecular
TNafPor	88,52 (88,43)	4,78 (4,70)	6,90 (6,87)	C ₆₀ H ₃₈ N ₄
ZnTNafPor	82,07 (82,05)	4,13 (4,13)	6,33 (6,38)	C ₆₀ H ₃₆ N ₄ Zn
CuTNafPor	78,97 (82,22)	4,44 (4,14)	6,15 (6,39)	C ₆₀ H ₃₆ N ₄ Cu•2H ₂ O
NiTNafPor	73,57 (82,68)	4,95 (4,16)	5,75 (6,43)	C ₆₀ H ₃₆ N ₄ Ni•6H ₂ O
CoCITNafPor	73,55 (79,42)	4,54 (4,00)	5,75 (6,17)	C ₆₀ H ₃₆ N ₄ CoCl•4H ₂ O
MnCITNafPor	70,05 (79,77)	4,94 (4,02)	5,44 (6,20)	C ₆₀ H ₃₆ N ₄ MnCl•7H ₂ O

5.3 Espectrometria de Massas

De modo geral, as porfirinas apresentaram nos espectros de massas de alta resolução (HRMS-ESI) picos característicos do tipo [M+H]⁺ (Tabela 2; Anexo 8.1). Para as metaloporfirinas de zinco(II) e níquel(II) observou-se protonação do anel, atribuída ao pico do

íon $[M+H]^+$. Nos casos das espécies de cobalto(III) e manganês(III), a perda do ligante cloreto axial foi observada, formando o pico $[M-Cl]^+$. A Tabela 2 apresenta um resumo dos picos encontrados para as porfirinas estudadas nesta dissertação.

Tabela 2: HRMS-ESI-(+)-TOF-MS das porfirinas (erro experimental < 5 ppm).

Porfirina	Fórmula Molecular	P.M. (g mol^{-1}) [M] ⁺	Íon observado
TNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{38}\text{N}_4$	814,3096	815,3161 $[M+H]^+$
ZnTNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{Zn}$	876,2231	877,2217 $[M+H]^+$
CuTNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{Cu}$	875,2236	875,2155 $[M]^+$
NiTNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{Ni}$	870,2293	871,2255 $[M+H]^+$
CoCITNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{CoCl}$	906,1961	871,2254 $[M-Cl]^+$
MnCITNafPor	$\text{C}_{60}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{MnCl}$	902,2009	867,2308 $[M-Cl]^+$

5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Em geral, o espectro de RMN de ^1H da porfirina base-livre TNafPor apresenta o perfil esperado para porfirinas *meso*-tetra-substituídas. Para a TNafPor, os sinais em 8,48 ppm correspondem às ressonâncias dos prótons β -pirrólicos. Como esperado, os dupletos a 8,09 ppm com constantes de acoplamento (J) de 10,2 Hz e sinais multipletos a 7,11 a 7,48 e 8,21-8,28 foram identificados como as ressonâncias dos prótons das porções naftil nas posições *meso*. Além disso, o sinal típico correspondente aos prótons internos (NH) da porfirina base-livre aparece em δ - 2,24 (Anexo 8.2).

Os espectros de RMN de ^1H para os complexos de Zn^{II} e Ni^{II} não foram realizados devido a precipitação dos derivados no tubo durante as análises. Para os derivados Cu^{II} , Co^{III} e Mn^{III} os espectros de RMN de ^1H não foram realizados devido à presença de paramagnetismo das amostras.

5.5 Espectroscopia na região do Infravermelho

As porfirinas apresentam um padrão de absorção complexo na região do infravermelho, possuindo em torno de 100-105 modos vibracionais fundamentais, entre esses inclui: deformações estruturais simétricas e assimétricas do anel macrocíclico, vibrações de átomos de hidrogênio ligados aos carbonos e nitrogênio, além de distorções dos grupos substituintes, fora

do plano do anel porfirínico [63, 64]. A Tabela 3 apresenta os principais estiramentos e deformações encontrados para a porfirina base-livre e seus derivados metalados. Os espectros estão relatados no Anexo 8.3.

Tabela 3: Principais estiramentos (ν) e deformações (δ) na região do infravermelho (em pastilha de KBr).

Porfirinas	Estiramentos e deformações em cm^{-1}
TNafPor	3315 ($\nu_{\text{N-H}}$), 3044 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1709 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1578 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1344 ($\delta_{\text{C-C}}$), 950 ($\delta_{\text{C-H}}$), 790 ($\delta_{\text{C-N}}$)
ZnTNafPor	3043 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1813 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1590 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1338 ($\delta_{\text{C-C}}$), 977 ($\delta_{\text{C-H}}$), 794 ($\delta_{\text{C-N}}$)
CuTNafPor	3432 (ν_{OH}), 3043 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1814 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1590 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1341 ($\delta_{\text{C-C}}$), 978 ($\delta_{\text{C-H}}$), 795 ($\delta_{\text{C-N}}$)
NiTNafPor	3316 (ν_{OH}), 3044 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1810 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1503 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1345 ($\delta_{\text{C-C}}$), 980 ($\delta_{\text{C-H}}$), 794 ($\delta_{\text{C-N}}$)
CoCITNafPor	3441 (ν_{OH}), 3044 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1812 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1591 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1345 ($\delta_{\text{C-C}}$), 981 ($\delta_{\text{C-H}}$), 794 ($\delta_{\text{C-N}}$)
MnCITNafPor	3426 (ν_{OH}), 3053 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1591 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1502 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1340 ($\delta_{\text{C-C}}$), 983 ($\delta_{\text{C-H}}$), 797 ($\delta_{\text{C-N}}$)

5.6 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis e de emissão fluorescente

Porfirinas apresentam um perfil característico quanto ao espectro de absorção na região do UV-vis. Tanto da porfirina base-livre quanto das metaloporfirinas, os espectros consistem de um conjunto de bandas de absorção sobrepostas na faixa de 400-700 nm, corroborando com as propriedades de absorção características das porfirinas, conforme observado na Figura 4a. Em geral, a porfirina base-livre TNafPor exibe bandas características: a banda de absorção Soret em 423 nm ($\epsilon = 169.824 \text{ L.mol cm}^{-1}$), enquanto as bandas Q foram observadas a 516 ($Q_{y(1-0)}$), 547 ($Q_{y(0-0)}$), 590 ($Q_{x(1-0)}$) e 652 nm ($Q_{x(0-0)}$), respectivamente (Tabela 4). A Tabela 4 apresenta valores correspondentes das bandas de absorção Soret e Q para os complexos Zn^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} e Co^{III} , observadas na faixa de comprimento de onda entre 420-470 nm para a banda Soret e entre 525-660 nm para as bandas Q, respectivamente. O derivado MnCITNafPor exibe transições eletrônicas na região entre 375-425 nm, podendo ser atribuídas a transições do tipo MLCT (transferência de carga metal ligante), conforme relatado na literatura [65, 66].

Apesar de suas semelhanças, nota-se que a banda Soret é estreita para os complexos Zn^{II} e Cu^{II} , quando comparada com as porfirinas Ni^{II} , Co^{III} e Mn^{III} . Esta observação é consistente com a tetra-coordenação de íons Zn^{II} , Cu^{II} e Ni^{II} gerando uma geometria quadrática-planar e com a penta-coordenação das porfirinas de Co^{III} e Mn^{III} em uma geometria do tipo pirâmide de base quadrada distorcida, do ambiente de coordenação do macrociclo, pela presença de um ligante axial cloreto (Cl^-). Além disso, a inserção de íons de metais que são pouco eletronegativos ocasionou um deslocamento batocrômico da banda Soret [67].

Os espectros de emissão de fluorescência de porfirinas em solução de DMSO (λ_{exc} a 430 nm; faixa de 550-800 nm) e os dados espectrais estão relacionados na Tabela 4. Os espectros são mostrados na Figura 4b e o rendimento quântico de emissão (Φ_{fl}) foi estimado a partir dos espectros de emissão e absorção da *meso*-tetra(fenil)porfirina como referência (TPP; $\Phi_{fl} = 0,150$ em DCM) por um método comparativo.

Constatou-se que os rendimentos quânticos de emissão dos derivados de porfirinas estudados nessa dissertação são menores que o rendimento quântico de emissão do padrão TPP. Este fato pode ser atribuído a um aumento de elétrons *d* não emparelhados nas metaloporfirinas. Entretanto, a presença de íons zinco(II) na porfirina, resulta em um aumento da intensidade de emissão e do rendimento quântico, devido à configuração de camada cheia (d^{10}) dos íons Zn^{II} . Os diferentes valores para os rendimentos quânticos podem também estar atribuído ao acoplamento eletrônico entre a unidade naftil e o anel porfirínico pela presença ou ausência do íon metálico.

O aumento do número atômico do metal no centro do anel porfirínico ocasiona um decréscimo nas intensidades de fluorescência, isso devido a outros processos de desativação do estado singlete. A distorção da planaridade do anel também pode ocasionar na diminuição da emissão fluorescente [67].

Figura 4:(a) Espectros de absorção UV-vis e (b) Espectros de emissão fluorescente em soluções de DMSO.

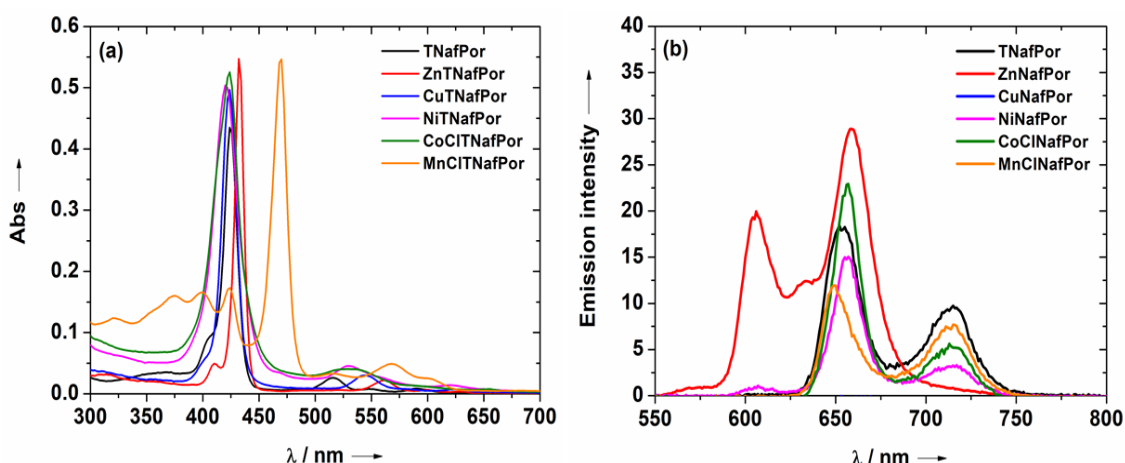


Tabela 4: Dados fotofísicos de absorção e emissão fluorescente das porfirinas estudadas.

Porfirina	λ , nm (log ϵ ; L.mol cm ⁻¹) ^a	λ_{em} , nm ^{b,c}	Φ_f ^d
TNafPor	423 (5.23), 516 (4.03), 547 (3.50), 590 (3.53), 652 (3.28)	653, 715	0.018
ZnTNafPor	432 (5.54), 562 (4.15), 599 (3.63)	606, 658	0.103
CuTNafPor	424 (5.50), 544 (4.28), 622 (3.66)	n.d.*	n.d.*
NiTNafPor	420 (5.50), 529 (4.46), 620 (3.96)	656, 716	0.010
CoCITNafPor	424 (5.56), 531 (4.41), 655 (3.70)	656, 714	0.012
MnCITNafPor	399 (5.09), 470 (5.60), 568 (4.56), 600 (4.27)	649, 715	0.011

^{a,b} em solução de DMSO; ^cexcitação em 430 nm; ^d referência utilizada tetra(fenil)porfirina em DCM (TPP – $\Phi_f = 0.150$); *n.d. = não determinado, abaixo de 1%.

5.7 Cálculos teóricos DFT

A análise conformacional das porfirinas *meso*-tetra-(1-naftil)substituídas proporcionou diferentes estruturas de acordo com a disposição dos grupos naftil ligados às posições *meso* do anel porfirínico. A estrutura da porfirina base-livre apresenta simetria semelhante a D_{2h} , devido à disposição alternada dos quatro substituintes naftil presentes nas posições *meso*. Já as metaloporfirinas pertencem ao grupo de ponto D_{4h} , com aumento da simetria em relação às porfirinas não metaladas [68]. A partir das estruturas otimizadas, o espectro de absorção eletrônica foi calculado e os comprimentos de onda de absorção são mostrados na Tabela 5, contendo a energia de excitação e a força do oscilador para os cinco estados excitados mais baixos.

Em relação às suas propriedades fotofísicas, as porfirinas podem ser definidas como regulares ou irregulares. De maneira geral, as porfirinas regulares têm seus espectros de absorção e emissão determinados essencialmente pelos elétrons π do anel porfirínico, sofrendo apenas uma pequena perturbação devido ao substituinte central. Tanto as porfirinas base-livre quanto as metaloporfirinas estudadas neste trabalho são exemplos desse tipo. Para a porfirina base-livre TNafPor, observou-se bandas Q mais fracas em 609 e 558 nm com força de oscilador igual a 0,0026 e 0,0036, respectivamente. Essas transições são o resultado da divisão da banda Q da base-livre na forma neutra (uma vez que, a presença de átomos de nitrogênios protonados perderia a simetria). A banda Soret consiste em duas transições em 392 e 387 nm e força do oscilador de 1,7168 e 1,9915, respectivamente. Essa divisão na banda Soret (banda B) ocorre pelo mesmo motivo da perda de simetria. Esta mesma banda Soret foi observada com intensidade para as moléculas de ZnTNafPor e NiTNafPor. Para o composto ZnTNafPor, a

banda B ocorre a 388,11 e 388,10 nm e a força do oscilador de 1,8506 e 1,8517, enquanto que para o derivado NiTNafPor a banda B consiste em transições de 375,15 e 375,01 nm e resistência do oscilador de 1,7277 e 1,6826, respectivamente. Os demais valores para as transições observadas das porfirinas estudadas neste trabalho estão presentes na Tabela 5.

A probabilidade de transição para uma dada absorção pode estar relacionada com a intensidade de absorção através da força do oscilador f . Para a transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$, os valores de f não são maiores que 10^{-3} . No caso da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, os valores de f são, em princípio, muito maiores (exceto para transições proibidas e simétricas): f é próximo de 1.0 para alguns compostos. De acordo com os valores apresentados na Tabela 5, é possível observar que as bandas Q apresentam transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$, enquanto as bandas Soret podem ser atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Todos os espectros de absorção UV-vis calculados teoricamente são apresentados no Anexo 8.4.

Tabela 5: Dados teóricos obtidos utilizando o cálculo ω B97XD/jun-cc-pVTZ calculado em DMSO.

TNafPor			ZnTNafPor			CuTNafPor		
λ (nm)	E_{exc} (eV)	f	λ (nm)	E_{exc} (eV)	F	λ (nm)	E_{exc} (eV)	f
609,73	2,0334	0,0026	568,23	2,1819	0,0006	593,91	2,0876	0,0001
558,45	2,2201	0,0036	568,23	2,1819	0,0006	593,91	2,0876	0,0001
392,75	3,1568	1,7168	388,11	3,1945	1,8506	556,58	2,2276	0,0001
387,48	3,1997	1,9915	388,10	3,1946	1,8517			
321,11	3,8611	0,0001	330,80	3,7480	0,0002			
NiTNafPor			CoCITNafPor			MnCITNafPor		
λ (nm)	E_{exc} (eV)	f	λ (nm)	E_{exc} (eV)	F	λ (nm)	E_{exc} (eV)	f
532,21	2,3296	0,0007	659,35	1,8804	0,0001	863,11	1,4365	0,0002
532,15	2,3299	0,0004	616,61	2,0107	0,0012	510,51	2,4286	0,0049
375,15	3,3049	1,7277	530,61	2,3366	0,0084	509,45	2,4337	0,0039
375,01	3,3062	1,6826				492,99	2,5149	0,0001
368,03	3,3689	0,0125						

A falta de planaridade na estereoquímica da porfirina pode desempenhar um diferente papel nas bandas de absorção do composto. As bandas Soret (banda B) e Q são atribuídas a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, portanto as transições do anel porfirínico são visíveis às mudanças conformacionais do anel. A diminuição da conjugação eletrônica é conhecida por aumentar a energia do orbital ocupado (HOMO) e do orbital de menor energia desocupado (LUMO) de moléculas, como mostrado na Tabela 6. Ao distorcer a estrutura do anel da porfirina, haverá uma mudança para a região do vermelho. Esse deslocamento batocrômico ocorre devido a uma maior desestabilização dos orbitais HOMO em relação aos níveis orbitais do LUMO. Nestas estruturas distorcidas, o orbital d_{xy} do íon metálico está em contato direto com o orbital p_z (π^*) do núcleo da porfirina, criando um possível contato paramagnético com o anel muito mais pronunciado que na configuração planar, onde os orbitais $d\pi$, que compartilham o elétron desemparelhado, não possuem a mesma interação com os orbitais da porfirina, sendo mais sobrepostas com os orbitais dos ligantes axiais.

Na porfirina base-livre TNafPor e na metaloporfirina ZnTNafPor, onde o íon metálico apresenta uma configuração eletrônica de camada completa (d^{10}), não há variação de energia envolvendo as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Entretanto, para demais metaloporfirinas, cujo íon metálico central está com os orbitais d parcialmente preenchidos, evidenciam uma interação significativa dos orbitais $d\pi$ do metal com os orbitais π^* do macrociclo (retro-doação eletrônica), o que causa um aumento na diferença de energia do orbital π em relação ao orbital π^* . Nos espectros experimentais de UV-vis evidenciados na Figura 4a, este fato é mostrado pela diminuição do número de bandas Q (de quatro para duas transições observadas).

Outra medida importante para o estudo realizado é o comprimento de onda máximo de absorção e sua relação com os valores de diferença de energia entre os orbitais de fronteira (ΔE). Na Tabela 6 estão presentes valores, que nos quais consistem em valores de menor diferença de energia entre o orbital HOMO e o orbital LUMO. Quanto menor a diferença, menor a energia necessária para promover um elétron entre esses orbitais. Uma diferença entre os valores de energia HOMO e LUMO próximos a 4,0 eV indica que o λ_{\max} estará na região do ultravioleta (UV). Em contrapartida, uma diferença de energia entre o intervalo de 1,5 e 3,0 eV, o λ_{\max} será observado na região do visível do espectro eletromagnético [69]. De acordo com a Tabela 6, que apresenta os valores de energia relacionados aos orbitais HOMO e LUMO e a diferença de energia entre eles (valores de *band gap*), pode-se observar que todos os valores calculados estão entre 5,5 a 6,5 eV.

Tabela 6: Valores de energia (em eV) calculados teoricamente para os orbitais HOMO e LUMO.

Porfirina	HOMO (eV)	LUMO (eV)	ΔE (gap, em eV)
TNafPor	-7,0892	-1,5181	5,5711
ZnTNafPor	-6,9787	-1,3260	5,6527
CuTNafPor	-7,0361	-1,2553	5,7808
NiTNafPor	-7,0413	-1,2387	5,8026
CoCITNafPor	-7,1839	-1,4814	5,7025
MnCITNafPor	-8,4835	-2,1179	6,3656

Na Figura 5 e Figura 6, observa-se que os orbitais HOMO e LUMO foram homoganeamente distribuídos pelo anel porfirínico e que os grupos naftil contribuem para essa transição. Com exceção das estruturas das porfirinas CoCITNafPor e MnCITNafPor, os orbitais de fronteira HOMO e LUMO estão localizados nos átomos de nitrogênio e carbono dos anéis pirrólicos. Isso pode ter ocorrido como consequência da planaridade que as porfirinas base-livre, assim como as metaloporfirinas de zinco(II), cobre(II) e níquel(II) apresentaram. Enquanto isso, as porfirinas de cobalto(III) e manganês(III), que contém ligante cloreto axial nas estruturas, possuem uma distorção no anel porfirínico.

Figura 5: Vista frontal das estruturas otimizadas dos compostos estudados obtidos pelo conjunto de base DFT//cc-pVDZ.

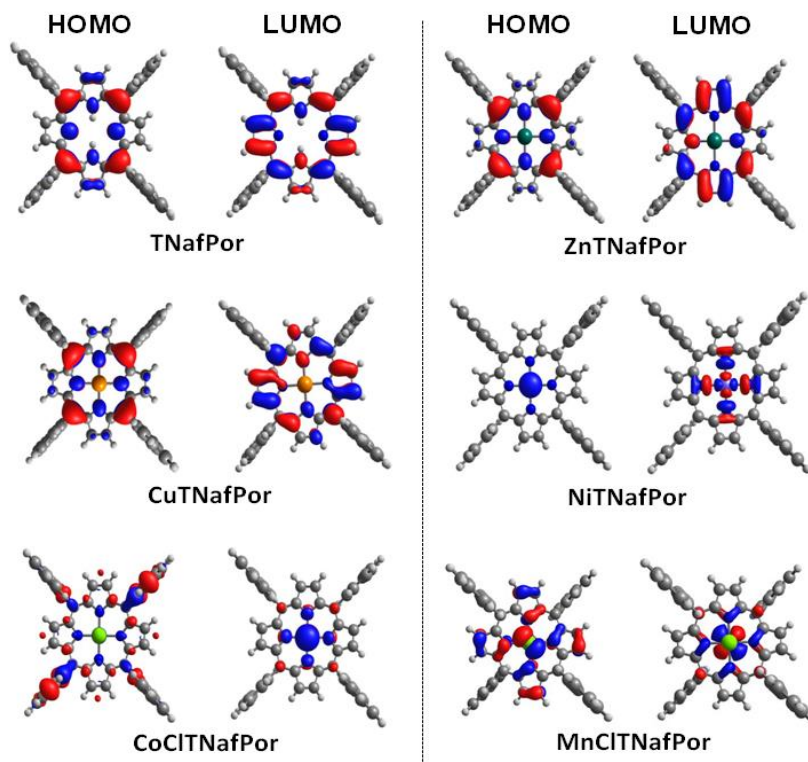
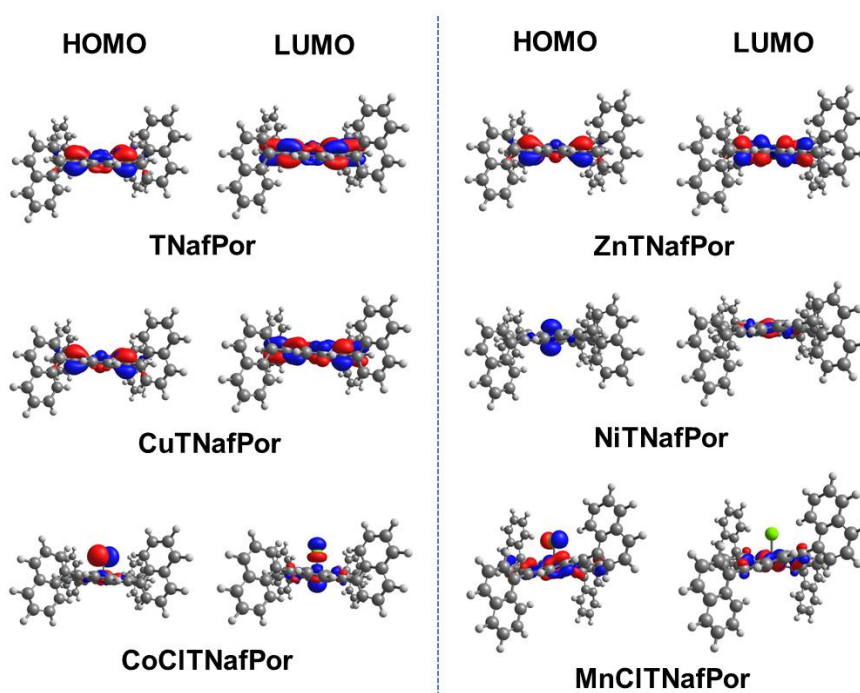


Figura 6: Vista lateral das estruturas otimizadas dos compostos estudados obtidos pelo conjunto de base DFT//cc-pVDZ.



5.8 Eletroquímica

Na Figura 7 estão presentes os voltamogramas cíclicos das porfirinas em DCM anidro, utilizando uma janela entre -2,00 V a +1,50 V. Ao analisar o comportamento eletroquímico da porfirina base-livre TNafPor é possível observar que o voltamograma cíclico mostra picos irreversíveis na faixa entre 0,0 V a +1,20 V, que pode ser atribuído ao processo de oxidação do substituinte naftil em $E_{pa} = +0,64$ V *versus* Fc⁺/Fc, seguindo dois picos anódicos em $E_{pa} = +0,97$ V e +1,15 V, o que pode ser atribuído à oxidação mono-eletrônica do anel da porfirina, formando uma espécie π -cátion radical seguida de espécies do tipo dicátion (Tabela 7). Já para a região negativa de potencial (de 0,0 V a -1,80 V), observou-se a presença de um processo de redução em $E_{pc} = -1,73$ V, que pode ser atribuído à redução mono-eletrônica da porfirina, formando uma espécie π -ânion radicalar em solução (Tabela 7).

Para as metaloporfirinas no estado de oxidação 2+ (ZnTNafPor, CuTNafPor e NiTNafPor), foram observados dois processos de oxidação (*quasi*-reversível) e um processo de redução (irreversível). No caso das metaloporfirinas com o estado de oxidação 3+ (CoCITNafPor e MnCITNafPor) foram observados três processos de oxidação (irreversível e *quasi*-reversível) e um processo de redução (irreversível). O primeiro processo de oxidação nas metaloporfirinas pode ser atribuído à oxidação de unidades naftil, provavelmente formando espécies radicalares em solução. Em seguida, o segundo e terceiro processos observados na região anódica em todas as metaloporfirinas podem ser atribuídos à oxidação mono-eletrônica do anel de porfirina, gerando espécies do tipo π -cátion radical e dicátion, respectivamente. Movendo-se para a região negativa de potencial (região catódica), um único processo de redução foi observado e este pode ser atribuído à uma redução mono-eletrônica do anel da porfirina, através da formação de espécie do tipo π -ânion radical em solução.

Figura 7: (a) Voltamograma cíclico comparativo de compostos das porfirinas e (b) processos de oxidação das porfirinas, em diclorometano anidro contendo 0,1 mol/L de TBAPF6, como eletrólito de suporte, utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV/s.

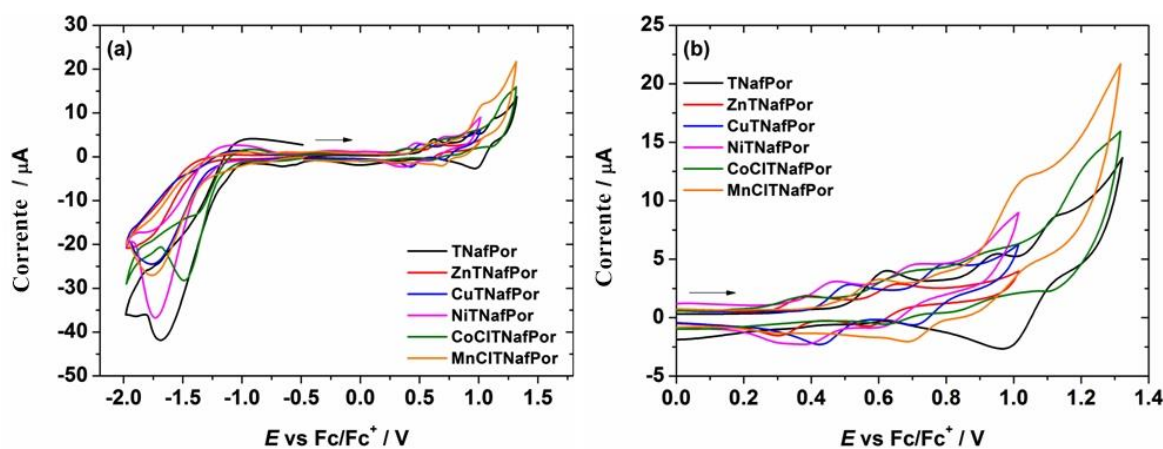


Tabela 7: Dados eletroquímicos da porfirina base-livre e metaloporfirinas em diclorometano anidro (*versus* Fc⁺/Fc).

Porfirina	Potencial em Volts (<i>versus</i> Fc ⁺ /Fc)				Valores de energia (em eV)		
	Oxidação			Redução	HOMO ^d	LUMO ^e	ΔE ^f
	<i>E</i> _{ox1}	<i>E</i> _{ox2}	<i>E</i> _{ox3}	<i>E</i> _{red1}			
TNaFpor	+0,64 V ^a	+0,97 V ^a	+1,15 V ^a	-1,73 V ^b	-5,370	-2,670	2,70
ZnTNaFpor	+0,34 V ^c	+0,61 V ^c	-----	-1,84 V ^b	-5,010	-2,560	2,45
CuTNaFpor	+0,47 V ^c	+0,76 V ^c	-----	-1,82 V ^b	-5,160	-2,580	2,58
NiTNaFpor	+0,43 V ^c	+0,65 V ^c	-----	-1,76 V ^b	-5,050	-2,640	2,41
CoCITNaFpor	+0,44 V ^a	+0,60 V ^c	+1,00 V ^a	-1,49 V ^b	-5,000	-2,910	2,09
MnCITNaFpor	+0,54 V ^c	+0,74 V ^c	+1,00 V ^a	-1,76 V ^b	-5,140	-2,640	2,50

^a*E*_{pa} = potencial de pico anódico; ^b*E*_{pc} = potencial de pico catódico; ^c*E*_{1/2} = *E*_{pa} + *E*_{pc} / 2; ^d*E*_{HOMO} = -[4.4 + *E*_{ox2} (*versus* Fc⁺/Fc)] (em eV); ^e*E*_{LUMO} = -[4.4 + *E*_{red1} (*versus* Fc⁺/Fc)] (em eV); ^fΔ*E* = *E*_{LUMO} - *E*_{HOMO}.

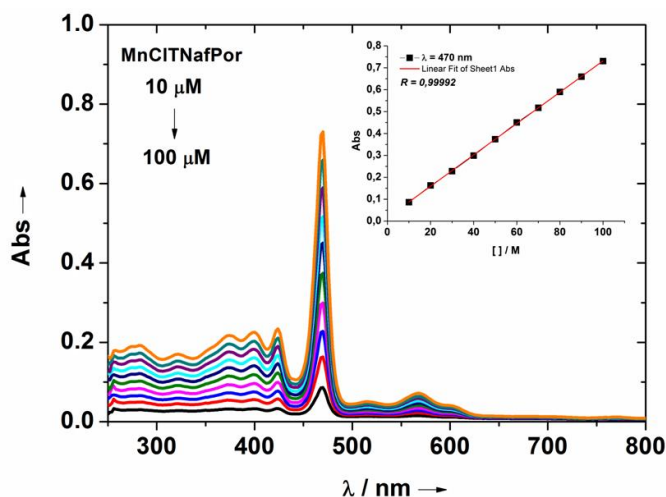
5.9 Estudo de agregação das porfirinas

Dentro das características de um fotossensibilizador, para o emprego em terapia fotodinâmica, está a baixa agregação do composto em solução. Substâncias que agregam tendem a ter menores eficiência como fotossensibilizadores, pelo fato de que a agregação diminui a capacidade de geração de oxigênio singlete [55].

A avaliação do comportamento de agregação de porfirinas em solução foi estudada por análise de absorção UV-vis em DMSO [70]. Observou-se que não houve desvios significativos nos comprimentos de onda de absorbância, nenhum desvio para o vermelho ou azul, bem como nenhum alargamento das bandas ou surgimento de novas bandas foi apresentado. Além disso,

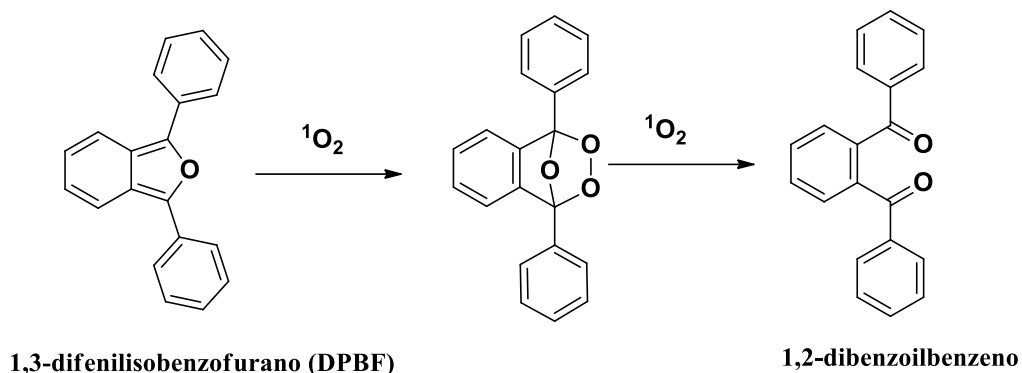
constatou-se um aumento linear no espectro de absorção em função da variação de concentração de 10-100 μM , monitoramento da banda Soret, indicando que a agregação não está presente em nenhuma das porfirinas estudadas. A Figura 8 apresenta o estudo feito para a porfirina MnCITNafPor, os demais estudos estão no Anexo 8.5.

Figura 8: Estudo de agregação para MnCITNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 470 nm em função da concentração.



5.10 Rendimento quântico de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e fotoestabilidade das porfirinas

O estudo da capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ foi realizado utilizando o reagente 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) em DMSO como solvente. O ensaio de foto-oxidação do DPBF tem sido empregado para proporcionar uma análise quantitativa da produção de oxigênio singlete, uma vez que o produto da reação (1,2-dibenzoilbenzeno) não absorve luz na região do visível (400-800 nm), reação mostrada no Esquema 6. Dessa forma, as mudanças na absorbância do DPBF estão diretamente relacionadas à quantidade de espécies de $^1\text{O}_2$ gerada [71].

Esquema 6: Esquema representativo da reação do DPBF e $^1\text{O}_2$.

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

Na Tabela 8 estão relacionados os valores de rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) para cada derivado porfirínico. No experimento, foi monitorada a diminuição da absorvância do DPBF, em 415 nm, durante a irradiação com um laser de diodo monocromático em 660 nm (vermelho), em solução de DMSO. O valor de Φ_{Δ} obtidos para todas as porfirinas foi na faixa entre 0,01 a 0,07, sendo menor que a ftalocianina de zinco (ZnPc, estrutura no Anexo 8.9), molécula padrão usada neste trabalho ($\Phi_{\Delta\text{std}} = 0,67$). Assim, os compostos em estudo apresentaram baixa capacidade de gerar oxigênio singleto, provavelmente devido à presença de íons metálicos no núcleo da porfirina e pela persistência de moléculas no estado singleto excitado (S_1).

Tabela 8: Dados de rendimento quântico de oxigênio singleto das porfirinas, através da foto-oxidação do DPBF.

Composto	Φ_{Δ}^*
TNafPor	0,070
ZnTNafPor	0,040
CuTNafPor	0,020
NiTNafPor	0,014
CoCITNafPor	**
MnCITNafPor	**

*usando ftalocianina de zinco em DMSO como padrão (ZnPc - $\Phi_{\Delta} = 0,67$);

** Φ_{Δ} valores <1%.

A medida de fotoestabilidade mostra-se como um parâmetro importante no que diz respeito ao possível emprego de compostos em terapia fotodinâmica. Devido ao fato de moléculas que são mais foto-estáveis tenderem a manter as suas características fotofísicas após serem expostas a irradiações, porfirinas de maneira geral possuem boas fotoestabilidade frente a luz visível [21, 36]. Deste modo, a análise de foto-branqueamento é um parâmetro importante para o estudo da fotodegradação de porfirinas após a irradiação com fonte de luz, na qual o oxigênio singlete pode reagir com o fotossensibilizador promovendo, assim, sua própria degradação [72]. Devido a isso, a fotoestabilidade de porfirinas pode ser acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-vis ou pela espectroscopia de emissão de fluorescência [73].

A Tabela 9 mostra que as porfirinas desse estudo apresentam estabilidade moderada quando irradiadas com uma placa de LEDs brancos (fluência luminosa de 50 mW cm^{-2}) durante 60 min, sendo a MnCITNafPor a que maior apresentou fotoestabilidade. Seguindo uma ordem crescente de fotoestabilidade: TNafPor < CuTNafPor < ZnTNafPor < CoCITNafPor < NiTNafPor < MnCITNafPor. O estudo consistiu no monitoramento da absorção da banda Soret. Pode-se perceber que as metaloporfirinas apresentam maior fotoestabilidade em comparação a base-livre, isso se deve ao fato do íon de metal causar maior rigidez ao macrociclo dificultando o processo de fotodegradação das mesmas.

Tabela 9: Estudo de fotoestabilidade para as porfirinas em solução de DMSO.

Porfirina	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
TNafPor	100%	85,6%	69,8%	58,4%	48,8%	40,0%	35,8%
ZnTNafPor	100%	99,2%	98,2%	94,5%	86,5%	78,9%	78,9%
CuTNafPor	100%	97,8%	94,2%	88,8%	81,9%	75,0%	71,5%
NiTNafPor	100%	99,0%	97,6%	96,7%	95,7%	95,2%	93,4%
CoCITNafPor	100%	96,6%	94,3%	91,7%	88,6%	85,8%	79,4%
MnCITNafPor	100%	99,7%	99,6%	99,5%	99,5%	99,3%	99,0%

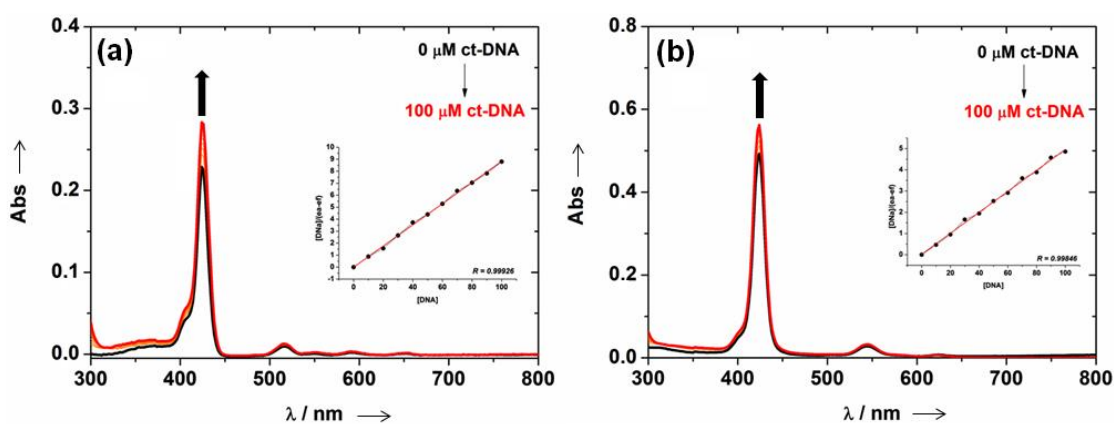
5.11 Interação com DNA

5.11.1 Estudos de absorção UV-vis com ct-DNA

Como a interação entre porfirinas naftil-substituídas e ct-DNA pode oferecer informações sobre sua capacidade de ligação a uma macromolécula, este estudo forneceu a potencial aplicação de cada derivado de porfirina em estudo como possível fotossensibilizador na aplicação em terapia fotodinâmica [13, 74].

A interação dos compostos com o ct-DNA foi realizada por espectroscopia UV-vis. Uma série de titulações do DNA foram efetuadas usando soluções de porfirinas com uma faixa de concentração entre 1,0 a 2,0 μM em uma mistura de uma solução de DMSO (2%) com tampão Tris-HCl (pH 7,4). Como exemplo, a Figura 9 é evidenciado a interação da porfirina base-livre (a) e da metaloporfirina de cobre(II) (b). Os demais espectros estão listados no Anexo 8.6.

Figura 9: Espectros de absorção UV-visível das porfirinas (a) TNafPor e (b) CuTNafPor, com concentração crescente de ct-DNA variando de 0,0 a 100 μM em DMSO (2%) - solução tampão Tris-HCl.



A Tabela 10 (página 61) evidencia a tendência geral de hipercromismo (o aumento na absorbância da banda Soret) para estas porfirinas após a adição de soluções de ct-DNA. Embora os compostos não catiônicos não tenham o potencial de ligação com os grupos fosfato de DNA através de forças eletrostáticas, as porfirinas estudadas demonstraram uma tendência geral de variação da absorção da banda Soret. Há dados de estudos anteriores que relatam que as porfirinas não carregadas também têm atividade contra a replicação de DNA carcinogênico [75].

Os valores de variação de absorção obtidos para as porfirinas (em torno de 5 a 20%) levaram a supor que estes derivados porfirínicos se ligam ao DNA por modos não clássicos

envolvendo, provavelmente, a inserção parcial das unidades naftil entre pares de bases adjacentes no DNA [76].

De modo a melhor entendimento da ligação ao DNA, as constantes de ligação das porfirinas à biomolécula (K_b) foram calculadas conforme descrito na seção experimental deste trabalho (página 33) e resumidas na Tabela 10. Os valores de K_b indicam que o complexo zinco(II) ZnTNafPor e de base-livre TNafPor, podem interagir mais fortemente ao DNA, seguindo a ordem crescente de K_b : CoCITNafPor < MnCITNafPor < NiTNafPor < CuTNafPor < ZnTNafPor < TNafPor. Em comparação a outros compostos que exibem K_b na faixa de 10^6 e 10^4 as porfirinas desse trabalho apresentam interações moderadas com o DNA, uma vez que apresentam constantes na faixa de 10^5 [77, 78].

O efeito da interação para a base-livre TNafPor foi em torno de 2-3 vezes maior que nas correspondentes metaloporfirinas. Nenhum desvio para o vermelho (deslocamento batocrômico) da banda Soret foi observado para todos os compostos após a adição do ct-DNA, indicando que não deve haver uma possível intercalação com a dupla fita de DNA. Os resultados sugerem que a interação dessas porfirinas ocorre mais provavelmente por meio do empilhamento π e da interação secundária de hidrogênio com o ct-DNA, sem a interferência direta do centro metálico [79].

5.11.2 Ensaios competitivos de emissão fluorescente de EB-DNA

Ensaios de ligação competitiva utilizando a técnica de emissão de fluorescência podem ser úteis para determinar o deslocamento do brometo de etídio (EB) intercalante na estrutura do ct-DNA para confirmação adicional da afinidade de ligação de cada derivado de porfirina [80]. Com isso, interpretações das alterações observadas nos espectros de emissão do EB após ligar-se ao ct-DNA são frequentemente utilizadas para estudos de interação entre DNA e derivados de porfirinas.

Os espectros de emissão de fluorescência no estado estacionário foram monitorados contendo concentrações crescentes de cada porfirina adicionada por titulação a uma concentração fixa de ct-DNA com EB. Como pode ser visto na Figura 10, a interação EB-DNA mostra uma banda de emissão em $\lambda = 650$ nm, quando excitada em $\lambda_{exc} = 510$ nm. Como exemplo, a Figura 10 apresenta os espectros de emissão de EB ligado a ct-DNA tanto na ausência como na presença das metaloporfirinas CuTNafPor (**a**) e MnCITNafPor (**b**). Os resultados para os outros derivados porfirínicos são apresentados no Anexo 8.7.

Os resultados demonstraram uma extinção da intensidade de fluorescência do complexo EB-DNA após a adição de concentrações crescentes de cada derivado de porfirina. Tal fato observado pode ser atribuído à competição de derivados de metaloporfirina com EB sobre a ligação aos sulcos do DNA, uma vez que a presença de outro composto que pode agir como um intercalante reduz a fluorescência emitida pelo sistema EB-DNA. Em consequência disso, a fluorescência do EB-DNA é medida na ausência e na presença do composto estudado [81]. Os valores das constantes de extinção de Stern-Volmer (K_{SV}), para os compostos desse estudo, estão listados na Tabela 10.

Figura 10: Espectro de emissão de fluorescência em estado estacionário de EB ligado a ct-DNA na presença de (a) CuTNafPor e (b) MnCITNafPor, numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.

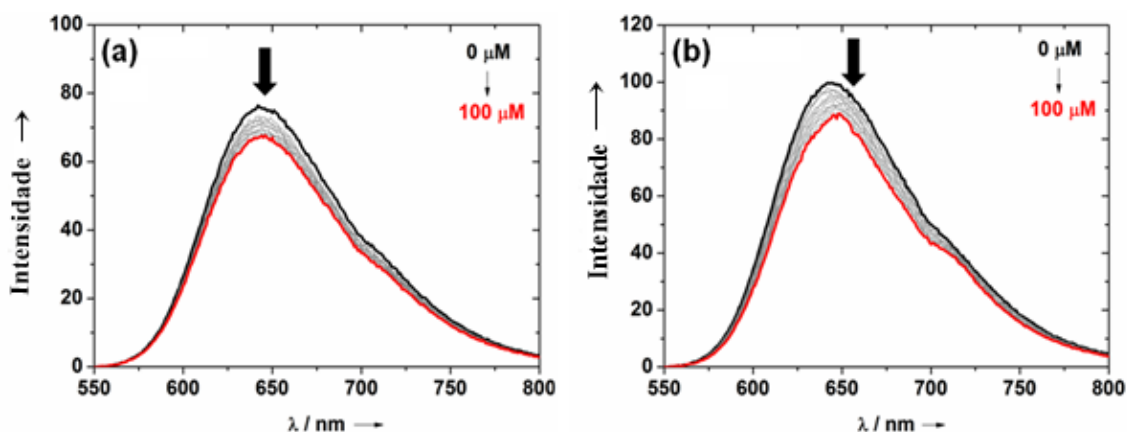


Tabela 10: Dados espectrais para a interação de porfirinas com ct-DNA por absorção UV-vis e análise de emissão fluorescente no estado estacionário.

Composto	H (%) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^b	K_b (M ⁻¹) ^c x 10 ⁵	K_{SV} (M ⁻¹) ^d x 10 ⁴
TNafPor	19,40	0,0	9,72	1,90
ZnTNafPor	5,45	0,0	7,30	0,73
CuTNafPor	11,65	0,0	2,86	1,27
NiTNafPor	3,40	0,0	1,74	1,37
CoCITNafPor	9,40	0,0	1,44	0,95
MnCITNafPor	9,73	0,0	1,70	1,36

^a $H(\%) = (Abs_{inicial} - Abs_{final})/Abs_{inicial} \times 100$; ^bDeslocamento para o vermelho = $\lambda_{final} - \lambda_{inicial}$; ^cConstante de ligação;

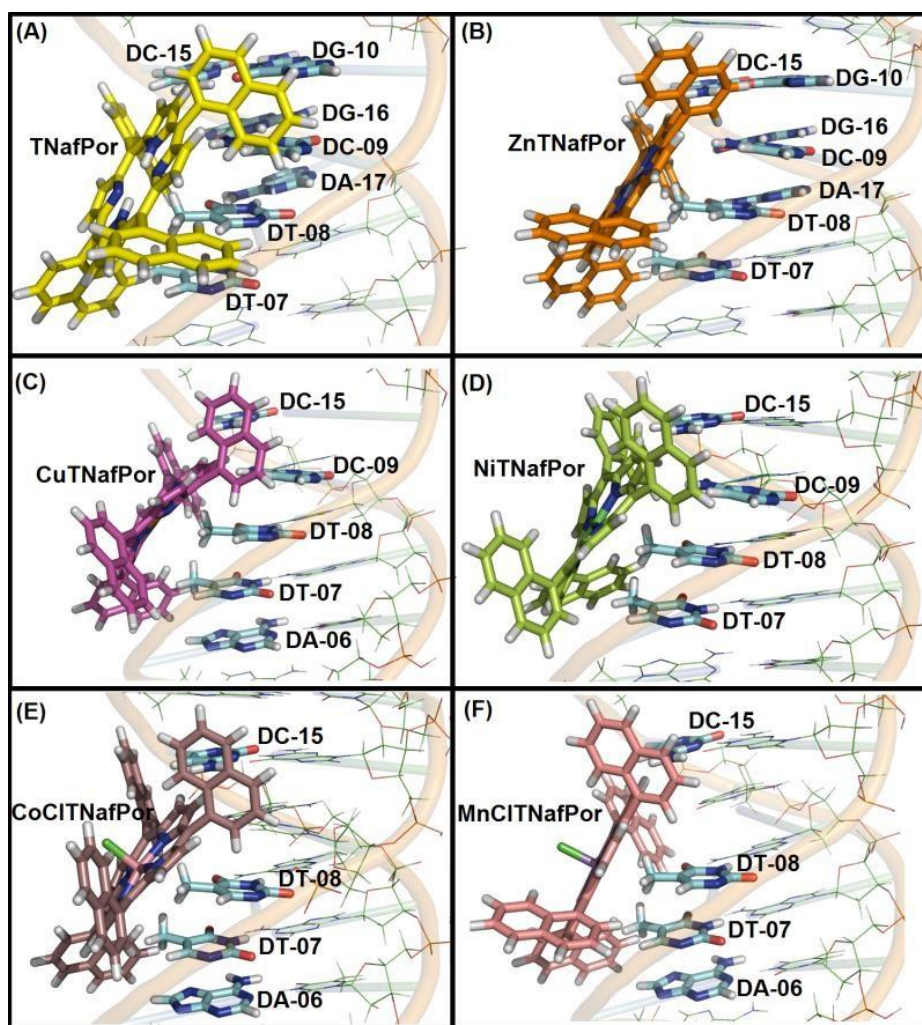
^dConstante de extinção de Stern-Volmer.

Os valores encontrados para as constantes K_{sv} das porfirinas estudadas estão na ordem de 10^4 , sendo valores moderados, uma vez que na literatura são encontrados valores menores que 10^3 e maiores que 10^5 [78, 81, 82].

5.11.3 Docking molecular

De modo a oferecer uma explicação ao nível molecular sobre a capacidade de ligação de cada derivado de porfirina *meso*-tetra(1-naftil)substituída em relação ao DNA, realizaram-se estudos teóricos utilizando o cálculo de *docking* molecular. A Figura 11 mostra a melhor conformação para a interação entre o DNA e cada derivado de porfirina, o que sugere interações de van der Waals e interações hidrofóbicas como as principais forças de ligação.

Figura 11: Estudo de modelagem molecular para os derivados porfirínicos.



As bases nitrogenadas selecionadas estão na representação em bastão na cor ciano, enquanto as porfirinas TNafPor, ZnTNafPor, CuTNafPor, NiTNafPor, CoCITNafPor e MnCITNafPor são representadas nas cores amarelo, laranja, rosa, verde claro, marrom e bege, respectivamente. Demais sequência de cores: hidrogênio como branco; oxigênio como vermelho; nitrogênio como azul escuro e cloreto como verde escuro.

Os resultados de interação molecular sugerem que todos os derivados de porfirinas deste trabalho não se ligam dentro do sulco principal do DNA de dupla fita (sulco maior), provavelmente devido à conformação da porfirina [83]. Os resultados para a base-livre TNafPor sugeriram que ela pode interagir com resíduos de nucleobase de guanina, citosina, timina e adenina DT-07, DT-08, DC-09, DC-15, DG-16 e DA-17 e podem interagir via forças de van der Waals com distâncias de 1,20; 2,80; 3,30; 1,00; 3,40 e 3,00 Å, respectivamente, enquanto o anel aromático da nucleobase DG-10 interage através do empilhamento em "t" com um dos grupos naftil presentes na estrutura da porfirina, a uma distância de 3,30 Å (Figura 11A).

Experimentalmente já evidenciado, a presença dos íons na estrutura da porfirina diminuiu sua capacidade de ligação com o DNA e os resultados da modelagem molecular sugerem que isso ocorreu devido à ausência de interação hidrofóbica entre a metaloporfirina e o DNA. Assim, o derivado ZnTNafPor interage através das forças de van der Waals com os resíduos de nucleobases DT-07, DT-08, DC-09, DG-10, DC-15, DG-16 e DA-17 a uma distância de 1,20; 3,10; 2,20; 2,70; 1,70; 3,90 e 2,80 Å, respectivamente (Figura 11B). Por outro lado, a porfirina CuTNafPor não interage com a guanina (DG), mas com os resíduos de nucleobases DA-06, DT-07, DT-08, DC-09 e DC-15 via forças de van der Waals a uma distância de 1,90; 1,40; 3,50; 1,30 e 3,00 Å. Neste caso, o resultado do *docking* molecular sugeriu que a diminuição experimental na capacidade de ligação de CuTNafPor ao DNA pode estar relacionada com a ausência de interação significativa com o resíduo de guanina (Figura 11C).

Para os compostos NiTNafPor, CoCITNafPor e MnCITNafPor que mostraram capacidade de ligação experimental similar, a simulação computacional sugeriu que ambos pudessem interagir apenas com quatro resíduos de nucleobases através das forças de van der Waals. A porfirina NiTNafPor interage com os resíduos DT-07, DT-08, DC-09 e DC-15 a uma distância de 2,60; 2,90; 2,40 e 3,20 Å (Figura 11D), enquanto CoCITNafPor interage com DA-06, DT-07, DT-08 e DC-15 a distâncias de 1,70; 1,10; 1,90 e 1,80, respectivamente (Figura 11E). Por último, a porfirina MnCITNafPor interage com as porções DA-06, DT-07, DT-08 e DC-15 a uma distância de 1,70; 1,00; 2,20 e 2,00 Å (Figura 11F).

Nesta simulação, apenas as forças de van der Waals foram detectadas como a principal força de ligação para as metaloporfirinas, enquanto as forças hidrofóbicas também foram detectadas para a porfirina base-livre TNafPor.

Constatou-se que a presença de íons Cu^{II} , Ni^{II} , Co^{III} e Mn^{III} coordenados no centro do anel porfirínico, diminuiu sua capacidade de ligação experimental (valores de K_b) quando comparado ao íon Zn^{II} , provavelmente devido à diminuição de nucleobases que interagem com estas metaloporfirinas.

5.12 Estudo de interação com microrganismos

5.12.1 Teste de disco de difusão

O teste de disco de difusão é um dos métodos utilizados para avaliar a susceptibilidade mais simples e confiável em microbiologia. Os perfis de susceptibilidade apresentados pelos microrganismos isolados estão descritos na Tabela 11. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco são mensurados. Destacando o fato da metaloporfirina NiTNafPor não ter atividade em nenhum dos exemplos de microrganismos testados.

Tabela 11: Susceptibilidade bacteriana e fúngica das porfirinas através da disco de difusão.

Microrganismos	Composto/ Halo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35985	Não apresentaram atividade
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Não apresentaram atividade
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1705	Não apresentaram atividade
<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 2994	Não apresentaram atividade
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Não apresentaram atividade
<i>Aeromonas caviae</i> IC	Não apresentaram atividade
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Não apresentaram atividade
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022323A	Não apresentaram atividade
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Não apresentaram atividade

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PNCQ Proex 340	Não apresentaram atividade
<i>Burkholderia cepacia</i> IC	Não apresentaram atividade
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	TNafPor- 1 cm- 1 cm- 1 cm CuTNafPor- 1,5 cm- 1,6 cm – 1 cm
<i>Streptococcus salivarius</i> IC	TNafPor- 1 cm - 1 cm- 1 cm CuTNafPor- 1,5 cm – 1,2 cm- 1 cm
<i>Streptococcus oralis</i> IC	MnCITNafPor- 1 cm- 1,5 cm- 1,2 cm
<i>Streptococcus mutans</i> IC	ZnTNafPor- 1cm- 1,6 cm - 1 cm CuTNafPor- 1,5 cm - 1 cm – 1,2 cm CoCITNafPor- 1 cm – 1,2 cm - 1 cm

Pode-se notar que as quatro cepas, nas quais as porfirinas tiveram atividade, são causadoras de doenças na cavidade oral. Além disso, as três bactérias *Streptococcus* são bactérias gram-positivas. Isso corrobora com os dados da literatura, uma vez que já relatam a utilização de porfirinas em tratamentos de doenças da cavidade oral [84, 85].

Estudos evidenciam que fotossensibilizadores neutros tendem a interagir causando destruição em bactérias gram positivas, uma vez que a permeação através da membrana ocorre de maneira mais fácil devido as diferenças estruturais entre as membranas das gram-positivas e gram-negativas [86].

5.12.2 Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (CBM).

A sensibilidade *in vitro* dos isolados microbianos foi verificada através de experimentos de MIC (Tabela 12) e CBM (Tabela 13). Todos os microrganismos que apresentaram atividade no disco de difusão foram separados e realizados ensaios de interação com as porfirinas na presença (LEDs branco; 5,0 cm de distância; 50 mWcm⁻²) e na ausência de luz (escuro) por 60 minutos. Nenhuma das porfirinas estudadas neste trabalho apresentou atividade nos ensaios conduzidos no escuro. Foi possível observar que o *Streptococcus mutans* IC e o *Streptococcus oralis* IC foram as bactérias gram-positivas mais sensíveis as porfirinas quando irradiadas com luz branca (50 mWcm⁻²) pelo período de irradiação de 60 minutos.

Tabela 12: Concentração inibitória mínima (MIC) para as porfirinas *meso*-tetra(1-naftil) substituídas.

Microrganismos	Luz
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	TNafPor - 0,1 mg mL ⁻¹ (122 μM)
	CuTNafPor - 0,1 mg mL ⁻¹ (114 μM)
<i>Streptococcus salivarius</i> IC	TNafPor - 0,1 mg mL ⁻¹ (122 μM)
	CuTNafPor - 0,1 mg mL ⁻¹ (114 μM)
<i>Streptococcus mutans</i> IC	ZnTNafPor - 0,03 mg mL ⁻¹ (34 μM)
	CuTNafPor - 0,03 mg mL ⁻¹ (34 μM)
	CoCITNafPor - 0,06 mg mL ⁻¹ (66 μM)
<i>Streptococcus oralis</i> IC	MnCITNafPor - 0,03 mg mL ⁻¹ (66 μM)

Os resultados para os testes de MIC, ou seja, da menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, mostraram que de um modo geral as metaloporfirinas interagiram de maneira mais sensível com os microrganismos. Destacando o CuTNafPor para *Candida albicans* ATCC 14053, *Streptococcus salivarius* IC e *Streptococcus mutans* IC.

Tabela 13: Concentração bactericida mínima (CBM) para as porfirinas *meso*-tetra(1-naftil) substituídas.

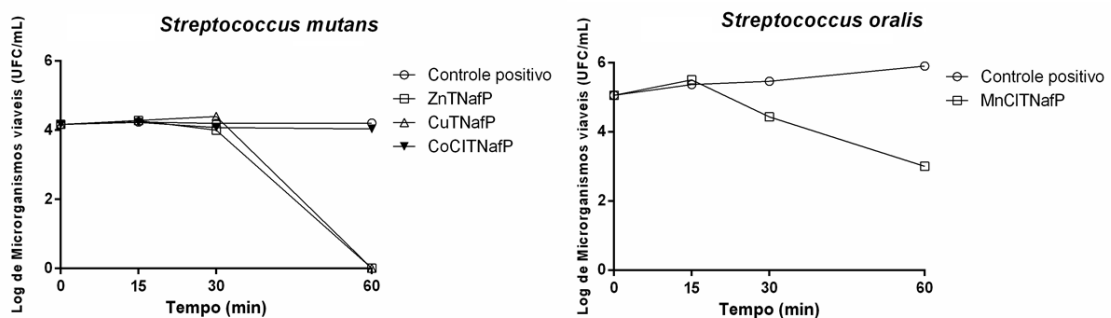
Microrganismos	Luz
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	TNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (171 μM)
	CuTNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (159 μM)
<i>Streptococcus salivarius</i> IC	TNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (171 μM)
	CuTNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (159 μM)
<i>Streptococcus mutans</i> IC	ZnTNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (159 μM)
	CuTNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (159 μM)
	CoCITNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (155 μM)
<i>Streptococcus oralis</i> IC	MnCITNafPor - 0,14 mg mL ⁻¹ (155 μM)

A CBM representa a menor concentração onde não houver crescimento bacteriano, ou seja, onde houve 99,9% de morte bacteriana. Pode-se perceber que as metaloporfirinas apresentam valores de concentrações CBM menores, nos casos em que se tem a base-livre como comparação.

5.12.3 Curva de morte dos microrganismos

Após a contagem das colônias foi possível observar que quando as porfirinas estão sobre irradiação de fonte luminosa, a morte microbiana ocorre em um tempo inferior para todos os isolados testados. Isto pode ser observado na Figura 12, onde pode-se evidenciar a morte das colônias de acordo com o tempo de irradiação. A curva de morte foi realizada também com os demais microrganismos que apresentaram sensibilidade aos compostos. Os resultados das curvas de morte durante o período de 60 minutos de irradiação mais expressivos foram evidenciados para os microrganismos *Streptococcus mutans* IC e o *Streptococcus oralis* IC como é mostrado na figura abaixo. As demais estão apresentadas no Anexo 8.8.

Figura 12: Curva de morte para os microrganismos *Streptococcus mutans* IC e o *Streptococcus oralis* IC, durante período de irradiação de 60 minutos.



As curvas de morte para os microrganismos não se mostraram de forma linear em relação ao tempo. Onde, na maioria dos casos, se mantiveram constante até aproximadamente 30 min.

Para a metaloporfirina MnCITNafPor o tempo de 60 min não se mostrou suficiente para a morte do microrganismo *Streptococcus oralis* IC. O mesmo aconteceu para CoCITNafPor para o *Streptococcus mutans* IC, bem como no caso do CuTNafPor para *Streptococcus salivarius* IC. O tempo de morte para a *Candida albicans*, tanto para TNafPor quanto para CuTNafPor foi de 30 min, sendo os menores tempos observados em relação aos demais estudos.

Considerações Finais

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As metodologias sintéticas propostas para a obtenção das porfirinas *meso*-tetra(1-naftil)porfirina (TNafPor), *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]zinco(II) (ZnTNafPor), *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]cobre(II) (CuTNafPor), *meso*-tetra[(1-naftil)porfirinato]níquel(II) (NiTNafPor), *meso*-tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}cobalto(III) (CoCITNafPor), *meso*-tetra{[(1-naftil)porfirinato]cloro}mangânês(III) (MnCITNafPor), mostraram-se válidas.

Os compostos foram devidamente caracterizados: por análise elementar (CHN%), espectroscopia eletrônica nas regiões do UV-vis e do infravermelho, propriedades redox, além de suas propriedades fotofísicas como rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico de geração de oxigênio singleto e fotoestabilidade.

As seis porfirinas estudadas mostraram diferente intensidade de ligação ao interagir com o ct-DNA. Os valores de constantes seguiram a ordem crescente de valores de K_b (constante intrínsecas de ligação, calculada a partir de dados espectroscópicos na região do UV-vis): CoCITNafPor < MnCITNafPor < NiTNafPor < CuTNafPor < ZnTNafPor < TNafPor, mostrando que a porfirina de base-livre apresenta o maior valor de constante de ligação. Provavelmente as interações se deram de maneira não-intercalativa (fora do sulco), pode-se evidenciar através do *docking* molecular. Este resultado pode ser melhor entendido pela estereoquímica e conformação das porfirinas, ligante cloreto axial coordenado no caso dos derivados de Co^{III} e Mn^{III}. Os resultados de interação molecular sugeriram as interações de van der Waals como as principais forças de ligação para a ligação entre cada metaloporfirina e os resíduos de nucleobases do DNA, enquanto que as forças hidrofóbicas também foram sugeridas para o caso TNafPor e DNA. Somando-se a isso, todas as porfirinas estudadas neste trabalho apresentaram baixos valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singleto e fotoestabilidade razoável, podendo serem atribuídos à presença do metal no anel porfirínico.

Estudos de interações das porfirinas frente a microrganismos foram desenvolvidos. Onde, de quinze exemplos de microrganismos, contendo bactérias e fungos, houve atividade frente a quatro: *Candida albicans* ATCC 14053, *Streptococcus salivarius* IC, *Streptococcus oralis* IC e *Streptococcus mutans* IC. Entretanto, a NiTNafPor não demonstrou atividade contra nenhum dos exemplares testados.

Perspectivas Futuras

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

De modo a dar continuidade aos estudos, como perspectiva futura, estão as sínteses de novas metaloporfirinas, não somente com metais da primeira série de transição, mas também com metais nobres, como paládio(II), platina(II) e prata(II).

Como outro seguimento do trabalho, pode-se destacar o estudo de interação com a proteína BSA (albumina do soro bovino) e HSA (albumina humana), por exemplo, para obtenção de valores de constantes de ligação e parâmetros termodinâmicos.

Anexos

8. ANEXOS

8.1 Espectros de massas

Figura Anexo 1: Espectro HRMS-ESI obtido para TNafPor.

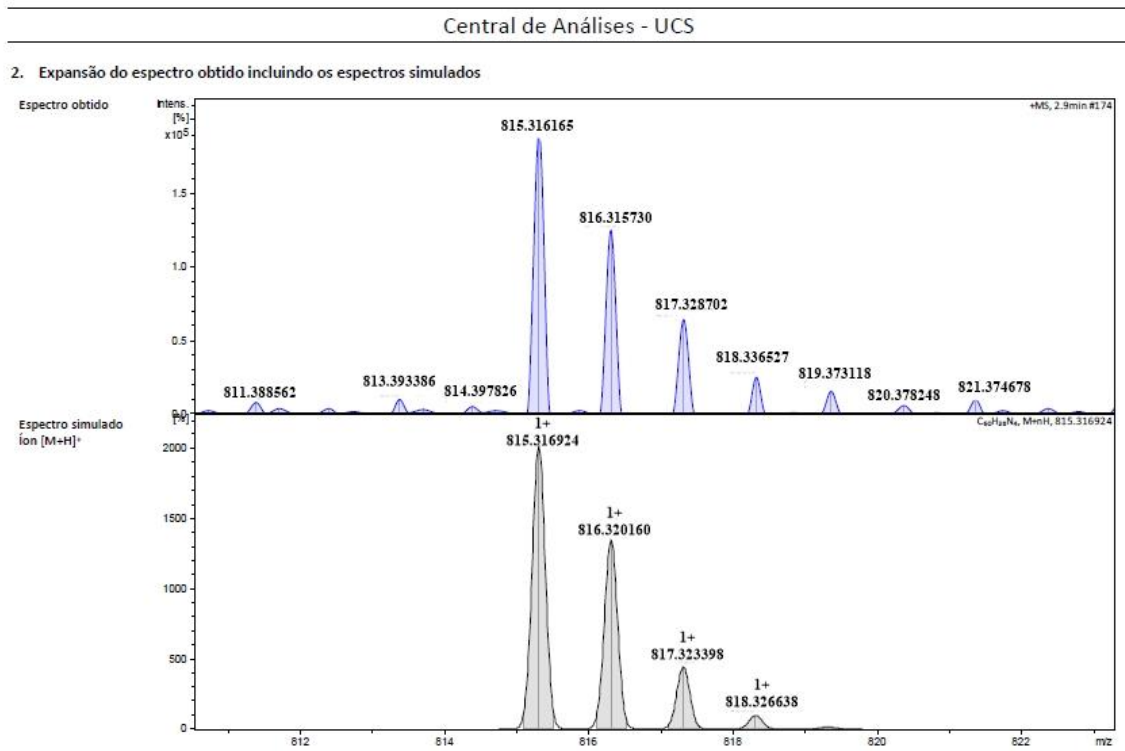


Figura Anexo 2: Espectro HRMS-ESI obtido para ZnTNafPor.

Central de Análises - UCS

2. Expansão do espectro obtido incluindo os espectros simulados

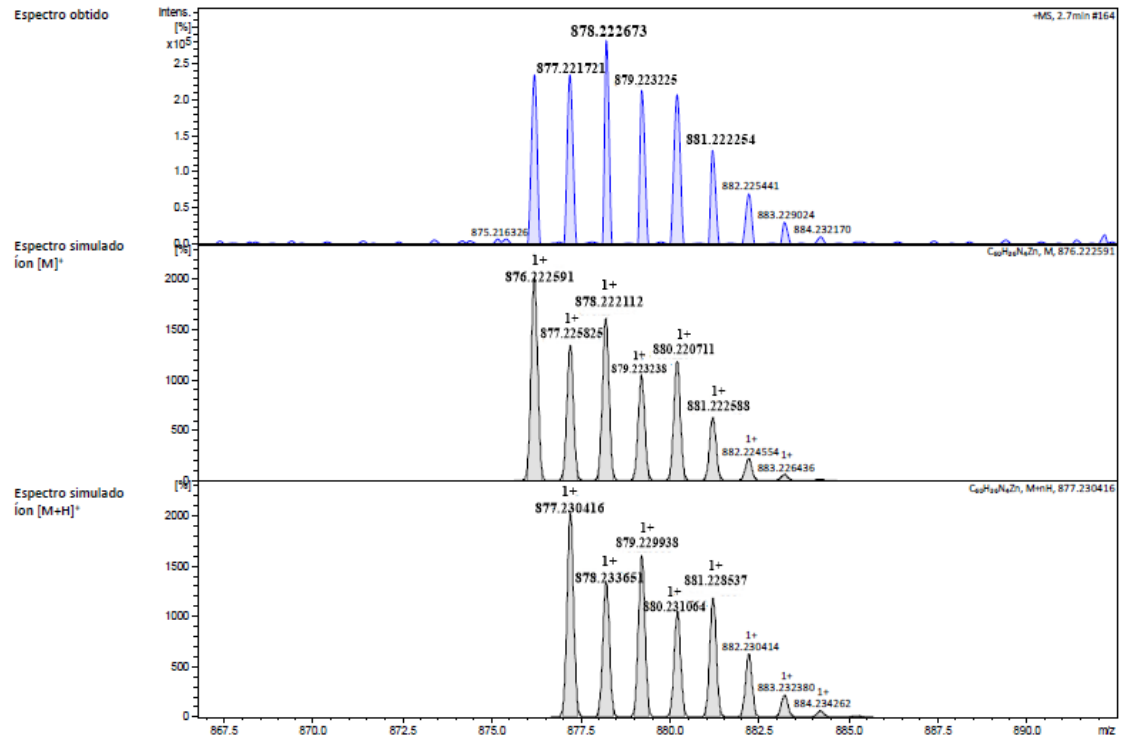


Figura Anexo 3: Espectro HRMS-ESI obtido para CuTNafPor

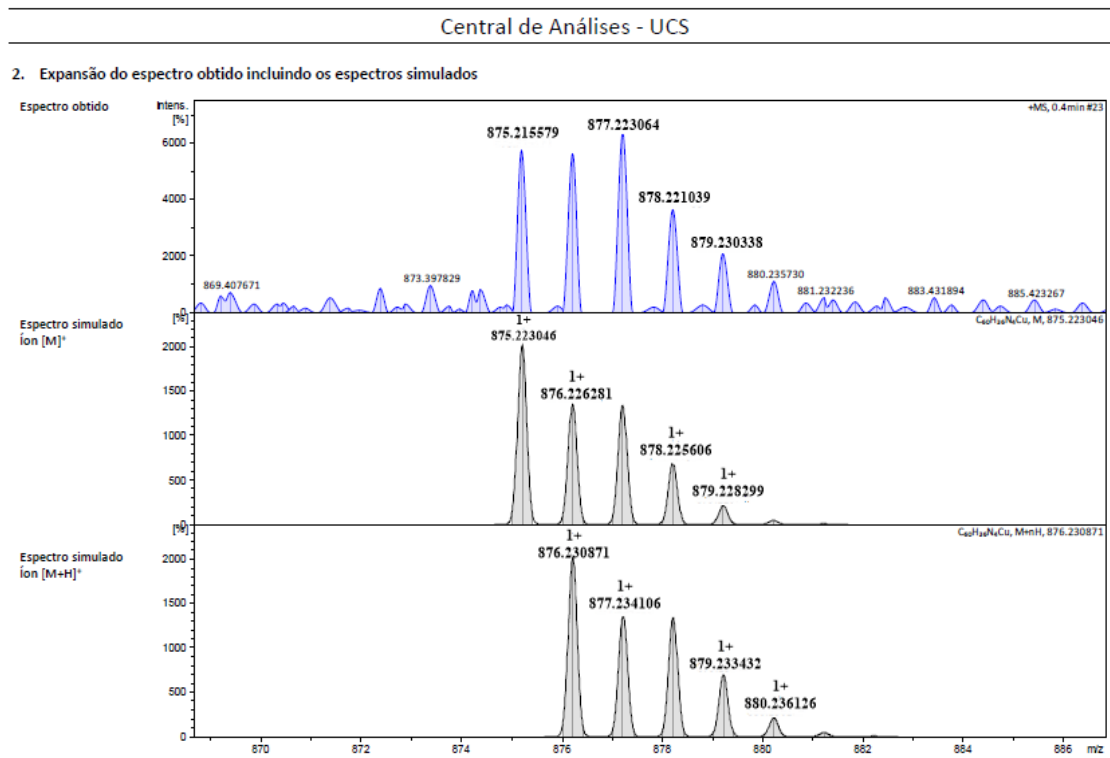


Figura Anexo 4: Espectro HRMS-ESI obtido para NiTNafPor.

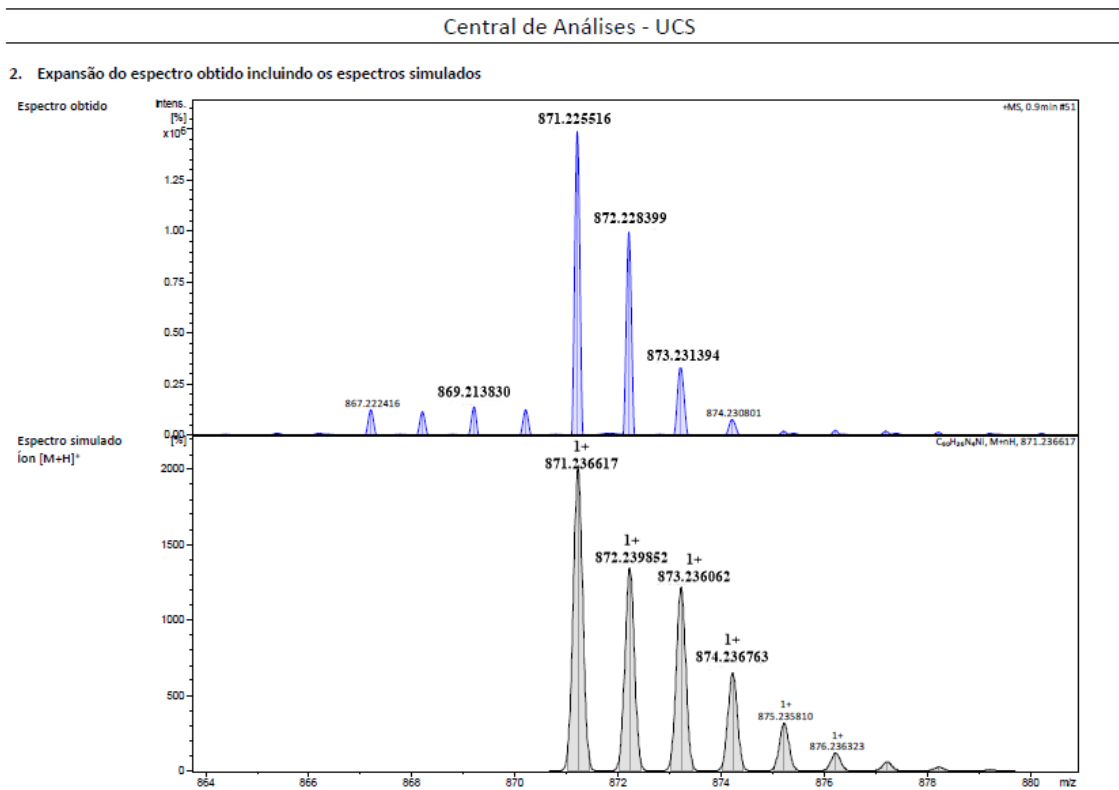


Figura Anexo 5: Espectro HRMS-ESI obtido para CoCITNafPor.

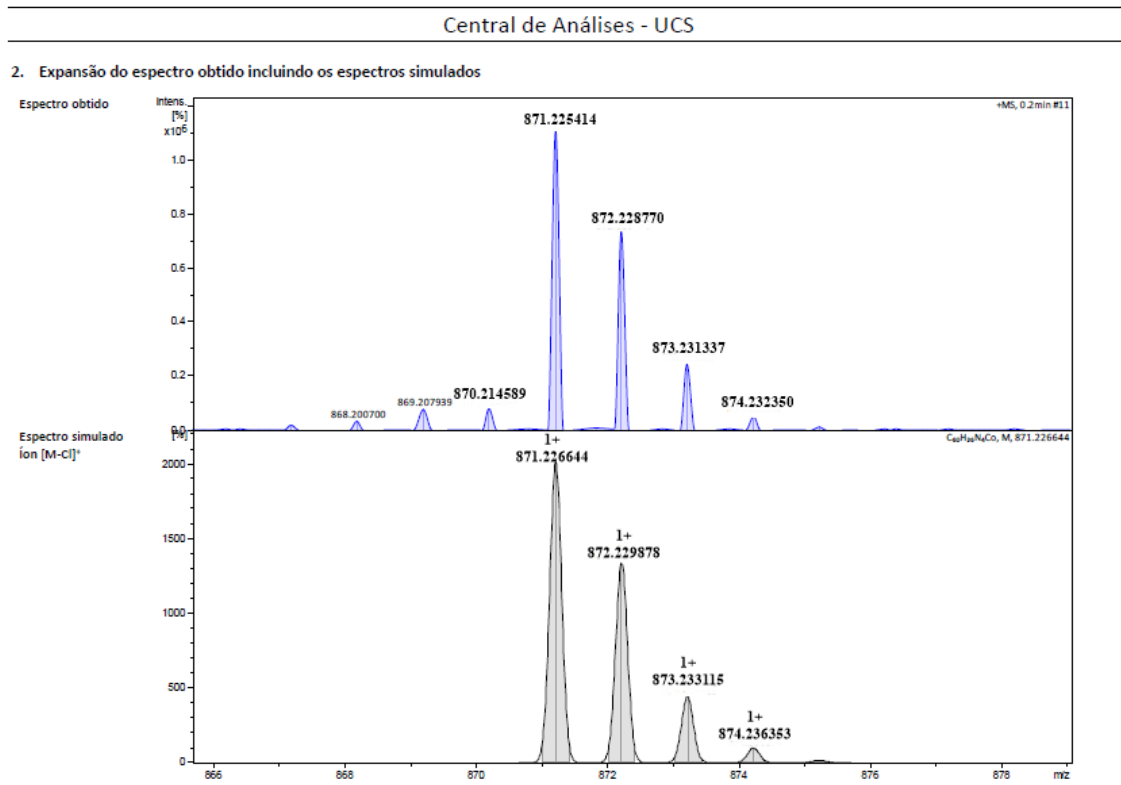
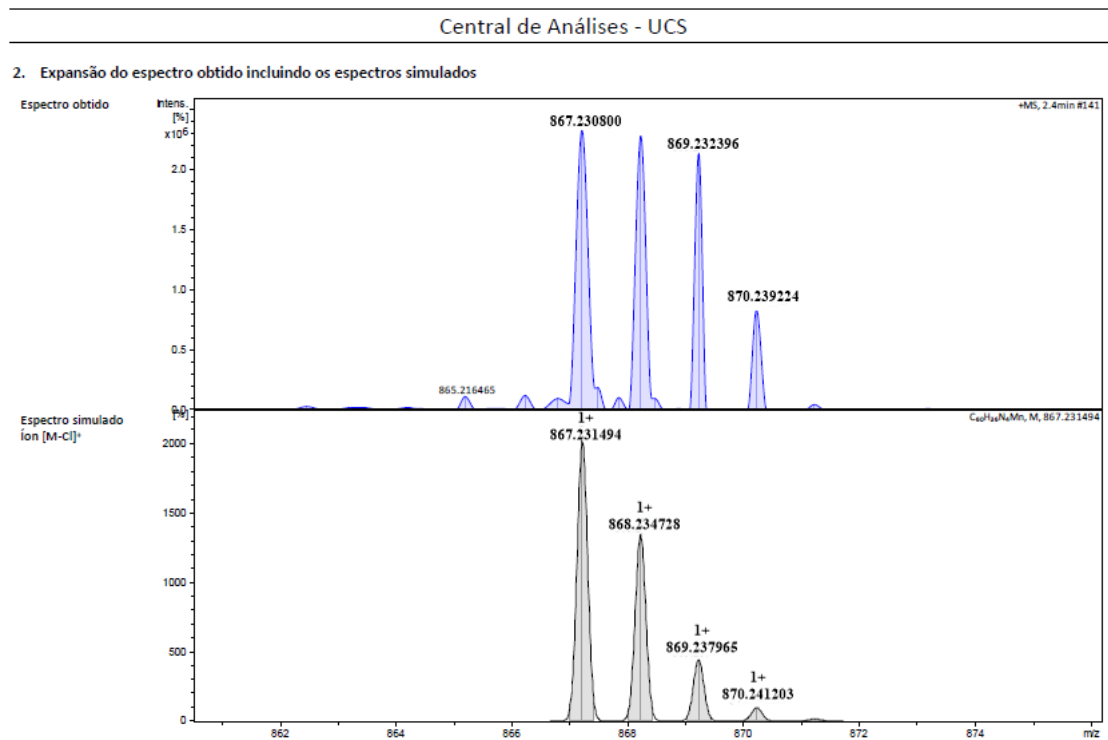


Figura Anexo 6: Espectro HRMS-ESI obtido para MnCITNafPor.



8.2 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Figura Anexo 7: Espectro de ^1H RMN (400 MHz) da TNafPor, em CDCl_3 . * e ** = picos residuais.

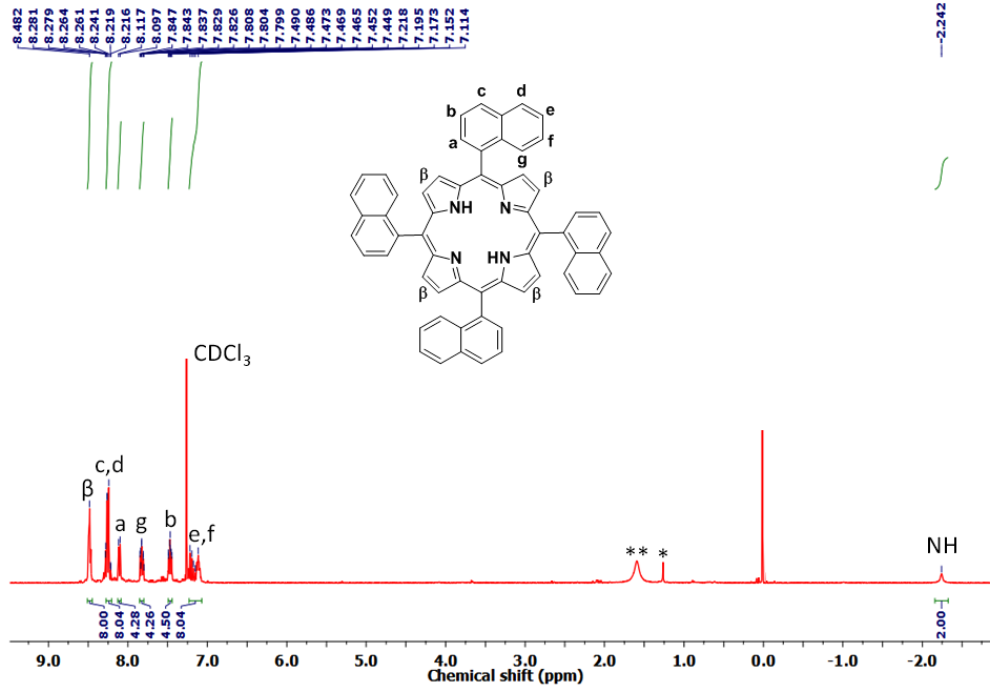
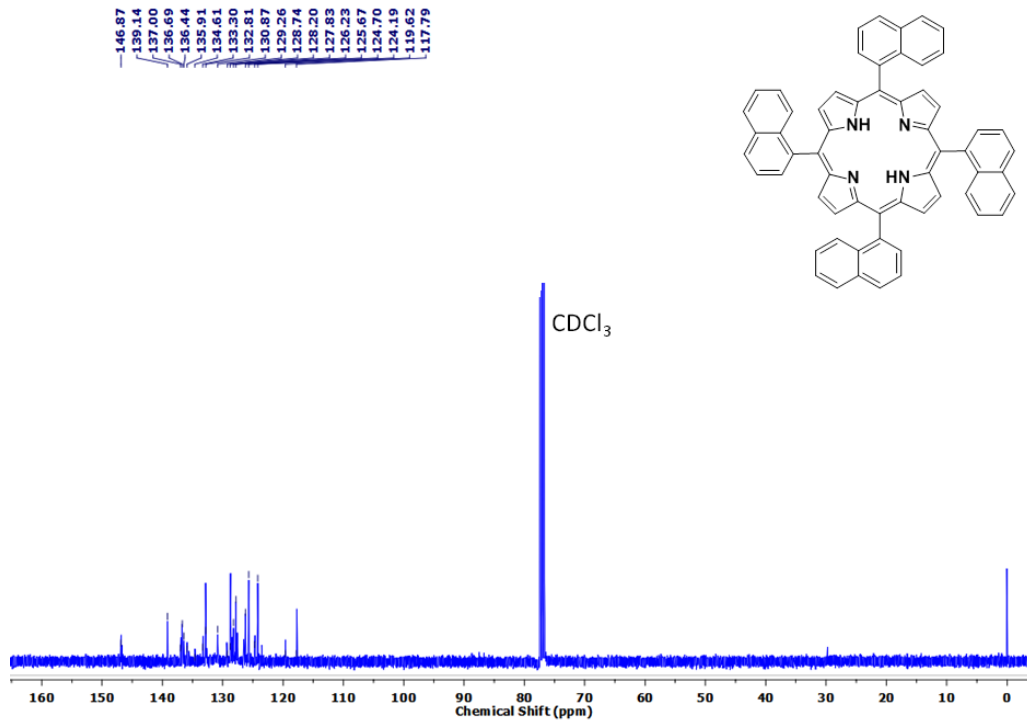


Figura Anexo 8: Espectro de ^{13}C RMN (100 MHz) da TNafPor, em CDCl_3 .



8.3 Espectros na região do Infravermelho

Figura Anexo 9: Espectro de infravermelho da TNafPor em pastilha de KBr.

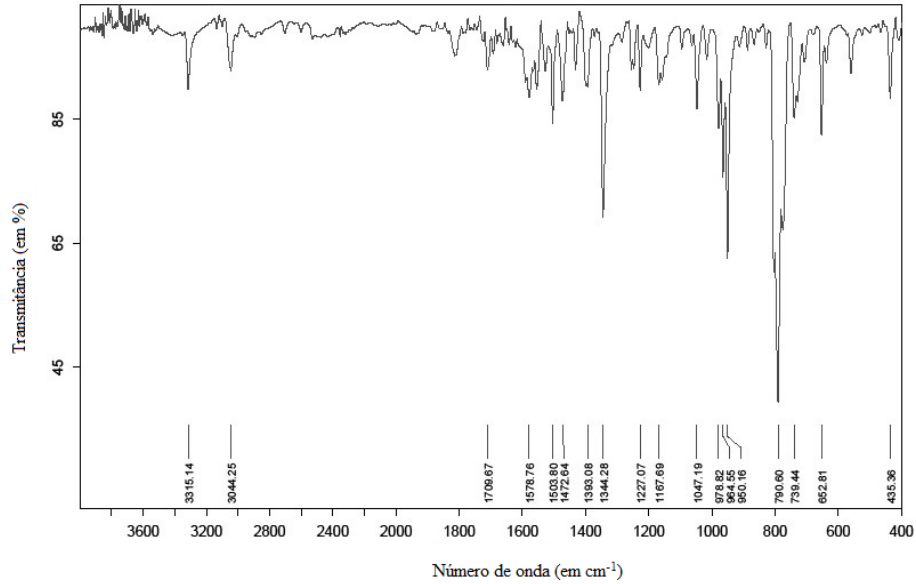


Figura Anexo 10: Espectro de infravermelho da ZnTNafPor em pastilha de KBr.

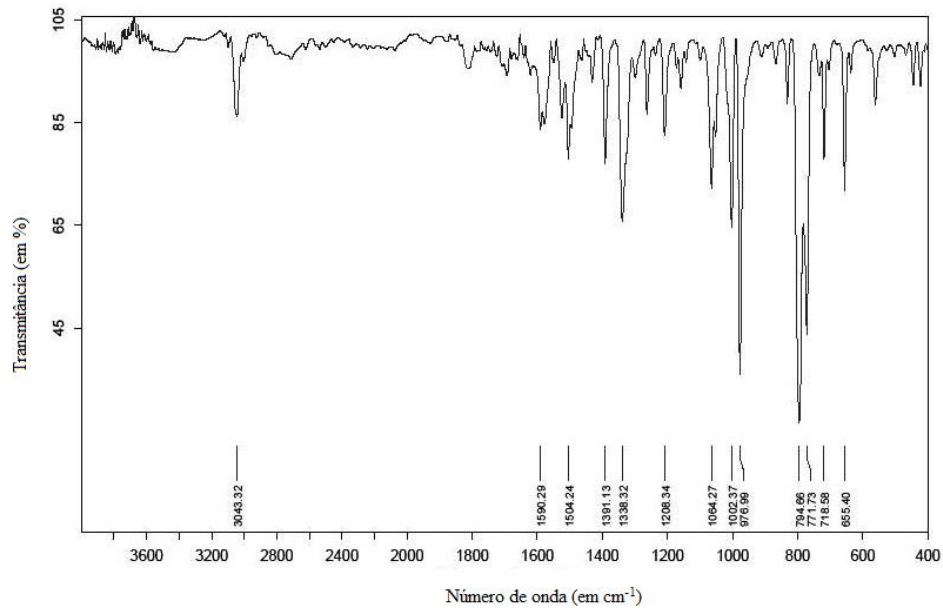


Figura Anexo 11: Espectro de infravermelho da CuTNafPor em pastilha de KBr.

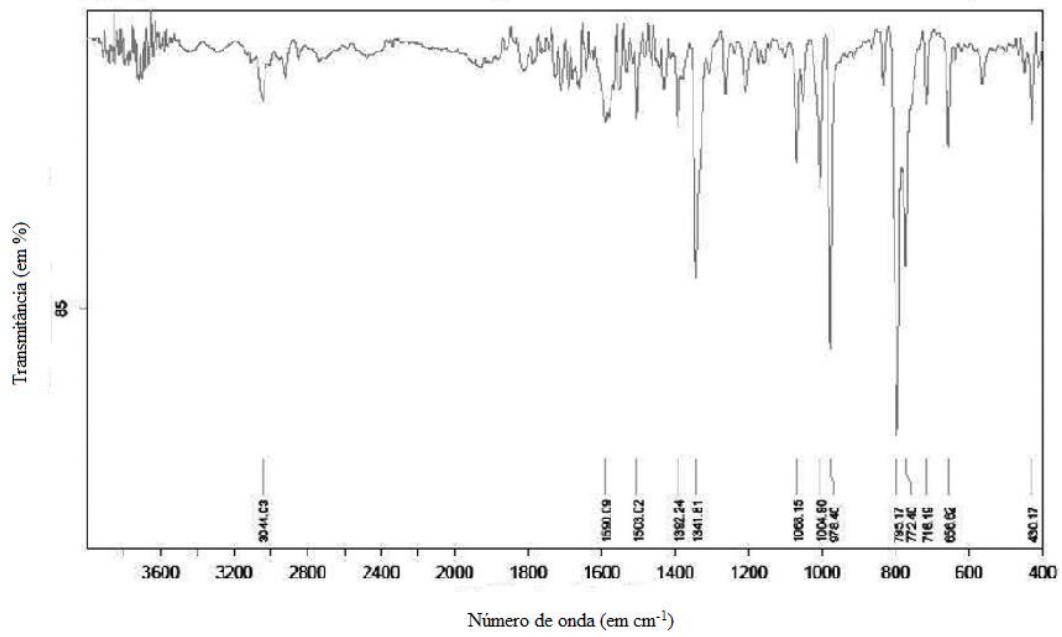


Figura Anexo 12: Espectro de infravermelho da NiTNafPor em pastilha de KBr.

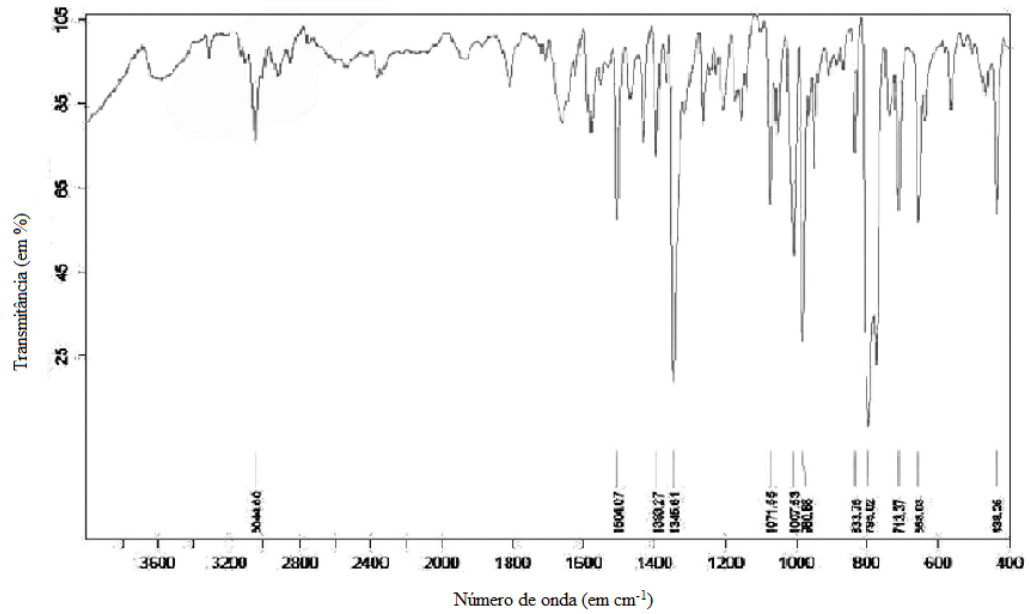


Figura Anexo 13: Espectro de infravermelho da CoCITNafPor em pastilha de KBr.

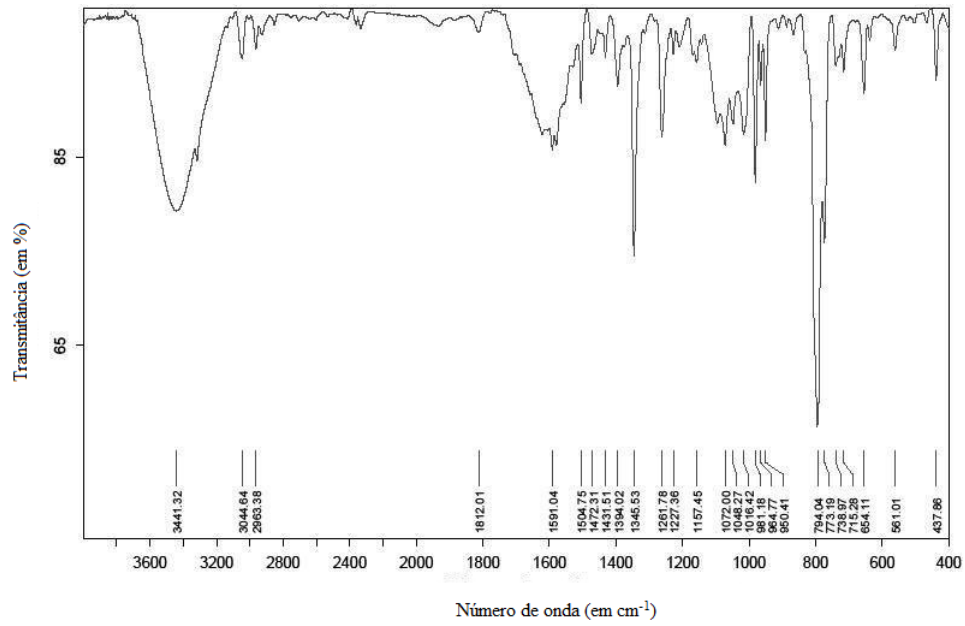
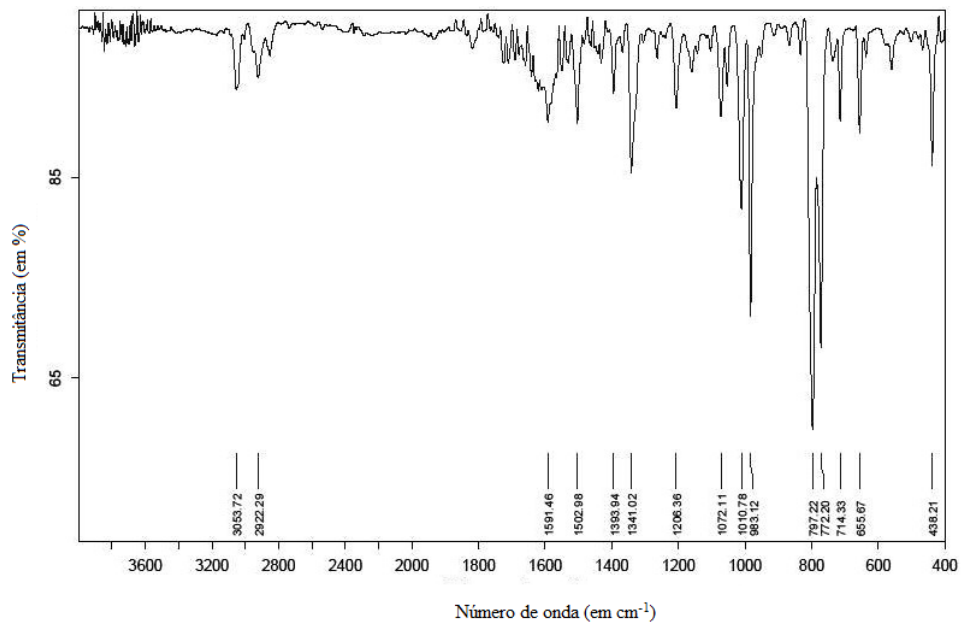


Figura Anexo 14: Espectro de infravermelho da MnCITNafPor em pastilha de KBr.



8.4 Espectros teóricos para a região do UV-vis

Figura Anexo 15: Espectro teórico para o composto TNafPor.

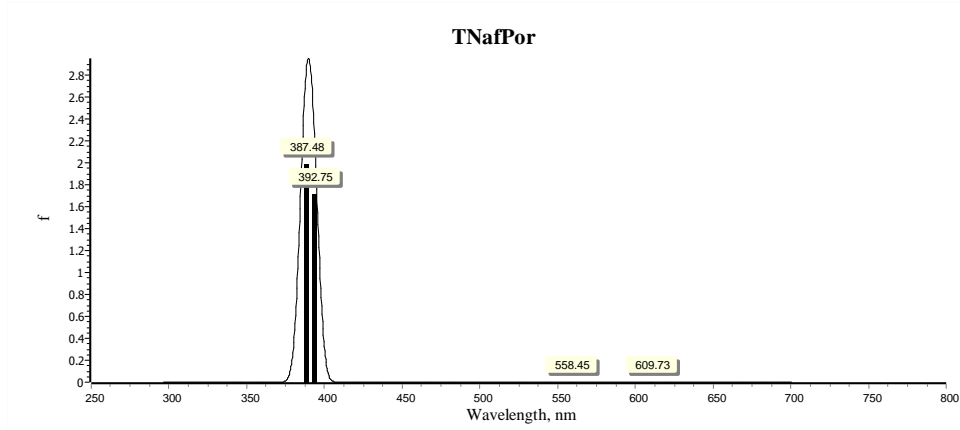


Figura Anexo 16: Espectro teórico para o composto ZnTNafPor.

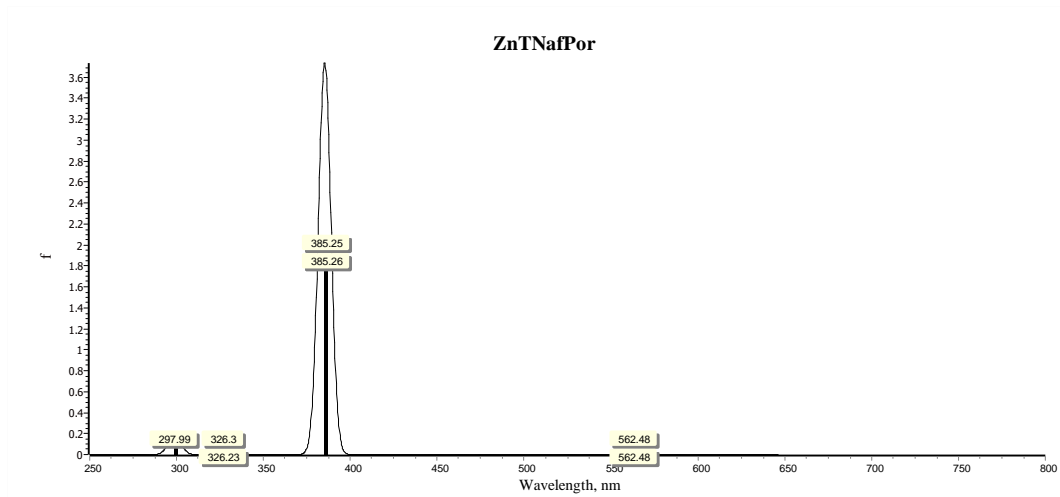


Figura Anexo 17: Espectro teórico para o composto CuTNafPor.

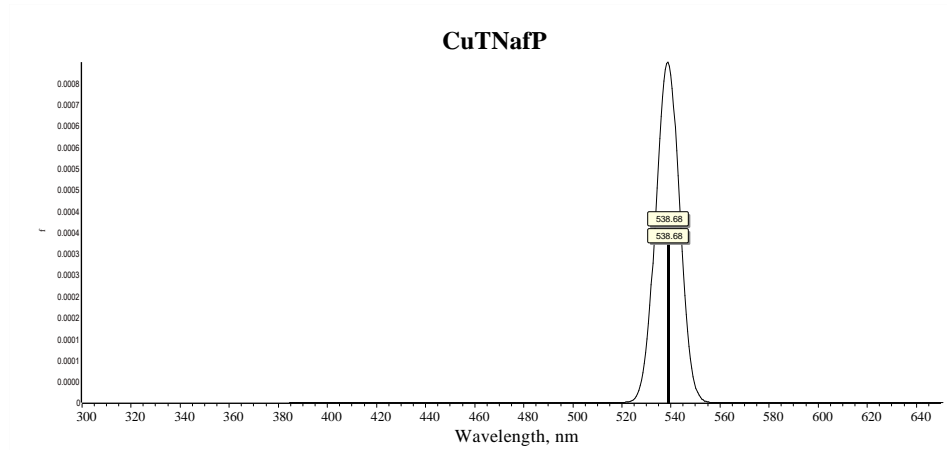


Figura Anexo 18: Espectro teórico para o composto NiTNafPor.

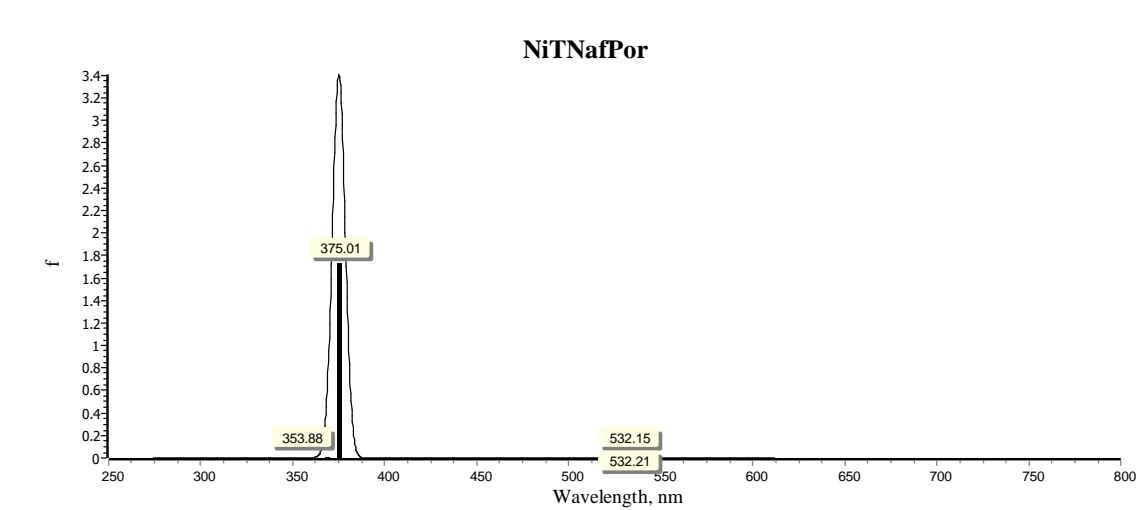


Figura Anexo 19: Espectro teórico para o composto CoCITNafPor.

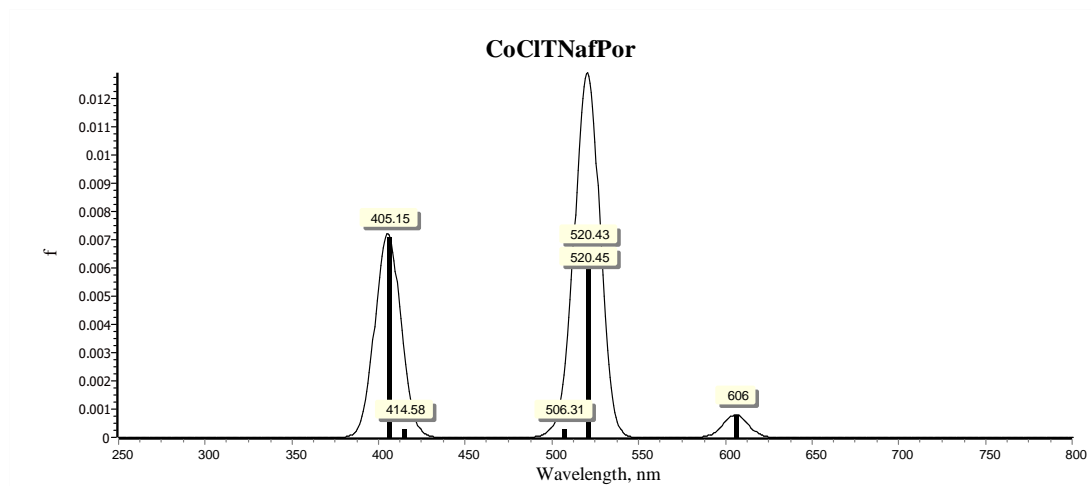
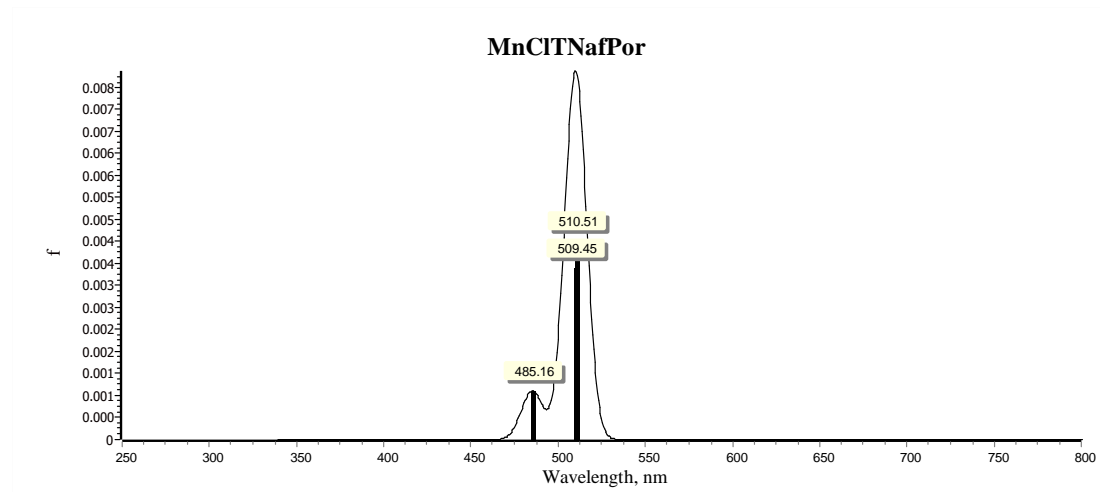


Figura Anexo 20: Espectro teórico para o composto MnCITNafPor.



8.5 Espectros de absorção na região do UV-vis para estudos de agregação

Figura Anexo 21: Estudo de agregação para TNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorbância em 423 nm em função da concentração.

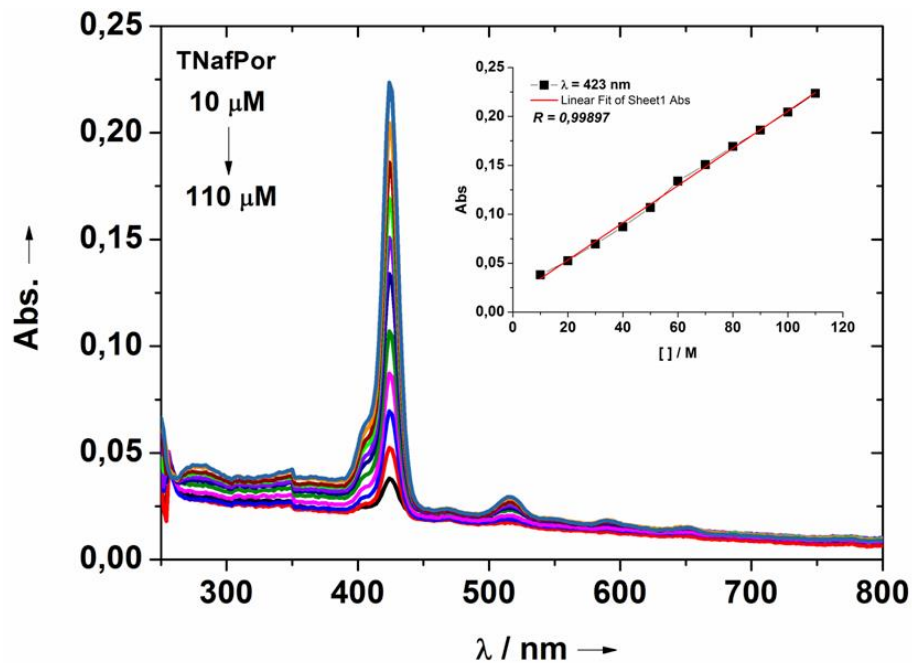


Figura Anexo 22: Estudo de agregação para ZnTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorvância em 432 nm em função da concentração.

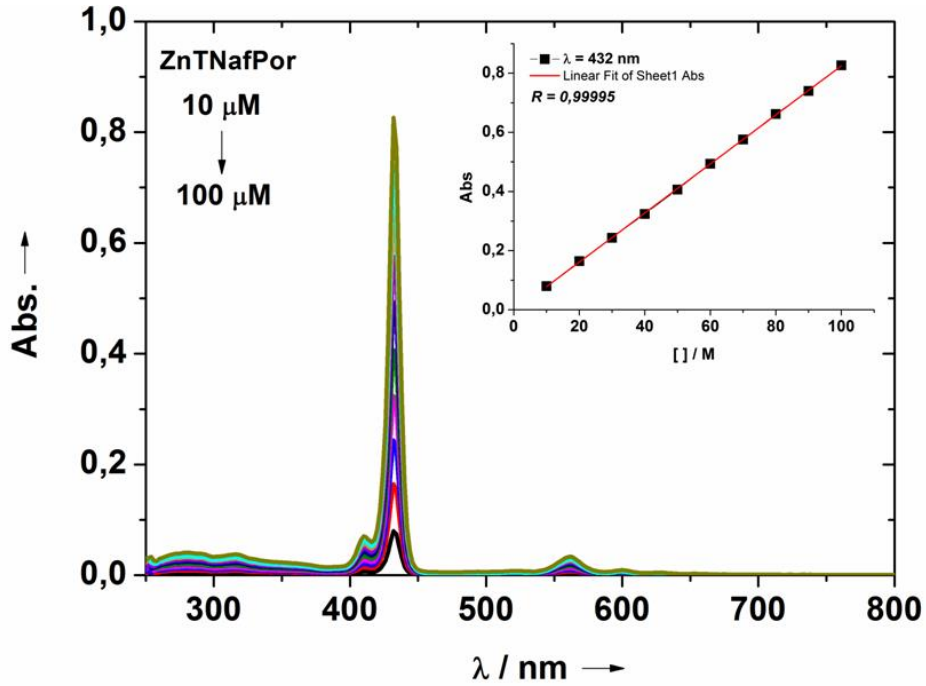


Figura Anexo 23: Estudo de agregação para CuTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorvância em 424 nm em função da concentração.

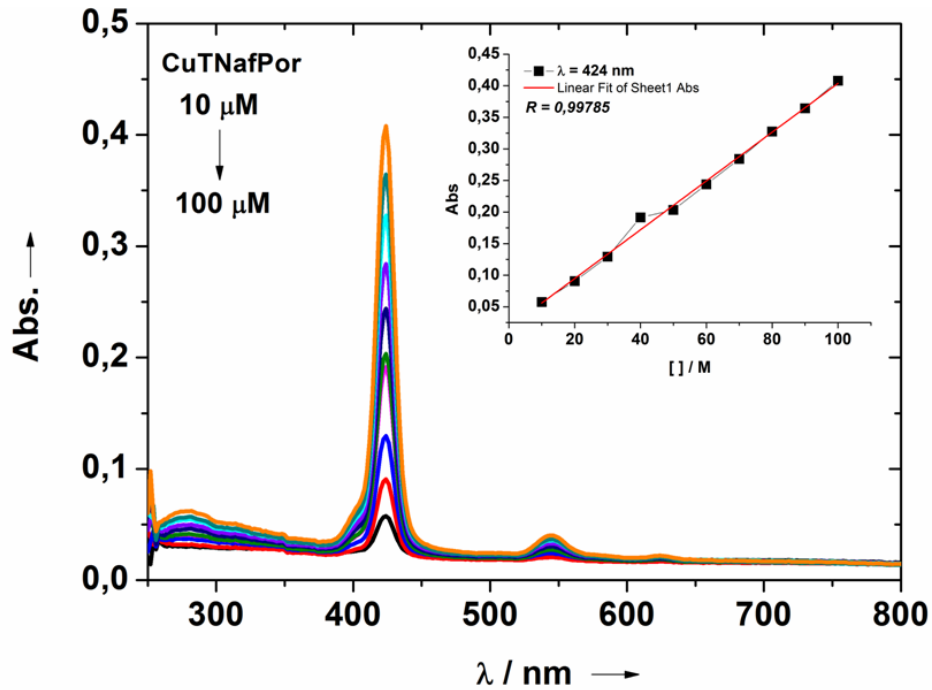


Figura Anexo 24: Estudo de agregação para NiTNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorvância em 420 nm em função da concentração.

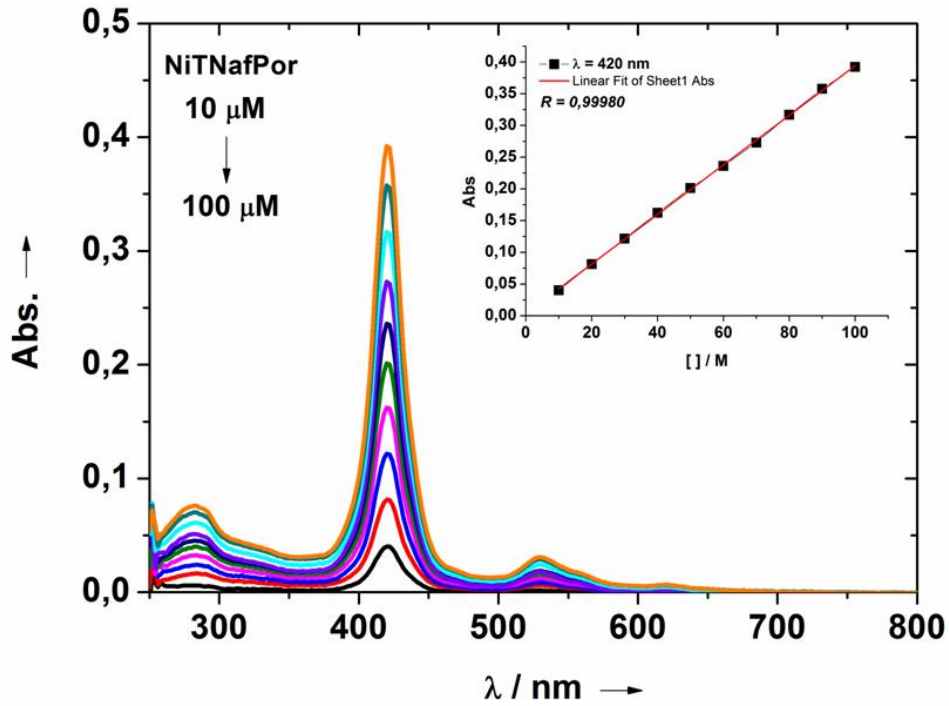
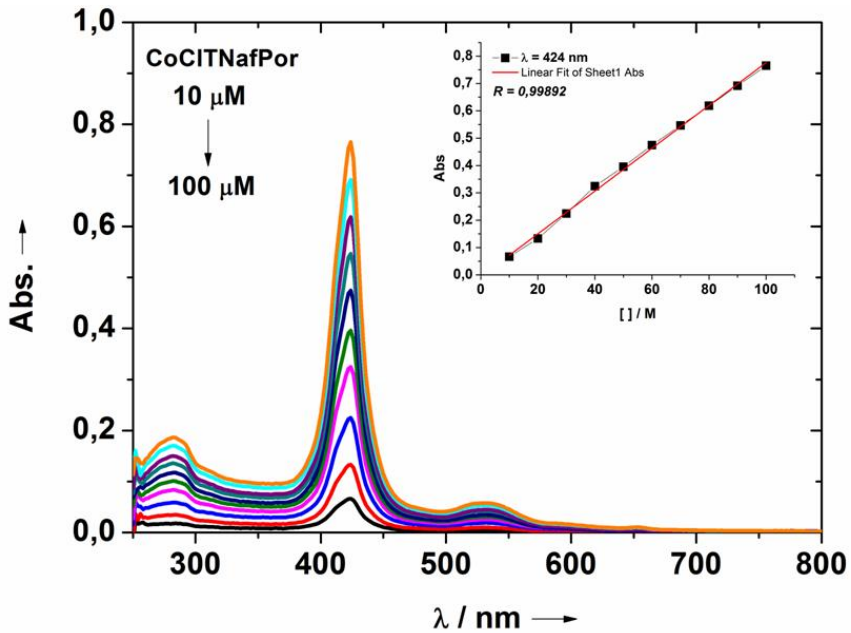


Figura Anexo 25: Estudo de agregação para CoCITNafPor, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. A inserção mostra o comportamento linear da absorvância em 424 nm em função da concentração.



8.6 Espectros de absorção UV-vis de estudos de interação com DNA

Figura Anexo 26: Espectros de absorção UV-vis de ZnTNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μM . A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.

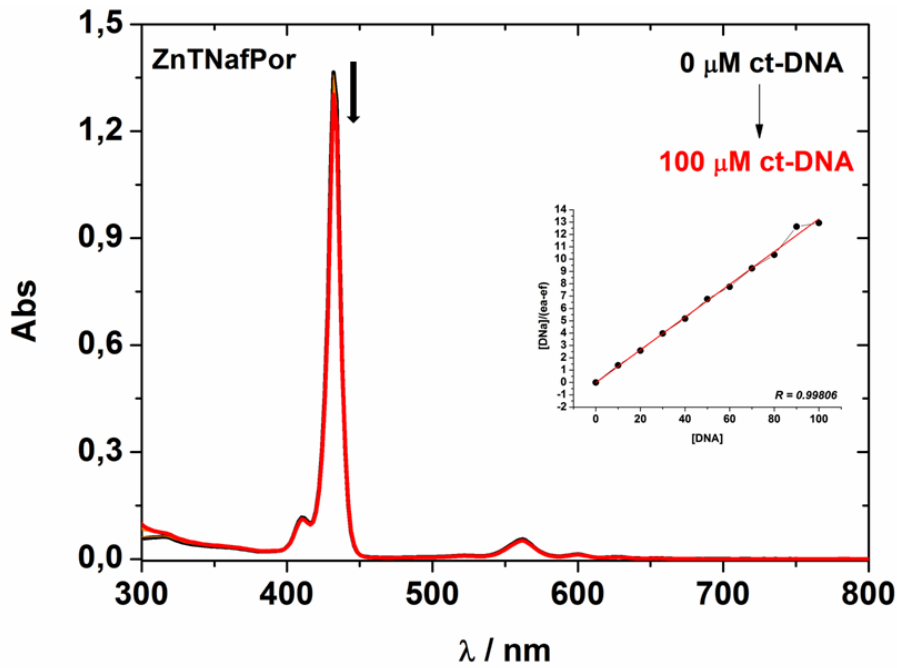


Figura Anexo 27: Espectros de absorção UV-vis de NiTNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μM . A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.

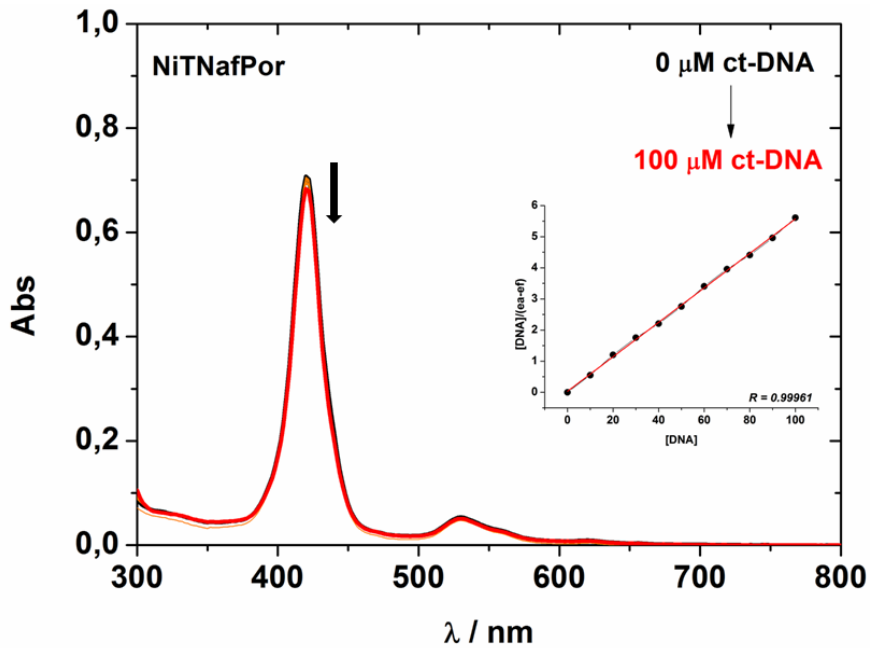


Figura Anexo 28: Espectros de absorção UV-vis de CoCITNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μM . A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.

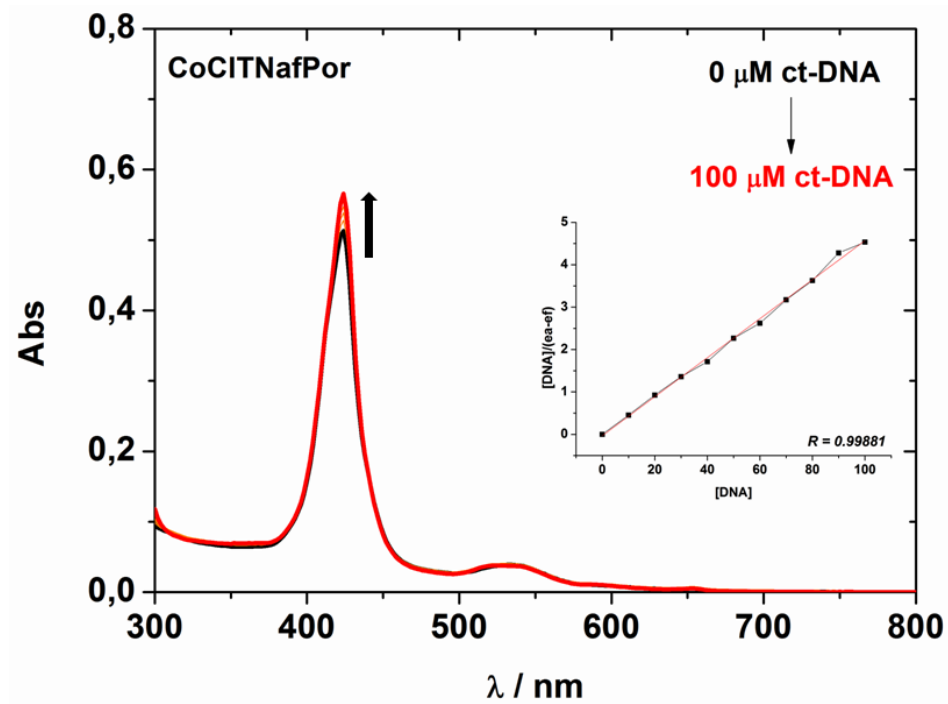
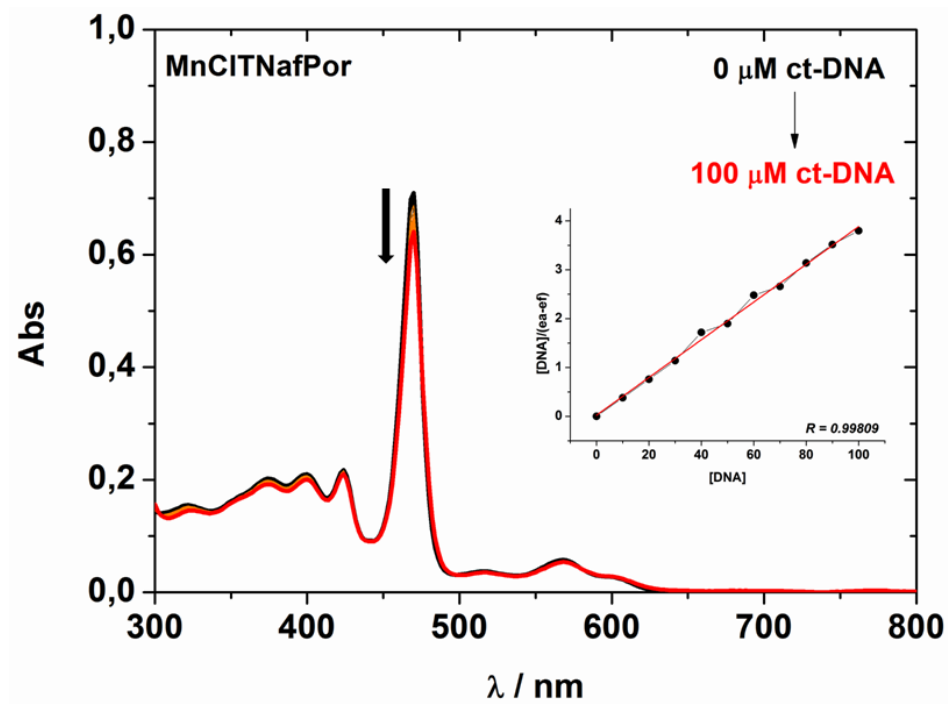


Figura Anexo 29: Espectros de absorção UV-vis de MnCITNafPor em tampão DMSO/Tris-HCl (pH 7,4). A concentração de ct-DNA variou de 0 a 100 μM . A seta indica que a absorbância muda com o aumento das concentrações das amostras.



8.7 Espectros de emissão de estudos de interação com DNA

Figura Anexo 30: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de TNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra

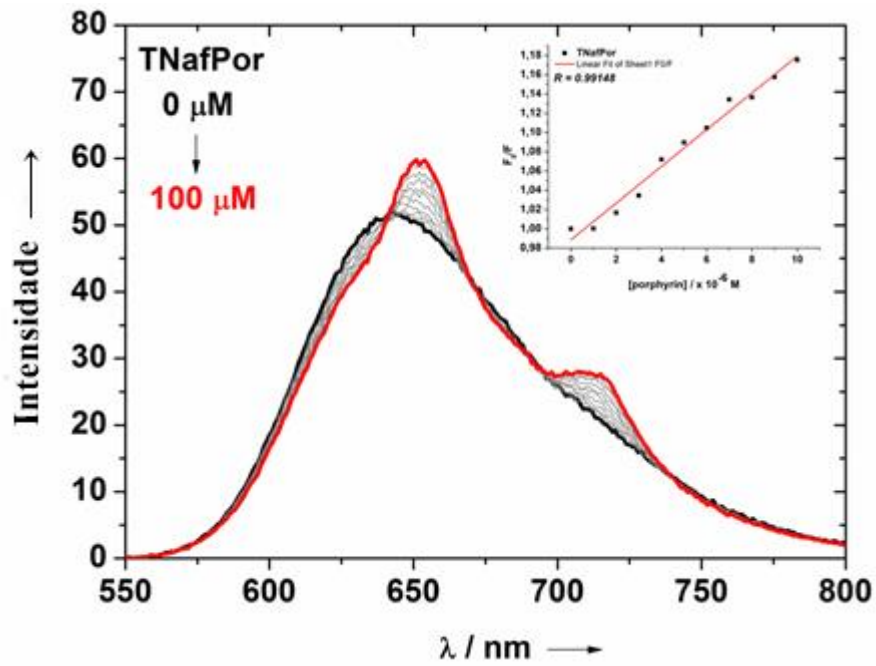


Figura Anexo 31: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de ZnTNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra

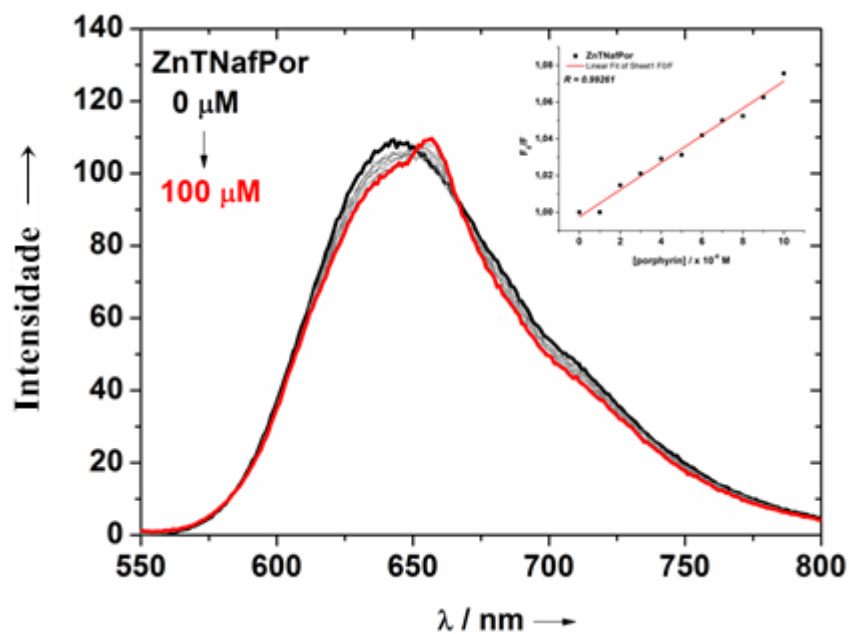


Figura Anexo 32: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de NiTNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.

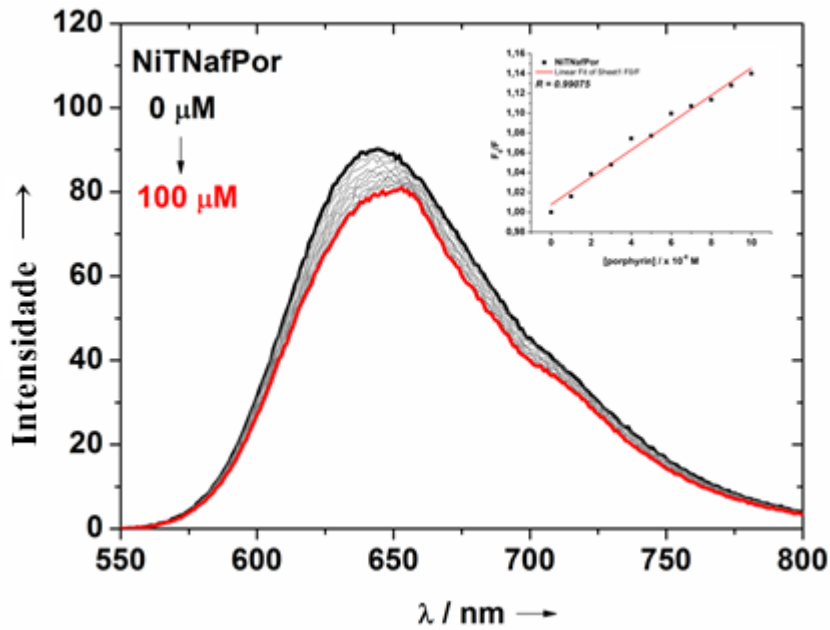
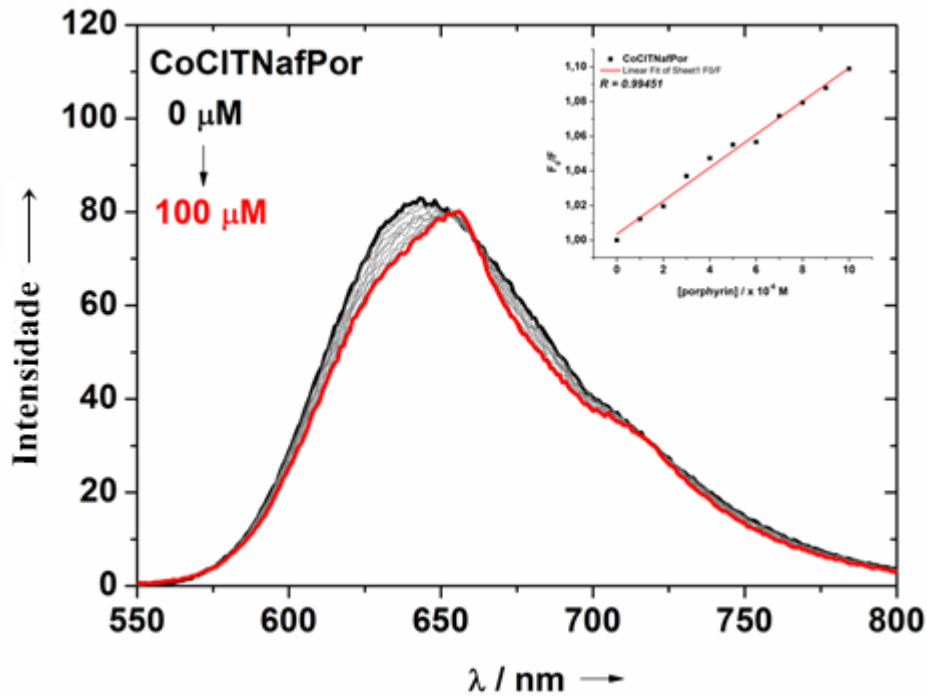


Figura Anexo 33: Espectro de emissão EB ligado a ct-DNA na presença de CoCITNafPor numa mistura de tampão DMSO/Tris-HCl a $\lambda_{exc} = 510$ nm. A seta indica as alterações na fluorescência em concentrações crescente de amostra.



8.8 Curva de morte dos microrganismos

Figura Anexo 34: Curva de morte para o microrganismo *Candida albicans*, durante período de irradiação de 60 minutos

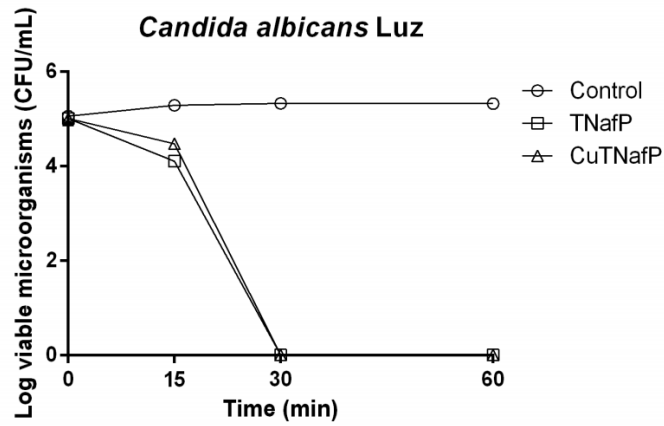
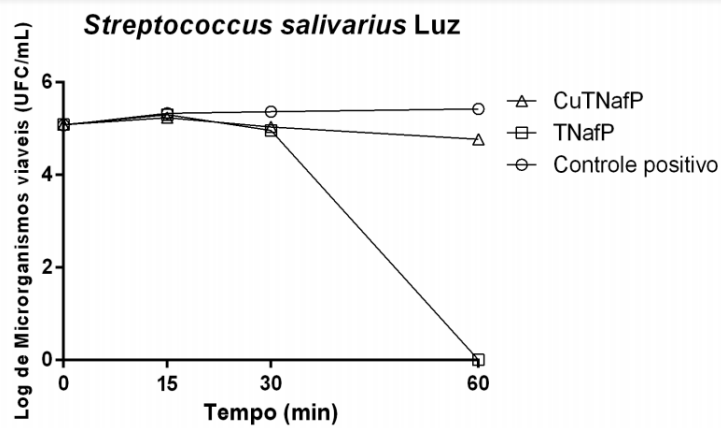
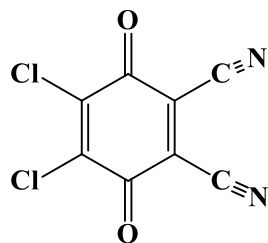


Figura Anexo 35: Curva de morte para o microrganismo *Streptococcus salivarius*, durante período de irradiação de 60 minutos.



8.9 Estruturas

Figura Anexo 36: Estrutura da 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).



2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

Figura Anexo 37: Representação estrutural do Photofrin®.

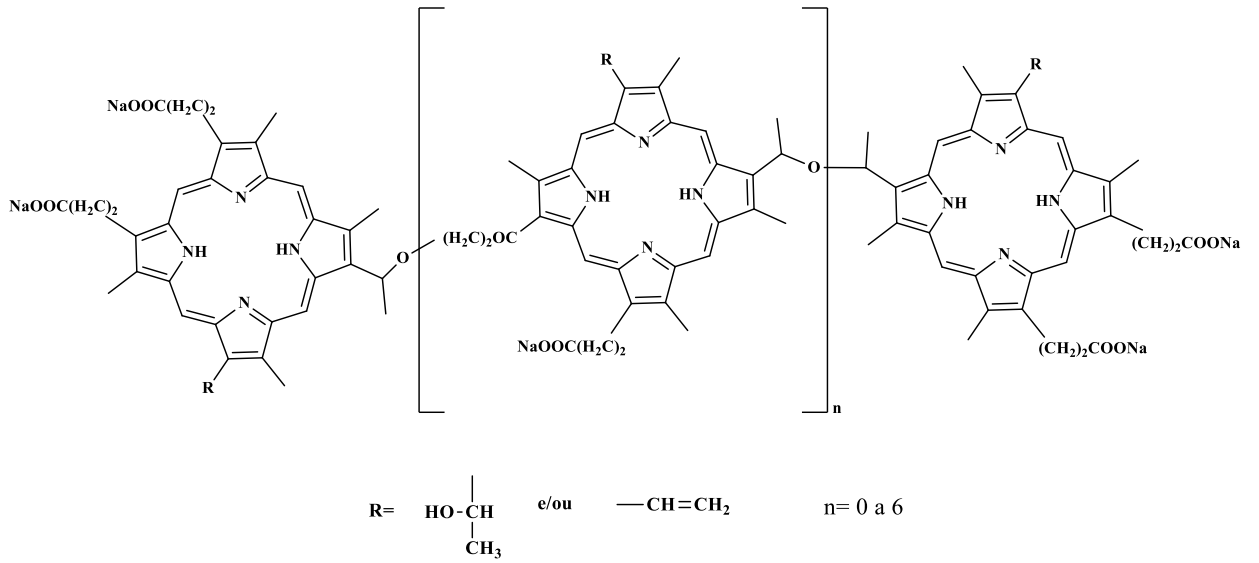
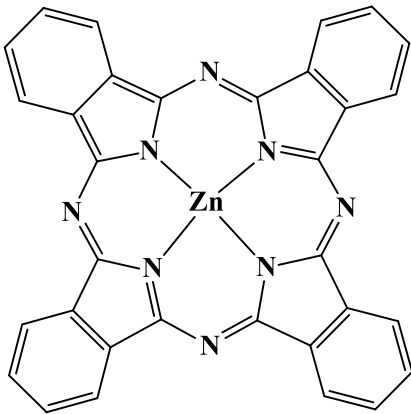


Figura Anexo 38: Estrutura da ftalocianina de zinco.



Referências

9. REFERÊNCIAS

- 1- L. R. Milgrom. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, 1, 1997, 249.
- 2- H. Toma. *Química Bioinorgânica e Ambiental*, 1, 2015, 270.
- 3- P. Rothemund. *Journal of the American Chemical Society*, 57, 1935, 2010.
- 4- J. S. Lindsey, I. C. Schreiman, H.C. Hsu. *Tetrahedron Letters*, 27, 1986, 4969.
- 5- A. D. Adler, F. R. Longo, W. Shergalis. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 1964, 3145.
- 6- A.M.d.R. Gonsalves, M.M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.*, 22, 1985, 931.
- 7- A.M.d.R. Gonsalves, J.M.T.B. Varejão, M.M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.*, 28, 1991, 635.
- 8- A. Satake, Y. Kobuke. *Tetrahedron*, 61, 2005, 13.
- 9- I. J. Macdonald, Y. J. Dougherty. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 2001, 105.
- 10- R. Song, Y. Kim, C. O. Lee, Y. S. Sohn. *Tetrahedron Letters*, 44, 2003, 1537.
- 11- G. Pratviel, *Coord. Chem. Rev.*, 308, 2016, 460.
- 12- N.S. Lebedeva, E.S. Yurina, Y.A. Gubarev, A.V. Lyubimtsev, S.A. Syrbu, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 353, 2018, 299.
- 13- Y. F. Huo, L.-N. Zhu, K.-K. Liu, L.-N. Zhang, R. Zhang, D.-M. Kong, *Inorg. Chem.*, 56, 2017, 6330.
- 14- D. H. Tjahjono, S. Mima, T. Akutsu, N. Yoshioka, H. Inoue, *J. Inorg. Biochem.*, 85, 2001, 219.
- 15- O. A. Kovaleva, V.B. Tsvetkov, O.K. Mamaeva, V.A. Ol'shevskaya, A.V. Makarenkov, L.G. Dezhenkova, A.S. Semeikin, O.F. Borisova, A.A. Shtil, A.K. Shchyolkina, D.N. Kaluzhny, *Eur. Biophys. J.* 43, 2014, 545.
- 16- Y. Wang, H. Sauriat-Dorizon, H. Korri-Youssoufi, *Sens. Actuators B Chem.*, 251, 2017, 40.
- 17- J.J. Van Hemmen, W.J.A. Meuling, J.F. Bleichrodt, *Radiat. Res.*, 75, 1978, 410.
- 18- M.A. Sari, J.P. Battioni, D. Dupre, D. Mansuy, J.B. *Le Pecq, Biochemistry*, 29, 1990, 4205.
- 19- V. Calvillo-Páez, R.R. Sotelo-Mundo, M. Leyva-Peralta, J.C. Gálvez-Ruiz, D. Corona-Martínez, R. Moreno-Corral, R. Escobar-Picos, H. Höpfl, O. Juárez-Sánchez, K.O. Lara, *Chem.-Biol. Interact.*, 286, 2018, 34.
- 20- A. D'Urso, M.E. Fragalà, R. Purrello, *Non-Covalent Interactions of Porphyrinoids with Duplex DNA*. Springer, Berlin, 2013.
- 21- F. I., Simplicio, F., Maionchi, N., Hioka, *Química Nova*, 2002, 25, 801.

- 22- D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain. *Nature*, 3, 2003, 380.
- 23- A. E. H Machado. *Química Nova*, 23, 2000, 237.
- 24- G. Jori. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 36, 1996, 87.
- 25- M. R. Hamblin, T. Hasan. *Photochemical and Photobiological Science*, 2004, 3, 436.
- 26- J. R. Perussi. *Química Nova*, 30, 2007, 988.
- 27- M. B. Smith, J. March. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. 6 ed, 2007, 2357.
- 28- D. Intriери. *Synthesis, Characterization and Catalytic activity of Iron, Ruthenium and Cobalt Porphyrin Complexes*, Tese (Doutorado em Química), 2013, 193.
- 29- B. A. Iglesias. *Síntese e Propriedades Espectroscópicas e Eletroquímicas de uma Triazeno-Porfirina*, Tese (Doutorado em Química), 2012, 234.
- 30- A. D. Adler, F. R. Longo, F. Kampas, J. Kim. On the preparation of metalloporphyrins, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 32, 1970, 2443.
- 31- M. Ochsner. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39, 1997, 1-18.
- 32- O. Raab. *Zeitung Biology*, 39, 1900, 524.
- 33- F. Meyer-betz. *Dtsch Arch Klin*, 1913, 112, 476.
- 34- T. Dougherty. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, 90, 889.
- 35- L. M. Baltazar, A. Ray, D. A. Santos, P. S. Cisalpino, A. J. Friedman, J. D. Nosanchuk. *Frontiers of Microbiology*, 2015, 6, 1.
- 36- R. Bonnet. G. Martínez. *Tetrahedron*, 2001, 57, 9513.
- 37- E. Reddi, M. Cecon, G. Valduga, G. Jori, J. C. Bommer, F. Elisei, L. Latterini, U. Muzzucato. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 75, 462.
- 38- S. Schastak, S. Zinganshyna, B. Gitter, P. Wiedemann, T. Claudepierre. *PLoS ONE*, 2010, 5, 1.
- 39- Y. Liu, R. Qin, S. A. J. Saat, E. Breukink, M. Heger. *Journal of Clinical and Translational Research*, 2015, 1, 140.
- 40- J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, 1953, 171, 737.
- 41- D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger, *Princípios de bioquímica*. 6, 2014. 1120.
- 42- J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. *Bioquímica*. 6, 2008. 1059.
- 43- I. Turel, J. Kljun. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011, 11, 2661.
- 44- F. R. Keene, J. A. Smith, J. G. Collins, *Coordination Chemistry Reviews*, 2009, 253, 2021.
- 45- D. R. Boer, A. Canals, M. Coll, *Dalton Transactions*, 2009, 3, 399.

- 46- C. V. Barra, A. V. G. Netto. *Rev. Virtual Quim.*, 7, 2015, 1998.
- 47- I. Turel, J. Kljun. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2011, 2661.
- 48- R. G. Pearson. *Journal of Chemical Education*, 45, 1968, 581.
- 49- A. M. Pizarro, P. J. Sadler. *Biochimie*, 91, 2009, 1198.
- 50- A. P. S. Fontes, S. G. Almeida. *Química Nova*, 20, 1997, 398.
- 51- Gaussian 16, Revision B.01, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, 2016.
- 52- E. Papajak, J. Zheng, H.R. Leverentz, D.G. Truhlar, *J. Chem. Theor. Comput.*, 7, 2011, 3027.
- 53- (a) F.S. Santos, R.R. Descalzo, P.F.B. Gonçalves, E.V. Benvenuttic, F.S. Rodembusch, *Chem. Phys.*, 14, 2012, 10994. (b) D.M.P. Aroche, J.M. Toldo, R.R. Descalzo, P.F.B. Gonçalves, F.S. Rodembusch, *New J. Chem.*, 39, 2015, 6987. (c) R.A. Balaguez, V.G. Ricordi, R.C. Duarte, J.M. Toldo, C.M. Santos, P.H. Schneider, P.F.B. Gonçalves, F.S. Rodembusch; D. Alves, *RSC Adv.*, 6, 2016, 49613. (d) F. Gotardo, L.H.Z. Cocca, T.V. Acunha, A. Longoni, J. Toldo, P.F.B. Gonçalves, B.A. Iglesias, L. De Boni, *Chem. Phys. Lett.*, 674, 2017, 48.
- 54- Chemcraft - Software gráfico para visualização de cálculos quânticos, <http://www.chemcraftprog.com>.
- 55- R.C. Pivetta, B.L. Auras, B. Souza, A. Neves, F.S. Nunes, L.H.Z. Cocca, L. De Boni, B.A. Iglesias, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 332, 2017, 306.
- 56- M. Durmus, T. Nyokong, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 2007, 659.
- 57- H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R.E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 1981, 2179.
- 58- <http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>, acessado em janeiro de 2018.
- 59- O.A. Chaves, A.P.O. Amorim, L.H.E. Castro, C.M.R. Sant'Anna, M.C.C. de Oliveira, D. Cesarin-Sobrinho, J.C. Netto-Ferreira, A.B.B. Ferreira, *Molecules*, 20, 2015, 19526.
- 60- A. W. Bauer, et al. *Am J Clin Pathol*, 45, 1966.
- 61- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. [s.l: s.n.]. 32.

- 62- L. Q. S. Lopes, *et al. Microbial Pathogenesis*, 97, 2016, 183.
- 63- K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 6 ed., 2009, 408.
- 64- M.T. Stauffer. *Applications of Molecular Spectroscopy to current Research in the Chemical and Biological Sciences*, 2016, 428.
- 65- S. Dovidauskas, H.E. Toma, K. Araki, H.C. Sacco, Y. Iamamoto, *Inorg. Chim. Acta.*, 305, 2000, 206.
- 66- L.J. Boucher, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1968, 6640.
- 67- L. R. Cal. *Síntese de bisporfirinas contendo o espaçador 2,2'-bipiridina: modelos na elaboração de sensores luminescentes de íons metálicos*. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica), 2008, 128.
- 68- M. Gouterman. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 1961, 6, 138.
- 69- R. D. Garcia. *Modelagem molecular (TD-DFT) aplicada à simulação de espectros UV para cinamatos com perfil de filtros solares*, Dissertação (Mestrado em Farmácia), 2014, 60.
- 70- J.M. de Souza, F.F. de Assis, C.M.B. Carvalho, J.A.S. Cavaleiro, T.J. Brocksom, K.T. de Oliveira, *Tetrahedron Lett.*, 55, 2014, 1491.
- 71 I. Kruk. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Segunda Ed., 1998, 264.
- 72- P. Kluson, M. Drobek, A. Kalaji, S. Zarubova, J. Krysa, J. Rakusan, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 199, 2008, 267.
- 73- R. Ratomskis, S. Bagdonas, G. Strekyte. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.*, 33, 1996, 61.
- 74- J. Rubio-Magnieto, F. Di Meo, M. Lo, C. Delcourt, S. Clément, P. Norman, S. Richeter, M. Linares, M. Surin, *Org. Biomol. Chem.*, 13, 2015, 2453.
- 75- E. Barragán, B. Gordillo, G. Vargas, L. Velazco, *Appl. Organomet. Chem.*, 18, 2004, 311.
- 76- A. Jayamani, M. Sethupathi, S.O. Ojwach, N.Sengottuvelan, *Inorg. Chem. Commun.*, 84, 2017, 144.
- 77- L. A. C. Vegas. *Síntese De Complexos Semi-Sanduiche η⁶-p-Cimeno-Ru(II) Contendo Ligantes Binitrogenados, Interação Com O Dna E Potenciais Atividades Farmacológicas*, Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica), 2013, 98.
- 78- H. L. Wu, K. Li, T. Sun, F. Kou, F. Jia, J. K. Yuan, B. Liu, B. L. Qi. *Transition Met. Chem.* 36, 2011, 21.
- 79- B.L. Auras, S.L. Meller, M.P. da Silva, A. Neves, L.H.Z. Cocca, L. De Boni, C. H. da Silveira, B.A. Iglesias, *Appl. Organomet. Chem.*, 32, 2018, 4318.
- 80- P. Zhao, J.-W. Huang, W.-J. Mei, J. He, L.-N. Ji, *Spectrochim. Acta A.*, 75, 2010, 1108.

- 81- M. Sirajuddin, S. Ali, Badshah. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 124, 2013, 1.
- 82- N. Li, Y. Ma, L. Guo, X. Yang, *Biophys. Chem.* 116, 2005, 199.
- 83- Y. Ishikawa, N. Yamakawa, T. Uno, *Molecules*, 13, 2008, 3117.
- 84- A. Almeida, A. Cunha, M. A. F. Faustino, A. C. Tome, M. G. P. M. S. Neves. *Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents*. In: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, cap 5. 2011.
- 85- C. R. Rovaldi, A. Pievsky, N. A. Sole, P. M. Friden, D. M. Rothstein, P. Spacciapoli. *Antimicrob Agents Chemother.*44(12), 2000, 3364.
- 86- C. A. S. Henriques. *Síntese de meso-porfirinas mistas: Estudos fotofísicos e térmicos*. Dissertação (Mestrado em Química), 2011, 99.