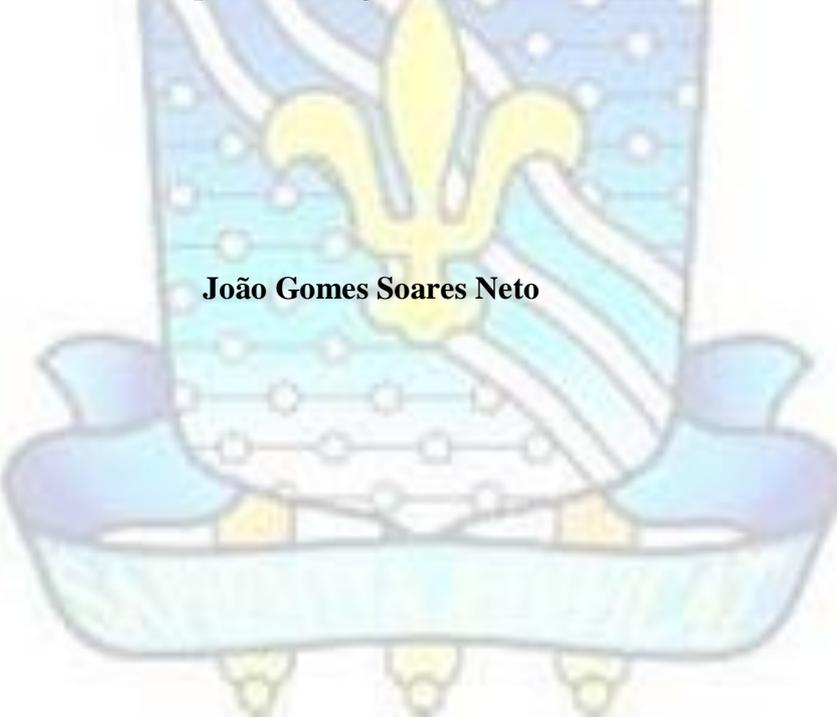


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Revisitando a síntese de uma Zn(II)-porfirina do tipo A<sub>3</sub>B como potencial  
fotossensibilizador para inativação fotodinâmica antimicrobiana**



**João Gomes Soares Neto**

João Pessoa – PB – Brasil

Junho/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Revisitando a síntese de uma Zn(II)-porfirina do tipo A<sub>3</sub>B como potencial  
fotossensibilizador para inativação fotodinâmica antimicrobiana**

**João Gomes Soares Neto\***

**Orientador: Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças**

**Coorientador: Prof. Dr. Eneas Ricardo de Moraes Gomes**

Dissertação de mestrado  
apresentada como um dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Química pela  
Universidade Federal da Paraíba

**\* Bolsista CAPES**

João Pessoa – PB – Brasil

Junho/2023

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S676r Soares Neto, João Gomes.

Revisitando a síntese de uma Zn(II)-porfirina do tipo A3B como potencial fotossensibilizador para inativação fotodinâmica antimicrobiana / João Gomes Soares Neto. - João Pessoa, 2023.

59 f. : il.

Orientação: Júlio Santos Rebouças.

Coorientação: Eneas Ricardo de Moraes Gomes.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química. 2. Zn-porfirinas. 3. Terapia fotodinâmica. 4. Fotossensibilizador. 5. Porfirinas do tipo A3B. I. Rebouças, Júlio Santos. II. Gomes, Eneas Ricardo de Moraes. III. Título.

UFPB/BC

CDU 54 (043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

DOCUMENTO Nº 3020224 / 2023 - PPGQ (11.01.14.55)

Nº do Protocolo: 23074.070293/2023-52

João Pessoa-PB, 24 de Julho de 2023

## **Revisitando a síntese de uma Zn(II)-porfirina do tipo A<sub>3</sub>B como potencial fotossensibilizador para inativação fotodinâmica antimicrobiana.**

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno João Gomes Soares Neto e aprovada pela banca examinadora em 24 de julho de 2023.

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças  
Departamento de Química - CCEN/UFPB  
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Eneas Ricardo de Moraes Gomes  
CBIOTEC/UFPB  
Coorientador

Profa. Dra. Antônia Lúcia de Souza  
Departamento de Química - CCEN/UFPB  
Examinadora Interna

Profa. Dra. Mary Cristina Ferreira Alves  
DQ/CT/UEPB-CG-PB  
Examinadora Externa

*(Assinado digitalmente em 24/07/2023 18:02)*  
ANTONIA LUCIA DE SOUZA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
Matrícula: 1332127

*(Assinado digitalmente em 24/07/2023 18:02)*  
ENEAS RICARDO DE MORAIS GOMES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
Matrícula: 2008919

*(Assinado digitalmente em 24/07/2023 17:21)*  
JULIO SANTOS REBOUCAS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
Matrícula: 1698581

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **3020224**, ano: **2023**, documento(espécie): **DOCUMENTO**, data de emissão: **24/07/2023** e o código de verificação: **50db37147d**

## Agradecimentos

- Primeiramente agradeço á Deus, por me fortalecer nessa longa jornada que foi. Sem ele, eu tenho certeza que eu não conseguiria. “João 15.5: Pois sem mim, vocês nao podem fazer coisa alguma.”
- Agradeço aos meus pais e familiares, que no inicio do mestrado me mantiveram em João Pessoa, me deram conselhos, todo o suporte necessário, não permitiram que eu desistisse.
- Ao meu orientador Júlio Santos Rebouças, uma pessoa extremamente inteligente, competente e cheio de carisma. Ainda que em momentos críticos e contra o tempo, o senhor trouxe um ambiente de calma e que era possível a concretização. Obrigado pela paciência.
- Ao PPGQ-UFPB, à PRPG-UFPB, ao CNPq, à FINEP e à CAPES pelo apoio, tanto financeiro quanto de infraestrutura, concedido para a execução dos estudos.
- À CAPES pela bolsa concedida.
- À Madu e Ferreira, que foram bem pacientes comigo e me ajudaram de forma que eu não sei como agradecer.

# Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1. Objetivos Gerais	17
1.2. Objetivos Específicos	17
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>18</b>
2.1. O cenário do reconhecimento de microorganismos como causadores de doenças: uma breve retrospectiva	18
2.2. Efeito Fotodinâmico e a Terapia Fotodinâmica: o uso da luz para fins medicinais	21
2.3. Porfirinas e Metaloporfirinas	28
2.4. Zinco Porfirinas e a Terapia Fotodinâmica	32
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
3.1. Reagentes e Solventes	37
3.2. Análises e Equipamentos	38
3.2.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	38
3.2.2. Espectroscopia Eletrônica de Absorção na região do UV-vis	38
3.2.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (RMN)	39
3.3. Síntese de Tosilato de Metila (MeOTs)	39
3.4. Síntese de Porfirinas	39
3.4.1. Síntese da 5-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-10,15,20-Tris-(2-piridil)porfirina (H <sub>2</sub> VanTri-2-PyP)	40
3.4.2. Síntese da Cloreto de 5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-Tris-( <i>N</i> -metilpiridínio-2-il)porfirina (H <sub>2</sub> VanTriM-2-PyPCL <sub>3</sub> )	41
3.4.3. Síntese da Cloreto de 5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-Tris-( <i>N</i> -metilpiridínio-2-il)porfirinatozínco (II) (ZnMVanTriM-2-PyPCL <sub>3</sub> )	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>43</b>
4.1. Comparativos entre as Porfirinas do tipo A <sub>3</sub> B, [A <sub>3</sub> B] <sup>3+</sup> e A <sub>4</sub>	43
4.2. Porfirina catiônica e base livre	45
4.3. Zinco Porfirina: ZnMVanTriM-2-PyPCL <sub>3</sub>	48
4.4. RMN de <sup>1</sup> H das porfirinas: Base neutra, Catiônica e Zinco Porfirina	50
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## RESUMO

Zn(II)-porfirinas (ZnPs) hidrossolúveis derivadas das 2-*N*-alquilpiridinioporfirinas, ZnTalquil-2-PyP<sup>4+</sup>, têm sido amplamente exploradas como fotossensibilizadores (FSs) em terapia fotodinâmica para inativação de microorganismos. A eficiência *in vivo* das Zn-porfirinas está relacionada não apenas às atividades fotoredox (como fotossensibilizador), mas também ao aumento da lipofilia da molécula e sua biodisponibilidade. A síntese de uma nova classe de Zn(II) porfirinas catiônicas do tipo [ZnA<sub>3</sub>B]<sup>3+</sup> (A = 2-*N*-metilpiridil, B = *O*-alquilvanilina) foi realizada anteriormente no grupo da UFPB e ocorreu um aumento do fator de retenção cromatográfico (R<sub>f</sub>), que tem tipicamente sido correlacionado com a lipofilia em porfirinas catiônicas. No presente estudo, a síntese da ZnP do tipo [ZnA<sub>3</sub>B]<sup>3+</sup>, 5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(*N*-piridínio-2-il)porfirinatozinco(II) (ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>), foi revisitada. O complexo obtido foi caracterizado por espectroscopias UV-vis, obtendo rendimentos maiores que 90%, com espectros UV-Vis característicos aos reportados na literatura com comprimento de onda em 428 nm, e RMN de <sup>1</sup>H apontando o desaparecimento dos hidrogenios internos. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD-SiO<sub>2</sub>) confirmaram um aumento de lipofilia, sendo semelhante àquela de porfirinas mais volumosas do tipo [ZnA<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>, como a *meso*-tetraquis(*N*-n-butilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II), que já são consideradas pela literatura como potentes agente fotodinâmicos de boa biodisponibilidade.

Palavras-Chave: Zn-Porfirinas. Terapia Fotodinâmica. Fotossensibilizador. Lipofilia. Porfirinas do tipo A<sub>3</sub>B.

## ABSTRACT

Water-soluble Zn(II)-porphyrins (ZnPs) derived from 2-N-alkylpyridinioporphyrins, ZnTalkyl-2-PyP<sup>4+</sup>, have been widely explored as photosensitizers (PSs) in photodynamic therapy for the inactivation of microorganisms. The in vivo efficiency of Zn-porphyrins is related not only to photoredox activities (as a photosensitizer), but also to the increased lipophilicity of the molecule and its bioavailability. The synthesis of a new class of Zn(II) cationic porphyrins of the [ZnA<sub>3</sub>B]<sup>3+</sup> type (A = 2-N-methylpyridyl, B = *O*-alkylvanillin) was previously performed in the UFPB group and there was an increase in the retention factor (Rf), which has typically been correlated with lipophilicity in cationic metalloporphyrins. In the present study, the synthesis of ZnP of the type [ZnA<sub>3</sub>B]<sup>3+</sup>, 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-10,15,20-tris(N-pyridinium-2-yl)porphyrinatozinc(II) (ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>), was revisited. The complex obtained was characterized by UV-vis spectroscopy, obtaining yields greater than 90%, with UV-Vis spectra characteristic of those reported in the literature with a wavelength of 428 nm, and <sup>1</sup>H NMR pointing to the disappearance of internal hydrogens. Analysis by thin layer chromatography (TLC-SiO<sub>2</sub>) confirmed an increase in lipophilicity, being similar to that of larger porphyrins of the [ZnA<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> type, such as meso-tetrakis(N-n-butylpyridinium-2-yl)porphyrinatezinc(II), which are already considered by the literature as potent photodynamic agents with good bioavailability.

Keywords: Zn-Porphyrins. Photodynamic Therapy. Photosensitizer. Lipophilia. Porphyrins of the A<sub>3</sub>B type.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H<sub>2</sub>P: Porfirina base-livre;  
 TFD: Terapia Fotodinâmica;  
 FS's: Fotossensibilizadores;  
 ZnPs: Zn-porfirinas;  
 Py: 2-Piridila;  
 Van: Vanilina;  
 MVan: Metilvanilina/veratradeído;  
 M/Me: metila;  
 nPrVan: *O*-n-propilvanilina;  
 iBuVan: *O*-iso-butilvanilina;  
 nBuVan: *O*-n-butilvanilina;  
 nHexVan: *O*-n-hexilavanilina;  
 SiO<sub>2</sub>: Sílica gel/óxido de silício;  
 CCD-SiO<sub>2</sub>: Cromatografia de camada delgada em sílica gel;  
 MeOTs: p-toluenosulfonato de metila (ou tosilato de metila);  
 EtOTs: p-toluenosulfonato de etila (ou tosilato de etila);  
 MeCN: Acetonitrila;  
 CHCl<sub>3</sub>: Clorofórmio;  
 AcOEt: Acetato de etila;  
 MeOH: Metanol;  
 PrOH: iso-propanol;  
 SOD: Superóxido dismutase;  
 UV-vis: Ultravioleta-Visível;  
 H<sub>2</sub>T-2-PyP: meso-tetraquis(2-*N*-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>VanTri-2-PyP:5-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>MVanTri-2-PyP:5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>nPrVanTri-2-PyP:5-(3-metoxi-4-n-propoxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>nBuVanTri-2-PyP:5-(3-metoxi-4-n-butoxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>nHexVanTri-2-PyP:5-(3-metoxi-4-n-hexiloxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina;  
 H<sub>2</sub>nNonVanTri-2-PyP: 5-(3-metoxi-4-n-noniloxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina  
 H<sub>2</sub>TM-2-PyP<sup>4+</sup>: meso-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina;  
 H<sub>2</sub>TM-3-PyP<sup>4+</sup>: meso-tetraquis(*N*-metilpiridínio-3-il)porfirina;  
 H<sub>2</sub>TM-4-PyP<sup>4+</sup>: meso-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina;  
 H<sub>2</sub>TPP: meso-tetraquisfenilporfirina;

H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>:5-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-10,15,20-tris(N-piridínio-2-il)porfirina;

H<sub>2</sub>MVanTri-2-PyP<sup>3+</sup>:5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(N-piridínio-2-il)porfirina;

ZnTM-2-PyP<sup>4+</sup>: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II);

ZnTE-2-PyP<sup>4+</sup>: *meso*-tetraquis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II) ;

ZnTnBu-2-PyP<sup>4+</sup>: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II);

ZnTnHex-2-PyP<sup>4+</sup>: *meso*-tetraquis(*N*-hexilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II);

ZnMVanTri-2-PyP<sup>4+</sup>:5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(*N*-piridínio-2-il)porfirinatozinco(II);

ZnTM-3-PyP<sup>4+</sup>: *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-3-il)porfirinatozinco(II).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação da oscilação de uma onda eletromagnética (Luz)	22
<b>Figura 2:</b> Espectro Eletromagnético com destaque para a região do visível	22
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de um fotossensibilizador (FS)	24
<b>Figura 4:</b> Redução sequencial da molécula de Oxigênio e a formação de algumas espécies reativas do oxigênio	26
<b>Figura 5:</b> Macrocielo de uma porfirina	28
<b>Figura 6:</b> Substituintes Meso e $\beta$ -pirrólicos	29
<b>Figura 7:</b> Representação da Síntese da meso-tetrafenilporfirina pelo método Adler-Longo	31
<b>Figura 8:</b> Espectro característico das Porfirinas e Metaloporfirinas	31
<b>Figura 9:</b> Zn(II) <i>meso</i> -tetrakis( <i>N</i> -etilpiridínio-2-il)porfirinas (ZnTM-2-PyP <sup>4+</sup> )	33
<b>Figura 10:</b> Representação de porfirinas meso-substituídas do tipo [A <sub>4</sub> ] e [A <sub>3</sub> B]	34
<b>Figura 11:</b> Esquema geral de síntese da Zn-Porfirina pela rota alternativa	36
<b>Figura 12:</b> ZnTM-2-PyP <sup>4+</sup> como modelo estrutural para ZnMVanTriM-2-PyP <sup>3+</sup>	37
<b>Figura 13:</b> Síntese da Porfirina base-livre (H <sub>2</sub> VanTri-2-PyP)	40
<b>Figura 14:</b> Síntese da Porfirina Catiônica (H <sub>2</sub> MVanTri-2-PyPCl <sub>3</sub> )	41
<b>Figura 15:</b> Esquema geral de síntese da ZnP Catiônica (ZnMVanTri-2-PyP <sup>3+</sup> )	42
<b>Figura 16:</b> Modelo comparativo entre os sistemas A <sub>4</sub> comparado aos A <sub>3</sub> B das ZnPs	44
<b>Figura 17:</b> Espectros UV-vis normalizados da porfirina base-livre (H <sub>2</sub> TM-2-PyP <sup>4+</sup> ) e catiônica (H <sub>2</sub> MvanTri-2-PyP <sup>3+</sup> ) registrados em H <sub>2</sub> O. A expansão corresponde a região de menor energia	46
<b>Figura 18:</b> (a) Espectros UV-vis normalizados da H <sub>2</sub> VanTri-2-PyP <sup>3+</sup> ; (b) registrados em tampão fosfato pH 7,8 e tampão borato pH 9,3	48
<b>Figura 19:</b> Representação esquemática da mistura de atropisômeros das porfirinas	48
<b>Figura 20:</b> Espectros UV-vis da metalação com Zn(II) após 30 min e 2h de reação	49
<b>Figura 21:</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H com os respectivos deslocamentos químicos das porfirinas de interesse	52
<b>Figura 22:</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H da H <sub>2</sub> MvanTri-2-PyP <sup>3+</sup> na região dos aromáticos	53

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Reagentes, Solventes e Adsorventes utilizados_____	38
<b>Tabela 2:</b> Valor estimado com base na equação da reta da correlação entre $R_f$ v $nC$ das ZnPs ( $y= 0,0671x +0,0794$ )_____	45
<b>Tabela 3:</b> Dados de $R_f$ do ambiente ácido e básico em porfirinas_____	47
<b>Tabela 4:</b> Dados dos espectros de RMN de $^1H$ com os respectivos deslocamentos químicos (ppm) das porfirinas de interesse neste trabalho_____	50

## 1. INTRODUÇÃO

Por muito tempo, doenças causadas por microorganismos vêm sendo tratadas com antimicrobianos ou antibióticos, facilitando a cura. Na década de 1940, a Universidade de Oxford realizou estudos, pesquisas e o primeiro teste clínico duplo cego com a penicilina, e, desde então, os antibióticos vêm sendo desenvolvidos e usados no tratamento de doenças com microorganismos (ALMEIDA et. al., 2006; FREITAS, 2015).

O aumento populacional, a industrialização e o desenvolvimento dos meios de transporte resultaram em trocas comerciais intensas, aumento no fluxo de viagens e, paralelamente, provocaram uma incidência maior de doenças infecciosas. Neste contexto, o uso abusivo e inapropriado de antimicrobianos deu origem uma grande variedade de microorganismos patogênicos resistentes a estes medicamentos. Segundo Jori et al. (2006), além do motivo da intensificação das viagens, outros motivos como alta taxa de transmissão de microorganismos, crescimento da pobreza nos países do terceiro mundo e ampla variedade de mecanismos de adaptação das células microbianas, também resultam no aumento da resistência (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Neste cenário, tornou-se urgente a necessidade de se desenvolver novos procedimentos de intervenção a fim de promover a inviabilização do crescimento microbiano. Em países em desenvolvimento, estima-se que 45% das causas de morte são por infecções microbianas (WANNMACHER, 2004; AZEVEDO, 2005; LERMA ET AL., 2010; DNDI, 2022).

O avanço científico e tecnológico no campo da saúde, trouxe consigo a busca por formas de tratamentos que não sejam invasivas ao corpo humano, trazendo consigo resultados satisfatórios, a exemplo da Terapia Fotodinâmica – TFD (ou PDT, do inglês Photodynamic Therapy).

Cada vez mais utilizada, a terapia fotodinâmica é uma técnica que vem sendo estudada e aplicada para tratar uma série de doenças. Relatos antigos mostram que há mais de 4.000 anos os antigos egípcios usaram o extrato de uma planta, *Ammi majus*, combinada com a luz solar para tratamento de vitiligo. Gregos e Romanos tomavam banho de sol como um tratamento de doenças específicas. Assim, a fototerapia (terapia envolvendo a luz) é fundamentada na ação da luz sobre componentes químicos do tecido biológico (COLUSSI, V.C. et.al; 1996; 1997; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ,

2019).

A terapia fotodinâmica envolve a administração de um fotossensibilizador (FS) que, ao ser ativado em um determinado comprimento de onda, converte o oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete e radicais superóxido (entre outros), resultando na destruição de uma célula-alvo de forma seletiva (SOUZA, 2021).

A luz laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e LED (Light Emitting Diode) são as mais utilizadas nesse tipo de tratamento, permitindo a estimulação de modo eficiente do fotossensibilizador. A luz laser possui propriedades importantes como alta concentração de energia, pouca dispersão de energia (à medida que a luz se propaga) e monocromaticidade (de Oliveira, K. T. *et al.* 2014; de OLIVEIRA, R. F. *et al.*, 2021).

O tratamento ideal deve inativar o máximo de microrganismos patogênicos para eliminar ou limitar o crescimento dos patógenos sobreviventes, buscando não causar efeitos colaterais no tecido do hospedeiro. A inativação fotodinâmica antimicrobiana (PDI), um dos ramos da TFD, surge como uma alternativa promissora, oferecendo inativação rápida e localizada dos microrganismos patogênicos, sem afetar os saudáveis adjacentes, ganhando espaço nos estudos realizados (Edelson,1988; SCHAEFFER, B. *et al.*, 2018).

A relativa simplicidade e eficiência da técnica atrai a comunidade científica, promovendo um grande interesse por ser uma terapia multidisciplinar, envolvendo não somente equipes médicas, como químicos e físicos.

Os estudos se intensificaram quando enxergaram que o efeito fototóxico da terapia fotodinâmica sobre as células tumorais eram muito grandes, atraindo novamente a atenção da comunidade científica, se consolidando como uma valiosa opção terapêutica para tratamentos combinados (AGOSTINIS *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2021).

Suas principais vantagens consistem em um dano seletivo a tecidos alvo, ausência de intervenção cirúrgica, com possibilidade de repetição, caso seja necessário, e com efeitos colaterais mais controlados e menos invasivos quando comparadas à cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Adicionalmente, pode também prolongar a sobrevida em pacientes com câncer inoperáveis (ABRAHAMSE; SOSTHENE MFOUO TYNGA, 2018; ZHOU *et al.*, 2021).

Algumas desvantagens também são apresentadas (MELO, C.A.S.; *et.al.*; 2001)

(ABRAHAMSE; SOSTHENE MFOUO TYNGA, 2018), dentre elas:

- i. Os estados excitados dos Fotossensibilizadores possuem curto tempo de meia-vida, diminuindo a probabilidade da transferência de energia para o oxigênio molecular.
- ii. Depende da concentração de O<sub>2</sub> nos tecidos.
- iii. Normalmente, o tempo de meia-vida do Oxigênio singlete é curto.

Estes aspectos negativos da terapia, estimulam a busca por novos fotossensibilizadores (FSs) que busquem minimizar essas desvantagens.

Em 1900, Rabb, fez a primeira observação de sensibilização química do tecido pela luz, na presença de certos corantes, apresentando uma alternativa para o tratamento de infecções locais contra microrganismos como fungos, bactérias e vírus.

O uso clínico das porfirinas como fotossensibilizadores nesse tipo de tratamento em humanos ocorreu por volta de 1993, com uma formulação contendo um derivado da hematoporfirina (Photofrin®) que teve aprovação clínica em vários países e vem sendo, desde então, utilizada em TFD na oncologia e dermatologia (ALLISON, 2004; GUTERRES et al., 2020).

A hematoporfirina (Photofrin®) pode ser considerada como a primeira geração de porfirinas a serem utilizadas nos tratamentos com a Terapia fotodinâmica. No entanto, sua prolongada fotossensibilidade cutânea, a baixa seletividade pelo tecido tumoral e uma fraca banda de absorção onde a droga é fotoativada, se apresentaram como desvantagens (BASTOS, M. M. 2012).

Sabe-se que o uso de porfirinas e derivados desempenham papéis vitais em sistemas biológicos e bioquímicos, como na fotossíntese, transporte e armazenamento de oxigênio entre outros. Diante disso, novas porfirinas que apresentem maior seletividade por um tecido alvo começaram a ser sintetizadas e descobertas (Allison, 2004; GUTERRES et al., 2020).

As porfirinas possuem propriedades químicas e físicas específicas e se apresentam como moléculas eficazes no tratamento de diversas doenças, de câncer a leishmaniose, envolvendo a TFD. (Ethirajan, M.; et.al. 2011; GUTERRES et al., 2020). Dentre essas propriedades, temos:

- i. Baixa toxicidade no escuro in vitro ou in vivo;
- ii. Alta eficiência para geração intracelular de ROS e especialmente altos rendimentos quânticos ( $\Phi$ ) para geração de O<sub>2</sub>;

- iii. Versatilidade estrutural permitindo a modulação de sua carga, facilitando sua interação com membranas celulares.

O oxigênio molecular é essencial para que ocorra a morte celular, via geração de espécies reativas de oxigênio durante a TFD. Considerando que ele esteja disponível, a quantidade de células destruídas está relacionada com a concentração de porfirinas e a dose de luz aplicada, e, essa dose sofre um decaimento à medida que ocorre a penetração do tecido (FINGAR, V.H.; et.al.; 1987).

As porfirinas têm a capacidade de se associar a íons metálicos, e estas são chamadas de metaloporfirinas. O processo de formação de toda e qualquer metaloporfirina ocorre através de uma reação ácido-base de Lewis, onde o metal, eletropositivo, age com um ácido de Lewis e os átomos de nitrogênio do macrociclo, mais eletronegativos e com pares de elétrons livres, agem como uma base de Lewis. Assim, o metal, com seus orbitais d vazios, podem receber pares de elétrons dos átomos de nitrogênio, que os tem disponíveis, resultando em uma ligação covalente (GUTERRES et al., 2020).

As metaloporfirinas possuindo o Zn(II) como metal complexado em seu centro são denominadas Zn(II) porfirinas (ZnPs). As ZnPs têm potencial para se apresentarem como fotossensibilizadores com características melhoradas, sendo mais eficazes do que seus análogos de base livre. Essa complexação com o metal aumenta sua estabilidade química, melhora a interação com membranas celulares, apresenta maiores rendimentos quânticos para geração de O<sub>2</sub> singleto, e facilita sua biodisponibilidade e seletividade (KASSAB, et.al. 2003; ROSSI et al., 2020).

O uso de Zn(II) porfirinas catiônicas como FSs em processos fotodinâmicos inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e resultou em uma melhoria considerável na lipofilia da molécula e na sua absorção nos tecidos, comparadas às porfirinas base livre (SOUZA, 2021).

Os primeiros estudos relacionados às porfirinas catiônicas se baseavam em estruturas da *N*-metilpiridilporfirina, H<sub>2</sub>TM-4-PyP<sup>4+</sup>, que já se mostravam promissores em aPDI. No entanto, estudos recentes apontaram que a redução dessa carga para +3 se mostraram mais eficazes. Em geral, porfirinas catiônicas tendem a ter maior afinidade pela superfície altamente negativa das células microbianas (PAVANI, et.al. 2009; ROSSI et al., 2020).

Sistemas porfirínicos estruturais do tipo [A<sub>3</sub>B] e [A<sub>3</sub>B]<sup>3+</sup> apresentam 1 substituinte do anel diferente dos 3 demais, permitindo o controle independente de

propriedades associadas aos grupos arilas A e B. Até o momento, estes sistemas permanecem pouco explorados como fotossensibilizadores (SARMENTO-NETO, 2021). Estruturas do tipo  $A_3B$ , bem como as caracterizações das ZnPs do tipo  $[ZnA_3B]^{3+}$  (A = 2-N-metilpirídínio; B = O-alkilvanilina) foram previamente estudadas e estabelecidas por Sarmiento-Neto (2021) como um potencial fotossensibilizador para uso em terapia fotodinâmica, tendo melhorias na lipofilia quando comparadas às porfirinas do tipo  $[ZnA_4]^{4+}$  *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatozinco(II) correspondente, que já são consideradas pela literatura como potentes agente fotodinâmicos na inativação fotodinâmica com aplicação em leishmanias, bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e entre outros (BENOV et al., 2002; EZZEDDINE et al., 2013).

### 1.1. *Objetivos Gerais*

Diante desta conjuntura, este trabalho teve como objetivo revisar a síntese e caracterização de um potencial fotossensibilizador à base de Zn(II)-porfirina para uso em terapia fotodinâmica. Em particular, explora-se o desenvolvimento de Zn(II)-porfirinas derivadas do sistema  $[A_3B]^{3+}$  (A = 2-*N*-metilpirídínio; B = *O*-metilvanilina) como candidatos a fotossensibilizadores para inativação fotodinâmica antimicrobiana.

### 1.2. *Objetivos Específicos*

- ✓ Revisitar a síntese de porfirinas do tipo  $A_3B$  neutras, catiônicas e metaladas com Zn(II), bem como suas purificações:  $H_2VanTriM-2-PyP$ ,  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  e  $ZnMVanTriM-2-PyPCl_3$ , respectivamente.
- ✓ Caracterizar os sistemas obtidos por Espectroscopia Eletrônica de Absorção na região do UV-vis;
- ✓ Caracterizar os compostos de interesse por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1H$  (RMN de  $^1H$ );
- ✓ Avaliar, qualitativamente, o caráter lipofílico da ZnP por Cromatografia de Camada Delgada (CCD- $SiO_2$ ) em comparação aos sistemas  $[ZnA_4]^{4+}$  da literatura.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. O cenário do reconhecimento de microorganismos como causadores de doenças: uma breve retrospectiva**

Doenças causadas por microrganismos sempre existiram desde o início da humanidade, sejam elas letais e/ou crônicas. Devido ao baixo índice populacional e à pouca mobilidade pelo planeta, o contágio com outras pessoas era menor e conseqüentemente era baixa a taxa de transmissibilidade. Com o passar do tempo, no arcabouço dos avanços tecnológicos, das intensas trocas econômicas, do desenvolvimento do comércio e da indústria, surgiram novos meios de transporte e locomoção nos meios aeroviários, terrestres e aquaviários. Esta conjuntura, permitiu ao homem uma maior mobilidade sobre o planeta, seja através de barcos, animais, navios, entre outros; e o homem uma vez espalhado pelo mundo, conseqüentemente, concorria para que os microrganismos se espalhassem (UJVARI, 2008.; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Observando os primeiros meios de sobrevivência do homem, podemos destacar a agricultura e a criação de animais. O desenvolvimento da agricultura e dos seus conhecimentos permitiu a existência de áreas irrigadas e alagadas, facilitando muito mais a proliferação de vetores transmissores de diversas doenças, a exemplo do mosquito transmissor da malária e de caramujos transmissores da esquistossomose (NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

No segmento da criação de animais, esta nos remete ao vírus bovino, causador da peste bovina, que foi uma doença letal que era transportada por rebanhos europeus durante os séculos XVII, XVIII e XIX, sendo válido ressaltar que o vírus do boi, após suas mutações genéticas, se tornou resistente às técnicas da época e deu origem ao sarampo (UJVARI, 2008).

A peste negra, também conhecida como Peste Bubônica, se configurou como uma pandemia, ocorrida no século XIV. A história aponta que a bactéria da peste negra foi trazida pelas embarcações genovesas do Mar Negro para a Europa em 1348. Bastaram dois anos para a doença se alastrar por todo continente e matar um terço de toda população europeia (UJVARI, 2008).

Sobre a Lepra, ou ainda Doença de Hansen, ou oficialmente Hanseníase, esta, afetou a humanidade durante muitos anos. Monot et al., (2005) aponta que as grandes investigações europeias nos litorais da África, permitiram que o vírus se espalhassem

mais ainda pelo mundo.

No início do século XX, médicos canadenses descobriram uma estranha forma de doença cutânea em índios das Guianas, associada à bactéria causadora da framboesia, parente da bactéria da sífilis. Em estudos de análise do DNA da bactéria, chegaram à conclusão que a bactéria teria sofrido mutação e transformado a doença framboesia em sífilis (DNDI, 2022).

É diante desse cenário, que estudos e descobertas de formas que pudessem combater esses microrganismos, começaram a serem desenvolvidos (HERRMANN & GAUDET, 2009; HOIBY *et al.*, 2010; DNDI, 2022). Os primeiros antimicrobianos criados salvaram muitas vidas de doenças para as quais anteriormente sequer existiam noções de tratamento, porém, alguns problemas surgiram com o tempo, como:

1) aumento da morbidade e mortalidade, quer dizer, ocorreu um elevado índice de mortalidade da população mundial relacionada às infecções causadas por microrganismos multirresistentes;

2) elevada toxicidade da droga, pois para que um antimicrobiano seja efetivo é necessário que possua toxicidade seletiva, ou seja, a droga deve exibir inativação dos microrganismos, sem afetar as células do hospedeiro;

3) longos períodos de internação de pacientes com infecções e o aumento nos custos hospitalares e da saúde pública.

É importante entender que a resistência microbiana ou sua mutação frente a um medicamento é um processo biológico natural. Entende-se por resistência, o crescimento de um microrganismo *in vitro* na presença de altas concentrações de antimicrobianos e quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas, que interferiam em suas funções de crescimento e às quais seriam habitualmente sensíveis (CHANG *et al.*, 2003; DOHMEN, 2008; ASLANI *et al.*, 2011; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

Somente a partir de 1920 e 1930, com a descoberta da penicilina, houve um aumento no desenvolvimento e no uso de novos antimicrobianos em todo o mundo, uma vez que as primeiras descrições do aparecimento da resistência microbiana ocorreram logo após o uso difundido deste fármaco (FREITAS, 2015).

O início dos estudos de microrganismos acontece em 1674 quando o alemão Antony Van Leeuwenhoek criou o primeiro microscópio. Ele usou este pequeno equipamento para observar pequenos seres, em amostras de solo, rio, saliva e fezes. Um pouco mais adiante, Louis Pasteur teve um papel importante no avanço da

microbiologia, ao estudar a fermentação, enxergando os microrganismos que eram responsáveis por ela. Essas contribuições fizeram com que alguns cientistas alertassem a sociedade da possibilidade de os micróbios terem relação com doenças que ocorriam em animais e seres humanos, sendo esta teoria foi denominada Teoria microbiana da doença (ASLANI et al., 2011).

Vários são os mecanismos propostos com relação à resistência microbiana, podendo-se destacar entre eles: a inativação do antimicrobiano pela destruição ou modificação do mesmo; a alteração do local de ação do antimicrobiano; a diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano por impermeabilização da membrana celular ou devido às bombas de efluxo presentes nos microrganismos (LEVY, 2005; DOHMEN, 2008; CALVO & MARTÍNEZ, 2009; KOHANSKI *et al.*, 2010; NÚÑEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2019).

A presença de patógenos multirresistentes é responsável pelo aumento da mortalidade dos pacientes internados em hospitais e ocasionam um grande aumento nos gastos com saúde devido à prescrição de medicamentos mais caros e ao longo período de internação. Essas infecções hospitalares afetam os mais frágeis em unidades de terapia intensiva, oncologia e neonatologia, onde costumam causar alta mortalidade (ASLANI et al., 2011; BRAGA, 2020).

Na busca de uma maneira de reduzir o índice de mortalidade, os estudos relacionados à terapia fotodinâmica começaram na década de 60, porém permaneceram inexplorados (MACHADO, 2000; SIMPLICIO *et al.*, 2002; PRATES, 2005). Jori et al., (2006) afirma que TFD não foi inicialmente tão explorada, uma vez que a descoberta dos antibióticos, para o momento, supria bem as necessidades. Acreditava-se que o uso dos antibióticos iria reduzir gradativamente as doenças microbianas, porém, o que se verificou de fato foi que houve um aumento na resistência de microrganismos frente aos antimicrobianos (DNDI, 2022).

Diante disso, o uso da inativação fotodinâmica como uma opção no tratamento de infecções microbianas locais é retomada e com o tempo se apresenta de forma muito efetiva. Tal fato possibilita a diminuição do uso de antimicrobianos para alguns tipos de infecções e, além disso, resguarda a utilização desses para infecções generalizadas, atenuando o aparecimento de novos microrganismos resistentes (SOUZA, 2021; SOUZA, 2022).

## 2.2. Efeito fotodinâmico e a terapia fotodinâmica: O uso da luz para fins medicinais

Há mais de 4000 anos, a luz vem sendo utilizada para fins medicinais. Inicialmente no Egito, Grécia e Índia, a luz era utilizada para cura de variados distúrbios. Tal fato tem por base a crença de que somente a luz solar era responsável pela cura de doenças como vitiligo, psoríase, raquitismo e até psicose (COSTA, 2013).

Com o avanço científico, notou-se que os resultados obtidos e seus efeitos terapêuticos estavam relacionados à combinação da luz com os pigmentos das plantas (corantes). Entre 1897-1898, Oscar Raab, na época aluno do professor von Tappeiner no Instituto Farmacológico do Ludwig Maximilian, na Universidade de Munique, teve a ideia de usar corantes para fins terapêuticos (COSTA, 2013).

Neste sentido, foi em 1903 que ocorreu a primeira utilização fotodinâmica de corantes no tratamento de tumores por von Tappeiner e Jesionek, inserindo na comunidade científica a expressão “ação fotodinâmica” para descrever o fenômeno (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; COSTA, 2013). Um ano depois, o mesmo pesquisador descobriu que a presença de O<sub>2</sub> se caracterizava como uma condição essencial para ocorrer a fotossensibilização.

Dois anos antes do experimento de von Tappeiner, em 1901, o médico Niels Filsen usou luz vermelha e luz ultravioleta (UV) no tratamento de pacientes com varíola e tuberculose cutânea, o qual lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina. No entanto, por mais que houvesse descobertas que incentivassem ao estudo do fenômeno, somente em 1972 Ivan Diamond conseguiu destruir células de glioma de rato *in vivo* e *in vitro*, por ativação de porfirina pela luz (COSTA, 2013).

Em 1976, o urologista John F. Kelly eliminou células humanas de carcinoma da bexiga, por ação combinada da luz com derivados de hematoporfirina (HpD). A experiência foi um sucesso e desencadeou, os primeiros estudos clínicos em humanos (MACCORMACK, 2007).

Até que então, em 1978, Dougherty coordenou o primeiro estudo clínico em grande escala, observando grande efetividade para vários tumores, por meio da purificação parcial da HpD por remoção dos monômeros, e a mistura resultante foi denominada de Photofrin II. Esse foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), como Photofrin®, em 1993, e comercializado para o tratamento de câncer (COSTA, 2013).

A luz, de uma maneira simplificada, pode ser definida como um fenômeno resultante da combinação de um campo elétrico (E) e um campo magnético (B) que vibram em direções ortogonais e que se propagam num mesmo sentido (MANOEL, 2014; de OLIVEIRA, 2021) (Figura 1).

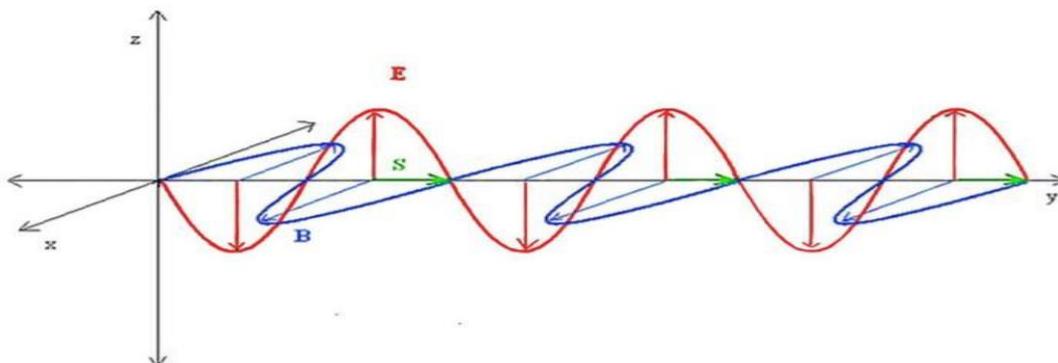


Figura 1. Representação da oscilação de uma onda eletromagnética (luz) (de Oliveira, K. T. *et al.*, 2014)

A luz interage com a matéria como resultado de sua natureza elétrica. A física moderna reconhece a luz como onda eletromagnética. As frequências em que os campos elétricos e magnéticos da luz oscilam determinam a cor que ela emite, gerando o espectro de cores visíveis aos olhos humanos, o espectro visível (de OLIVEIRA, 2014; 2021) (Figura 2).

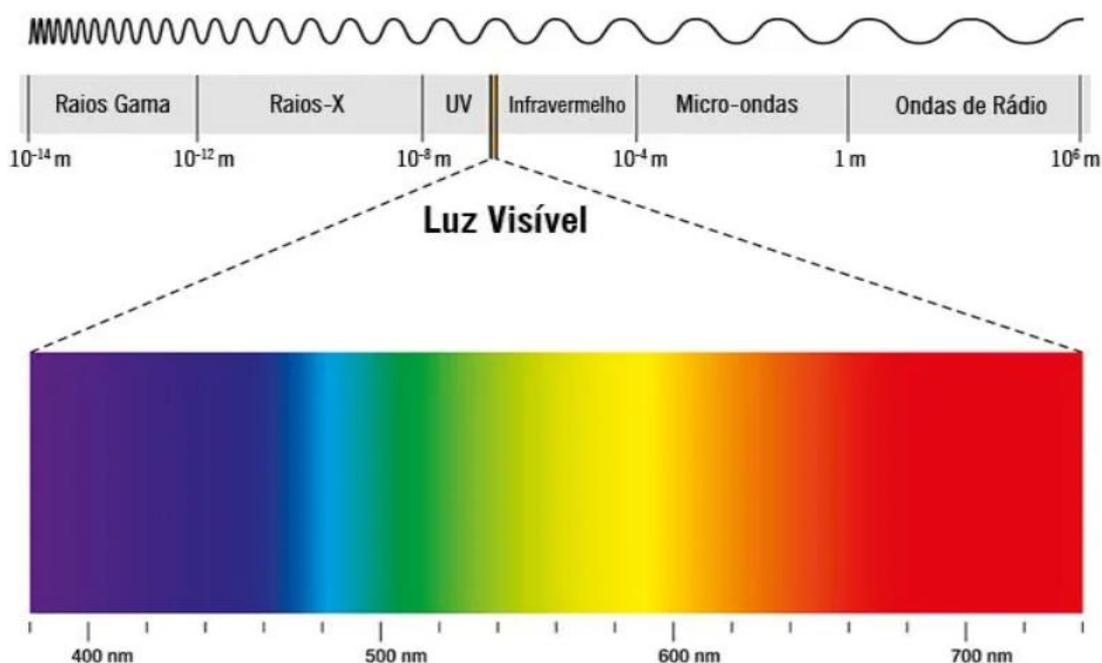


Figura 2. Espectro eletromagnético com destaque para a região do visível (de Oliveira, K. T. *et al.* 2014)

O avanço da tecnologia no que se diz respeito à utilização da luz em processos fotodinâmicos, designam duas boas opções: Laser e LED. A fonte de luz laser é um dispositivo desenvolvido na década de 60, que apresenta propriedades significativas, a exemplo de elevada concentração de energia, à medida que a luz se propaga; pouca dispersão de energia, coerência, monocromaticidade e colimação (GENOVESE, 2000). Em 1969, o laser a baixa potência foi considerado um bioestimulador, fato que pode ser encontrado na literatura descrito por laser de bioestimulação (MESTER, 1985; de OLIVEIRA, 2021).

O Diodo Emissor de Luz (Light emitting diode- LED) é um diodo semicondutor que absorve energia elétrica e a emite na forma de luz visível. Ele é considerado como uma fonte de luz contínua e tem uma alta eficiência, sendo os efeitos do LED e do Laser semelhantes (GENOVESE, 2000; SOUZA, 2021).

Ambos, laser e LED, permitem a estimulação do fotossensibilizador de modo eficiente (de OLIVEIRA, 2014; 2021), mas para potencializar tratamentos médicos com o uso da luz são necessários também estudos relacionados à dosimetria, sendo intrinsecamente investigados parâmetros como (SOUZA, 2021):

- i. potência média;
- ii. faixa de comprimento de onda;
- iii. irradiância;
- iv. irradiação contínua ou pulsada;
- v. tempo de irradiação/tratamento.

A Terapia Fotodinâmica (TFD), é considerada uma prática clínica não convencional que se baseia na destruição seletiva de um tecido alvo. Para que isso ocorra, é preciso haver uma interação dinâmica entre um composto fotossensibilizador (FS) e um tecido alvo, onde esse FS atua, causando destruição celular a partir da incidência uma luz em comprimento de onda específico, sendo este comprimento de onda específico de acordo com o alvo desejado (EDUARDO et al, 2015; SOUZA, 2021; 2022). Basicamente, a luz monocromática juntamente com um fármaco fotossensível produzem uma série de processos fotoquímicos e fotofísicos, decorrente da radiação eletromagnética com a matéria, como segue abaixo (Figura 3):

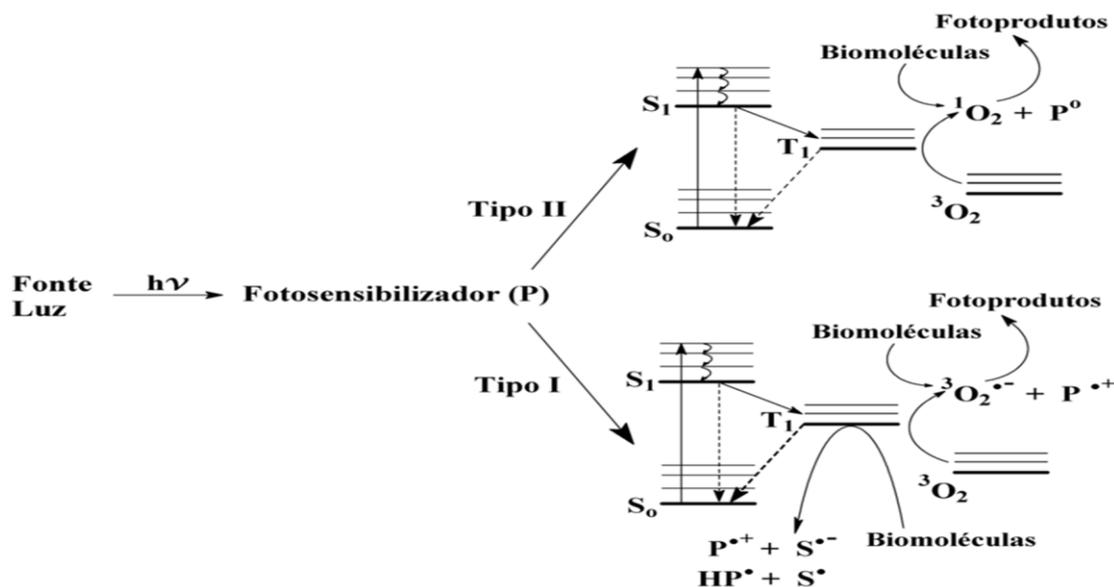
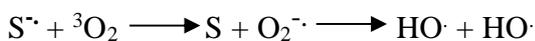
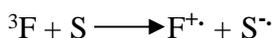


Figura 3: Mecanismo fotossensibilizador (FS) (FOOTE, 1991).

Os fotossensibilizadores são compostos que absorvem energia em comprimentos de ondas específicos, de acordo com sua natureza, o que induz à formação de estados excitados, seguido de reações fotoquímicas clássicas (FOOTE, 1991), levando à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Ressalta-se que, para que haja eficácia, o fotossensibilizador precisa ter uma biocompatibilidade adequada com o sítio de reação (SOUZA, 2021).

Como observado na figura 3 acima, existem dois tipos para o mecanismo fotossensibilizador: Tipo I e Tipo II.

No mecanismo do tipo I, o FS no estado excitado interage diretamente com o substrato orgânico e o  $O_2$  presente no mesmo, gerando EROs. Essas reações ocorrem pela transferência de elétrons ou abstração de um átomo de hidrogênio, obtendo como produto final, superóxido ou radical hidroxila. O mecanismo Tipo I é descrito pelos seguintes processos redox:



Onde, FS = Fotossensibilizador e S= Substrato.

No mecanismo do tipo II, obtém-se o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (muito reativo) através da transferência de energia do FS no estado tripleto excitado ( $^3FS^*$ ) para o

estado triplet fundamental do  $O_2$  ( $^3O_2$ ). O  $O_2$  singleto ( $^1O_2$ ) tem tempo de vida curto, sendo assim, ao reagir com o FS, se ele estiver fora da célula alvo (sítio de formação) não será fototóxico. É importante salientar, que a transferência de elétrons é mais lenta que a transferência de energia, o que implica dizer que os mecanismos tipo II são mais favorecidos. Assim, o mecanismo Tipo II é descrito pelas seguintes etapas redox:



O  $O_2$  singleto ( $^1O_2$ ) reage diretamente com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácidos nucleicos, que são os principais constituintes das membranas celulares, alterando a permeabilidade celular, provocando a morte da célula por apoptose ou necrose.

A forma mais direta de detecção do  $O_2$  singleto é através de sua luminescência, em que são baseadas através da emissão do decaimento radiativo do oxigênio singleto, no comprimento de onda de 1270 nm, requerendo, portanto, sistemas altamente sensíveis de detecção. Existem outros métodos, como: ressonância paramagnética eletrônica, calorimetria, fotoionização, espectroscopia de massa, uso de sondas (scavengers) ou uso de métodos químicos que investigam a ação do oxigênio singleto sobre outras substâncias (TOFFOLI, 2008; SOUZA, 2021).

Ainda sobre a figura 3 acima, observa-se que quando o fotossensibilizador no estado tripleto excitado ( $^3FS^*$ ) reage com o  $O_2$ , ele retorna ao estado fundamental não excitado ( $^1FS$ ), esse processo ocorre via processo de relaxação física, conhecido como fluorescência. O cruzamento inter-sistemas que o fotossensibilizador pode passar é quando ele em seu estado singleto excitado ( $^1FS^*$ ), passa por um processo de relaxação vibracional e passa para o estado tripleto excitado ( $^3FS^*$ ), podendo nessa forma interagir com oxigênio presente no meio, voltando consecutivamente para o singleto fundamental ( $^1FS$ ), a esse cruzamento a ação fotodinâmica depende. Os fotossensibilizadores escolhidos precisam ter um alto rendimento quântico nesse cruzamento inter-sistemas, pois só através desse alto rendimento quântico é que ele pode gerar os produtos em cada tipo de mecanismo (FOOTE, 1991; SOUZA, 2021).

Lavoisier ao estudar o processo de combustão, mostrou que a oxidação ocorre com a adição de átomos de oxigênio a um determinado substrato. O oxigênio, de acordo com a teoria do orbital molecular (TOM), possui 2 elétrons desemparelhados

em seu estado fundamental, o que pode ser considerado como um radical livre. Normalmente se associa um radical livre a uma espécie altamente reativa com um curto tempo de meia-vida. No entanto, o fato de o  $O_2$  ter dois elétrons desemparelhados com spins paralelos, isso afeta sua reatividade, desfavorecendo cineticamente os processos redox. Com sorte, isso pode ser mudado com um processo de redução sequencias, que geram outras espécies (Figura 4) (FOOTE, 1991).

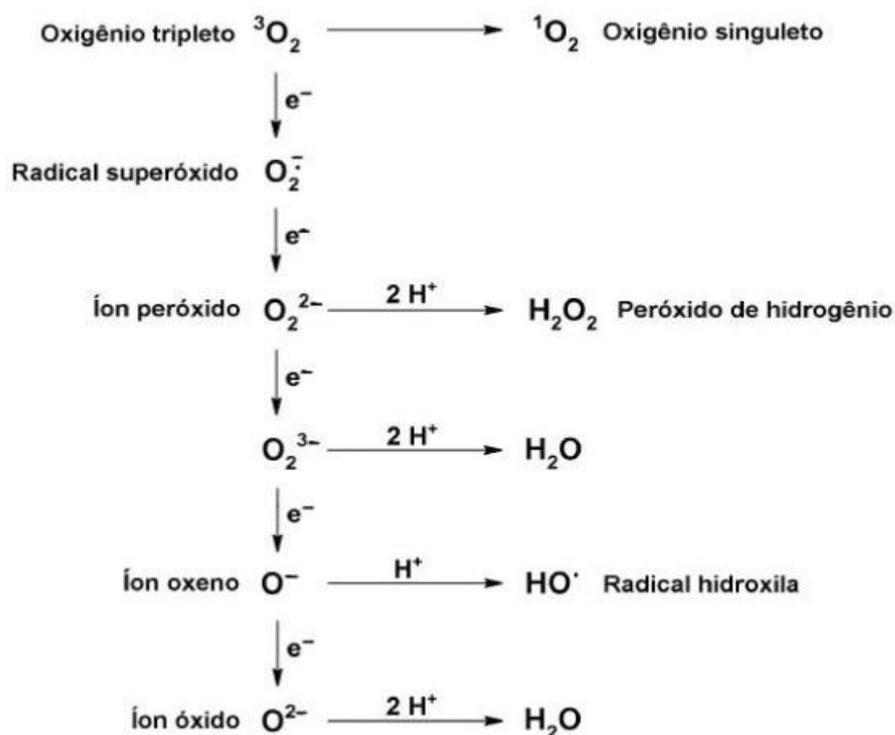


Figura 4: Redução sequencial da molécula do oxigênio e a formação de algumas espécies reativas do oxigênio (FOOTE, 1991).

As EROs desempenham muitos papéis considerados benéficos nos processos biológicos e são essenciais para sobrevivência celular (em baixas ou moderadas concentrações), dentre eles, a regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox, entre outros. Por outro lado, quando em altas concentrações, são muito tóxicas e causam danos conhecidos como estresse oxidativo. Já no caso de ausência ou baixa quantidade de antioxidantes em relação às espécies reativas, esse estresse oxidativo pode causar danos ao DNA, lipídios, proteínas, carboidratos, células, tendo relações intrínsecas com algumas patologias. (FOOTE,1991; SOUZA, 2021).

No tratamento fotodinâmico, o fotossensibilizador precisa ser uma escolha a mais adequada possível, de acordo com o substrato desejado. Para isso, algumas características são necessárias, dentre elas, ser seletivo com o substrato e poder ter um

acúmulo maior na região desejada, possuir características fotofísicas favoráveis, baixa toxicidade na ausência de luz, fotossensibilidade não prolongada, farmacocinética favorável (adequada eliminação do corpo), alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade) e principalmente, baixa agregação em soluções, preferencialmente aquosas/biológicas (SOUZA, 2021; 2022).

Compreender a eficiência de um fotossensibilizador é também importante, tendo em vista que, como agente terapêutico, está associado à solubilidade, pH, seletividade, parâmetros fotofísicos, absorção de luz, toxicidade e estabilidade. Geralmente, ele precisa ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células. Em termos de seletividades, sua carga é regulada na interação com as células, podendo ele ser catiônico ou aniônico. Neste caso, ressalta-se que, normalmente, as membranas possuem cargas negativas, favorecendo assim os FSs catiônicos (SOUZA, 2021).

É desejável também que o FS seja cinética e termodinamicamente estável e que sua obtenção sintética seja rápida, conveniente e de alto rendimento (MUSSI, 2003; SOUZA, 2021). Destaca-se neste caso as porfirinas, que se encaixam bem em vários desses requisitos.

A duração e a ação terapêutica do fotossensibilizador no organismo depende diretamente da via de administração e do padrão de distribuição do mesmo. É certo que a via de administração principal optada será sempre a direta no local desejado para sua ação, visando uma maior eficácia farmacológica, como também diminui a dose necessária para a obtenção do efeito desejado, além de atenuar a toxicidade do ativo (CERIZE, 2012).

Essa estratégia para tecidos/células mais superficiais são as mais convenientes. No entanto, quando se trata de algo mais interno, processos como penetração, permeação, absorção e distribuição pelo organismo ou em parte dele, precisam ser levados em consideração (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000; SOUZA, 2021; 2022). Alguns estudos apresentam os cremes, géis, pastas e pomadas ou ainda emulsões, lipossomas, suspensões e sistemas transdérmicos, como possíveis alternativas para esse fim, visto que possuem maior facilidade de penetração e permite remoção completa pós-tratamento.

O uso da luz nesse tratamento é um ponto muito interessante, visto que, não atua apenas no processo de excitação do fotossensibilizador, mas pode promover uma série de benefícios para uma rápida recuperação das regiões lesionadas através da

fotoestimulação, que consiste nas células vizinhas às lesionadas, células saudáveis, serem estimuladas a se reproduzirem e recuperar a área lesionada mais rapidamente.

Atualmente, a TFD é utilizada em diversas situações a exemplo da dermatologia, oncologia, odontologia e oftalmologia. Pode ser usada para tratamentos combinados também, visto que ela é menos agressiva e traz menos danos colaterais quando comparadas à cirurgia, quimioterapia e radioterapia, e nisso encontra-se seu sucesso, que relaciona-se a diversos fatores como a afinidade dos FS ao alvo biológico, a baixa toxicidade para organismo no escuro, desprezíveis efeitos sistêmicos, inexistência de mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos, bem como a preservação da função orgânica das células, dentre outros (AGOSTINIS et al., 2011).

Como dito anteriormente, o primeiro FS a ser aprovado pela FDA para o tratamento de câncer através da TFD, foi um derivado de hematoporfirina (Photofrin<sup>®</sup>). Devido às suas características fotofísicas adequadas para o uso em TFD e por constituir boa parte dos fármacos empregadas nesta terapia, o estudo das porfirinas se configura como sendo relevante para a compreensão do tema (SOUZA, 2021).

### 2.3. Porfirinas e Metaloporfirinas

As porfirinas fazem parte de uma classe de moléculas orgânicas que detém uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrólicos), ligados por ligações metínicas (=CH-), possuindo um espaço central que pode acomodar um íon metálico (Figura 5). Esse macrociclo pirrólico das porfirinas é muito comum em diversos setores, como no petróleo (porfirinas de níquel ou vanádio), na hemoglobina (contendo ferro no espaço central), na clorofila (contendo magnésio) e dentre muitos outros (COOK et al., 2017).

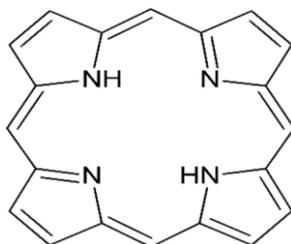


Figura 5: Macrociclo de uma porfirina (COOK et al., 2017).

Tais compostos também são considerados aromáticos por obedecerem à regra de Hückel ( $4n + 2 =$  número de elétrons  $\pi$ ), possuindo assim 22 elétrons que participam das ligações  $\pi$  (COOK et al., 2017), conferindo aromaticidade à estrutura. Esse sistema conjugado permite a porfirina apresentar uma forte absorção na região do visível,

absorvendo comprimentos de onda próximo dos 410 nm, e apresentando cor púrpura típica (COOK et al., 2017).

As transições eletrônicas que ocorrem ( $\pi^* \leftarrow \pi$ ) na porfirina base livre ocorrem na faixa do visível e ultravioleta, podendo apresentar um conjunto de cinco bandas, em que, a mais intensa é chamada de *Soret* ou B (absortividade molar de  $\sim 10^5$  L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), possuindo um máximo de absorção por volta de 400 nm, e as outras quatro bandas Q, que possuem um máximo de absorção nas regiões entre 500 e 700 nm (COOK et al., 2017; SOUZA, 2021).

As porfirinas desempenham papéis importantes na biologia, como pigmento de transporte de oxigênio, citocromos para oxidação seletiva de diversos substratos facilitando sua excreção, e aplicações nas áreas de medicina, nanotecnologia, transferência de energia, catálise, meio ambiente e entre outras (COOK et al., 2017).

As porfirinas reagem, normalmente, com íons metálicos e podem conter substituintes tanto nas posições  $\beta$ -pirrólicas (posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 do anel) ou posições *meso* (posições 5, 10, 15 e 20 do anel) (COOK et al., 2017) (Figura 6).

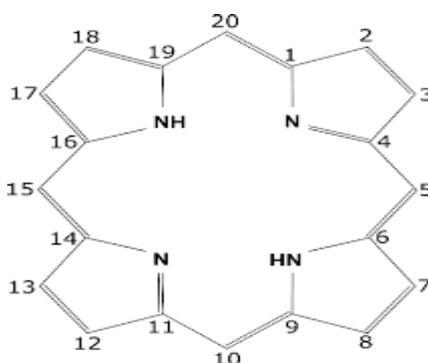


Figura 6: Substituintes Meso e  $\beta$ -pirrólicos (COOK et al., 2017).

As porfirinas têm a capacidade de se complexar a íons metálicos com vários estados de oxidação, comportando-se como compostos de coordenação e dando origem às metaloporfirinas. Nestas espécies o íon se liga diretamente ao quatro nitrogênios da cavidade tetrapirrólica. (COOK et al., 2017). Neste processo, os prótons ligados aos dois nitrogênios no centro da porfirina são removidos, tornando o nitrogênio suscetível ao ataque do íon. Ao formar o composto de coordenação, as porfirinas atuam como um composto quelato macrocíclico tetradentado. As porfirinas que não possuem o íon metálico em seu centro, são chamados também de porfirinas de base-livre (COOK et al., 2017).

A inserção de um íon metálico influencia diretamente nas propriedades

espectroscópicas da porfirina, sendo observado, tipicamente, um deslocamento da banda de *Soret* e o desaparecimento de duas bandas Q. A metalação também promove uma mudança de simetria local, sendo a base-livre  $D_{2h}$  e a metaloporfirina  $D_{4h}$ , levando a uma diminuição do número de transições eletrônicas e, portanto, a uma redução no número de bandas Q. A presença de um metal também pode gerar uma perturbação do sistema  $\pi$  conjugado, causando distorções na planaridade da mesma em função do grau de liberdade que esses substituintes ficam na molécula, sendo essa perturbação maior, quando acontece com cátions volumosos e pesados, como o Pb(II) (COOK et al., 2017).

A compatibilidade do tamanho da cavidade da porfirina (onde o íon metálico se coordena) e o raio iônico do metal é o fator determinante que faz com que uma metaloporfirina seja estável, sendo que, essa estabilidade pode diminuir se o raio for maior ou muito menor que a cavidade da porfirina. Esse metal pode ser encontrado ou no plano da cavidade ou sobre ele, o que causa também distorções na planaridade da molécula, pois, o tamanho do substituinte afeta diretamente na estrutura e nas propriedades espectroscópicas, como já dito (COOK et al., 2017). As metaloporfirinas da primeira série de transição possuem um alto grau de estabilidade termodinâmica, devido à presença de um ligante tetradentado e ao sistema aromático ressonante.

As metaloporfirinas podem ser classificadas, do ponto de vista puramente espectroscópico, como regular ou irregular. O tipo regular é caracterizado pela mínima perturbação dos elétrons do metal, sendo assim, as propriedades óticas são determinadas pelos elétrons  $\pi$  do anel. Para esse tipo, os metais característicos são aquelas de valência única, ou seja, que não possui outros estados de oxidação. Já o tipo irregular é caracterizado pelos metais que possuem mais de uma valência, principalmente aqueles que possuem subníveis d ou f semipreenchidos; nesse caso, as propriedades da porfirinas são definidos pela interação do metal e dos elétrons  $\pi$  do anel (COOK et al., 2017).

Existem alguns métodos clássicos que permitem a formação de porfirinas sintéticas de grande interesse para várias áreas da ciência. O método mais comum para preparar porfirinas *meso*-aril substituídas (como a *meso*-tetrafenilporfirina) consiste em refluxar pirrol e um aldeído em meio aeróbio em ácido acético ou propiônico (Figura 7).

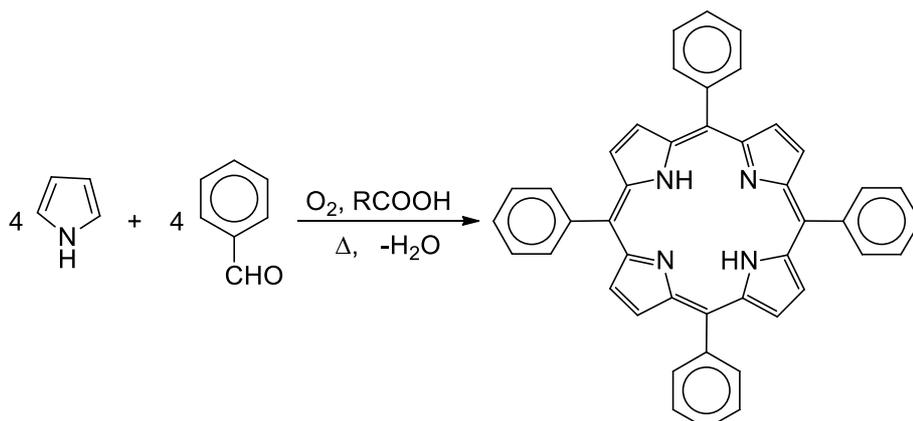


Figura 7: Síntese da *meso*-tetrafenilporfirina pelo método de Adler-Longo. (ROTHERMUND, 1936).

Para síntese de metaloporfirinas, por sua vez, rege-se a porfirina e o sal do metal divalente sob refluxo em um solvente adequado, a depender da solubilidade dos reagentes envolvidos (COOK et al., 2017).

A caracterização dessas porfirinas e metaloporfirinas ocorre inicialmente por meio da espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-Vis, devido às absorções típicas do cromóforo (anel porfirínico). A figura 8 apresenta um espectro típico de uma porfirina base livre e de uma metaloporfirina.

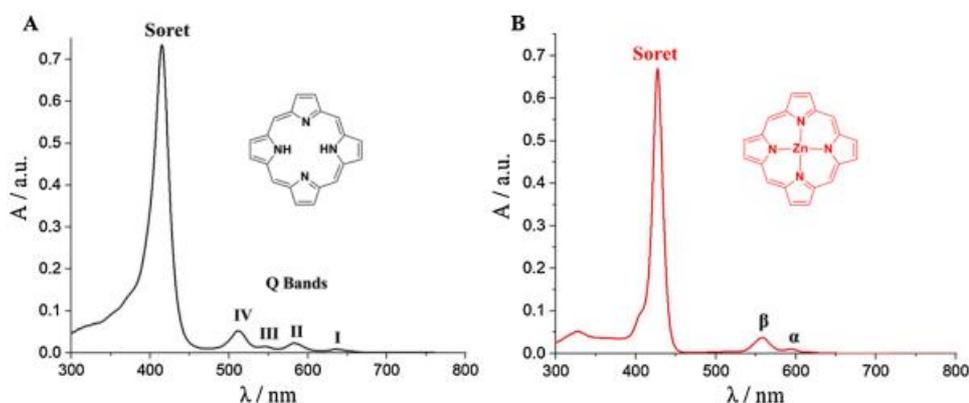


Figura 8: Espectro Característico das Porfirinas e Metaloporfirinas (SOUZA, 2021).

Observa-se que na figura 8 que o espectro revela quatro bandas Q na região do visível, enquanto na metaloporfirina (figura 8-B) há apenas duas bandas nesta região. Isso pode ser explicado através de alguns modelos teóricos e experimentais, que mostram que, após a metalação a metaloporfirina apresenta maior simetria quando comparada à simetria de base livre, reduzindo assim o número de bandas no visível para duas bandas apenas. (COOK et al., 2017; SOUZA, 2021).

A caracterização das porfirinas pode ocorrer também por meio da fluorescência vermelho-laranja apresentada normalmente pelas porfirinas base livre ao serem

observadas sob luz UV de comprimento de onda longo (aproximadamente 350 nm). Quando metaladas com metais de camada aberta, observa-se a perda dessa fluorescência característica. Em 1935, J. Haurowitz, citado por Allison, apontou que as porfirinas quando complexadas com íons diamagnéticos, como Zn(II), mantém essa fluorescência. Sendo assim, durante a reação de metalação com metais de camada aberta, o monitoramento da fluorescência é imprescindível, tendo a de base livre de partida uma fluorescência bem viva, enquanto a metalada não (BENOV et al., 2002).

#### **2.4. Zinco Porphirinas e a terapia fotodinâmica.**

As porfirinas e derivados são um dos principais fotossensibilizadores existentes na Terapia Fotodinâmica. A interação do FS com o O<sub>2</sub> não tem alvos biomoleculares específicos e, portanto, pouca seletividade, o que faz com que a célula alvo tenha pouca probabilidade de desenvolver alguma mutação genética e se torne multirresistente (SOUZA, 2021; 2022).

Historicamente, Casteel foi o primeiro a testar a eficácia das porfirinas nas inativações de patógenos humanos, exemplo da Hepatite A, obtendo 99,9% de eficácia mostrando que o método pode ser uma abordagem efetiva e segura de remoção de vírus não envelopados em meios aquosos (PERUSSI, 2007). Sobre isso, Moura 2011 afirma que para que a inativação tenha boa eficácia, o conhecimento do patógeno (vírus, bactéria ou fungo) é necessário, pois, cada um reage de uma forma a técnica.

As metaloporfirinas hidrossolúveis de Zn(II) derivadas das *meso*-tetraquis(2-*N*-alquilpiridínio)porfirinas, ZnT<sub>alquil</sub>-2-PyP<sup>4+</sup>, com o grupo alquil variando geralmente entre metil (ZnTM-2-PyP<sup>4+</sup>) e n-hexil (ZnT<sub>nHex</sub>-2-PyP<sup>4+</sup>), são importantes agentes terapêuticos (Figura 9).

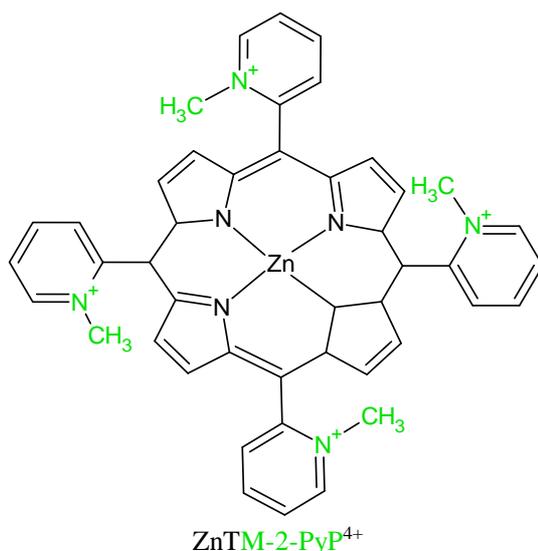


Figura 9: Zn(II) *meso*-tetrakis (N-metilpiridínio-2-il) porfirina (ZnTM-2-PyP<sup>4+</sup>)  
(MENDES, 2015)

As Zn(II)-porfirinas (ZnPs) tem ganhado destaques como FS na área da inativação, pois, sua eficiência fotodinâmica está associada a fatores como lipofilia, caráter eletrostático das porfirinas e presença do zinco no macrociclo. As propriedades fotoluminescentes e de biodisponibilidade de Zn-porfirinas têm resultado em efeitos antimicrobianos de grande destaque, notavelmente nos compostos catiônicos ou com grupos retiradores de elétrons, como halogênios (BAYONA et al., 2016; DĄBROWSKI et al., 2007; SOUZA 2021; 2022).

Essa classe de porfirinas possui características intrínsecas que a tornam potenciais terapêuticos para a inativação fotodinâmica, dentre elas:

- Baixa toxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* no escuro;
- Alta eficiência para geração intracelular de espécies reativas de oxigênio;
- Elevados rendimentos quânticos para geração de oxigênio singlete;
- Versatilidade estrutural que permite o desenho de fotossensibilizadores anfífilos, permitindo boa solubilidade no meio biológico, biodisponibilidade e interação com estruturas celulares.

A escolha do zinco se explica por ele aumentar a estabilidade química da porfirina e potencializar sua interação com membranas celulares, além de possuir maior rendimento quântico (facilitando assim o cruzamento intersistemas), apresentar longo tempo de vida do estado tripleto, e se configurar como um componente natural do corpo humano, facilitando sua interação (SOUZA, 2021).

As reações do tipo I e II da terapia fotodinâmica não são diferentes para as ZnPs.

Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente, dependendo do tipo de FS (ZnP) utilizado, suas concentrações, distribuição/localização subcelular, as biomoléculas próximas, os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido no meio, a constante dielétrica do tecido e o pH, dentre outros fatores (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; HAMBLIN, 2016; KWIATKOWSKI et al., 2018). Em vias gerais, as contribuições relativas das vias de Tipo I ou Tipo II nos processos fotodinâmicos mediados pelas ZnPs possui poucos estudos (SOUZA, 2021).

A planejamento das estruturas das ZnPs consiste, de modo geral, em sistemas contendo 4 substituintes idênticos no anel porfirínico, usualmente chamado de sistema A<sub>4</sub>. Sistemas A<sub>3</sub>B são poucos utilizados devido aos desafios de sua síntese e purificação (Figura 10):

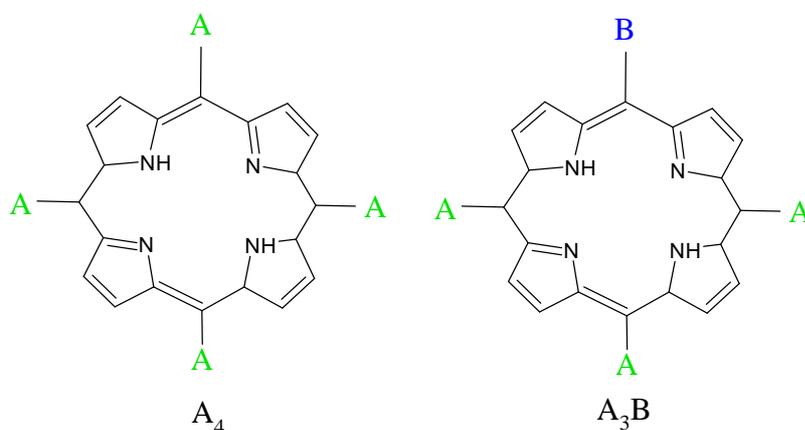


Figura 10: Representação de porfirinas *meso*-substituídas do tipo [A<sub>4</sub>] e [A<sub>3</sub>B].

A inserção de Zn(II) nos isômeros das *N*-metilpiridínioporfirinas resultou nas ZnPs catiônicas hidrossolúveis ZnTM-2-PyP<sup>4+</sup>, ZnTM-3-PyP<sup>4+</sup> e ZnTM-4-PyP<sup>4+</sup>, aumentando a vida útil do estado tripleto em relação às bases livres correspondentes. Sabe-se que a capacidade do FS de induzir a produção de EROs está relacionada ao longo tempo de vida do estado tripleto, característica de porfirinas com metais diamagnéticos, como o Zn (II) (ESPITIA-ALMEIDA et al., 2020). Kalyanasundaram (1984) em seu estudo a respeito da presença de Zn(II) nas porfirinas catiônicas, relatou que os tempos de vida do estado tripleto para as *N*-metilpiridínioporfirinas estão na faixa de 1,16, 0,39 e 0,17 ms para os isômeros 2-,3 e 4-*N*-metilpiridínioporfirinas, ZnTM-X-PyP<sup>4+</sup>, (X = 2, 3, ou 4), respectivamente.

Os estudos realizados por Gyulkhanyan et al (2009) enfatizam o fato de que o aumento da cadeia lateral resulta em um aumento da lipofilia do composto. Um outro estudo, realizado por Korchenova e colaboradores (2016), mostrou a eficiência das ZnPs como fotossensibilizadores para inibir o crescimento das bactérias

*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Escherichia coli* e *Staphylococcus simulans*.

Thomas e colaboradores (2015) realizaram um estudo sistemático de uma série de ZnPs à base de ZnTalquil-2-PyP<sup>4+</sup>, usando a bactéria *E. coli* como modelo experimental, e observaram que o aumento da cadeia alquila lateral aumentou a lipofilia do sistema, sendo a ZnTnHex-2-PyP<sup>4+</sup> o FS biodisponível mais eficiente, enquanto o seu análogo, n-octil, ZnTnOct-2-PyP<sup>4+</sup>, demonstrou ser tóxico no escuro (THOMAS et al., 2015), o que limita sua aplicação como FS.

Além da eficiência em bactérias, existem diversos estudos que comprovam o uso das ZnPs como FS para inativação de vírus de forma bem efetiva. No que diz respeito a Inativação Fotodinâmicas de Vírus Envelopados, o direcionamento do envelope causa o processo de fusão entre o vírus e a membrana da célula hospedeira. Com isso, as ZnPs se apresentam como importante FS na inativação, devido à sua carga e hidrofília ajustável, permitindo melhores interações com o envelope viral, acentuando o dano oxidativo e/ou levar danos a membrana até destruir a célula (JM SONG, 2010; F. VIGANT, 2010; I. STOJILJKOVIC *et. al.* 2001; SOUZA, 2021; 2022).

Um estudo feito por Teles et al (2018) avaliou a inativação fotodinâmica do herpesvírus bovino tipo I, usando algumas porfirinas, na concentração de 5 µmol/L, em que, após 120 min de radiação, o vírus foi completamente inativado, sendo que a ZnTM-4-PyP<sup>4+</sup> resultou em maior inativação, e, por ela ser uma porfirina catiônica, a sua carga positiva possibilitou uma melhor interação com o envelope viral. Concluiu-se, portanto, que as porfirinas catiônicas, em específico as ZnPs, são mais propensas a induzir fotodano às glicoproteínas virais.

Ainda no mesmo estudo, os resultados obtidos mostraram a ZnP ZnTM-4-PyP<sup>4+</sup> levou tanto a uma maior inativação, como também a uma diminuição no tempo necessário para inativação. Adicionalmente, os pesquisadores notaram que as ZnPs conseguiram degradar totalmente o DNA viral, mostrando que a presença do Zn(II) e a carga catiônica do FS facilitaram a interação eletrostática com o DNA plasmidial, impossibilitando a sua replicação.

Normalmente, um vírus de fita de RNA positiva (também conhecidos como nidovírus, na qual, o coronavírus está incluso), possui um RNA-dependente RNA-polimerase (RdRp) que funciona como enzima central de sua síntese de RNA, o qual, quando associado a uma membrana, começa o processo de replicação. Velthuis et. al.

(2010), reporta que o aumento da concentração de  $Zn^{2+}$  é eficiente para inibir a replicação viral, mostrando inclusive que o  $Zn^{2+}$  inibiu a atividade SARS-CoV RdRp também durante a fase de alongamento da síntese de RNA. Todos os resultados obtidos foram *in vitro*.

Amit Kumar et. al. 2020, aponta que a deficiência de  $Zn^{2+}$  está relacionada na literatura com o aumento da suscetibilidade de adquirir infecções virais. Seu estudo se baseou numa suplementação a base de zinco, e mostrou que em doses terapêuticas suficientes tem o potencial de restaurar a função celular imune esgotada ou de melhorar a função celular imune normal. Também pode atuar de maneira sinérgica quando co-administrado com terapia antiviral padrão. Baseando-se nisso, o SARS-CoV tem 95% de similaridade de sequência com a da SARS-CoV, permitindo a hipótese que o  $Zn^{2+}$  e as ZnPs sejam um potencial inibidor do COVID-19 (KUMAR et. al. 2020).

A síntese das ZnPs pode ser exemplificada com porfirinas *meso* substituídas do tipo  $ZnA_4$  (neutras ou carregadas), em que os grupos *meso* são idênticos; são as ZnPs mais comuns. No caso das Zn(II) 2-*N*-alquilpiridínioporfirinas ( $ZnT$ alquil-2-PyP<sup>4+</sup>), existem duas rotas que viabilizam as suas sínteses (Figura 11):

(i) Rota clássica, descrita na literatura (BATINIĆ-HABERLE et al., 2002; BENOVA et al., 2002; EZZEDDINE et al., 2013) e que consiste na *N*-alquilação da base livre neutra, seguida da metalacção com Zn(II);

(ii) Utilizando uma Rota alternativa (Figura 11), desenvolvida por Viana et al. (2015) e expandida por Sarmiento-Neto (2021), em que a base livre neutra é primeiramente metalada com Zn(II) e, em seguida, *N*-alquilada.



Figura 11: Esquema geral de síntese das Zn-porfirinas pela Rota Alternativa (VIANA et al., 2015).

O presente trabalho consiste em revisar as sínteses, purificação e caracterizações da porfirina catiônica do tipo  $[ZnA_3B]^{3+}$ ,  $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$

(Figura 11), a partir de uma rota definida por Sarmiento-Neto (2021), como um novo candidato a FS para inibição fotodinâmica antimicrobiana (aPDI). Esta ZnP  $[ZnA_3B]^{3+}$  (onde A = 2-N-metilpiridínio, B = O-metilvanilina), é o protótipo N-metilado nos grupos 2-piridila (2-Py) e O-metilado no grupo vanilina (MVan). Sua escolha foi devido às propriedades fotoquímicas das Zn(II) 2-N-alquilpiridínioporfirinas, aliadas ao aumento da lipofilia resultante da troca de um grupo catiônico 2-N-metilpiridínio (A) do sistema  $A_4$  por um grupo neutro metilvanilina (B) no sistema  $A_3B$ :

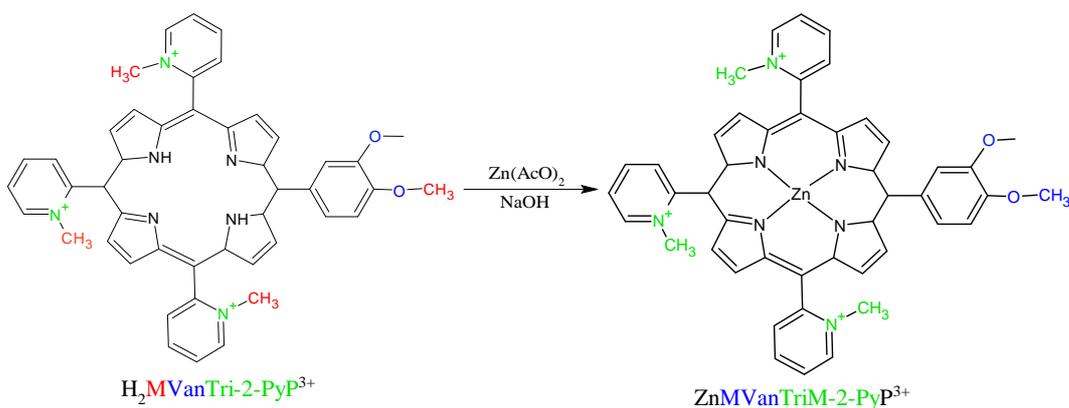


Figura 12: Estrutura da  $ZnTM-2-PyP^{4+}$ , ZnP do tipo  $[ZnA_4]^{4+}$  que foi modelo estrutural para a ZnP do tipo  $[ZnA_3B]^{3+}$ , a  $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$  (VIANA et al., 2015).

### 3. METODOLOGIA

Toda a metodologia desta dissertação foi baseada na tese de doutorado “Desenvolvimento de mímicos das enzimas superóxido dismutases (SOD) e fotossensibilizadores à base de metaloporfirinas hidrossolúveis do tipo  $[A_3B]^{3+}$  ou  $[A_4]^{4+}$  (A = 2-N-alquilpiridínio; B = vanilina ou O-alquilvanilina)” de autoria de José Ferreira Sarmiento Neto (2021), da qual se reproduziu experimentalmente na presente dissertação as etapas experimentais inerente à síntese da  $ZnMVanTri-2-PyP^{3+}$ .

#### 3.1. Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes, solventes e adsorventes que foram usados, sem purificação adicional:

Reagente e solvente	Marca
Alumina neutra para cromatografia em camada delgada (CCD) sem indicador de fluorescência	Merck

Sílica-gel para CCD sem indicador de fluorescência	Merck
Alumina neutra (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
2-piridinacarboxaldeído 99% (2-PyCHO)	Sigma-Aldrich
Pirrol 98%	Sigma-Aldrich
Veratraldeído 98%	Sigma-Aldrich
Acetato de zinco(II) diidratado ≥98% (Zn(OAc) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
Cloreto de tosila 98% (TsCl)	Sigma-Aldrich
Cloreto de N-trioctilmetilamônio (Aliquat 336)	Sigma-Aldrich
Hexafluorofosfato de amônio ≥95% (NH <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> )	Sigma-Aldrich
Acetona >99%	Tedia
Clorofórmio >99% (CHCl <sub>3</sub> )	Tedia
Diclorometano <99% (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Tedia
Metanol >99% (MeOH)	Tedia
N,N-dimetilformamida >99% (DMF)	Tedia
Éter etílico >99% (Et <sub>2</sub> O)	Tedia
Diclorometano	Tedia
Bicarbonato de sódio 99% (NaHCO <sub>3</sub> )	Vetec
Cloreto de sódio 99% (NaCl)	Vetec
Hidróxido de sódio 99% (NaOH)	Vetec
Iso-Propanol 98% (i-PrOH)	Dinâmica

Tabela 1: Reagentes, Solventes e Adsorventes utilizados.

### 3.2. Análises e Equipamentos

#### 3.2.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

As análises realizadas em CCD foram realizadas em placas cromatográficas comerciais de sílica-gel prensadas em alumínio (Sigma-Aldrich ou Silicyele), sem indicador de fluorescência (STAHL, 1969; TOUCHSTONE, 1978).

#### 3.2.2 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-vis

As medidas realizadas no UV-vis, foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu

(modelo UV- 1800) com resolução de 0,5 nm, utilizando cubetas de quartzo ou vidro com 1 cm de caminho óptico. Os solventes utilizados nas medidas foram acetona, água e tampão borato.

### 3.2.3 *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN)*

As análises de RMN de <sup>1</sup>H da porfirina base-livre e zinco(II)-porfirina foi utilizado o solvente d<sup>6</sup>-DMSO. Os espectros foram adquiridos do aparelho da marca VARIAN Mercury operando a 500 MHz. O local de aquisição foi o LMCA - Laboratório Multiusuário de caracterização e Análises.

### 3.3 *Síntese do MeOTs (Tosilato de Metila)*

Neste trabalho foi utilizado Tosilato de Metila (MeOTs), sintetizado a partir de adaptação da literatura (GUAN et al., 2010). A reação se deu com a adição de 60 mL de metanol á um balão de fundo redondo contendo 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 9,5 mL de solução aquosa concentrada de NaOH (~10 mol.L<sup>-1</sup>). Aguardados 10 minutos para reestabelecimento da temperatura baixa referente ao banho de gelo, adicionou-se lentamente 18g (0,095 mols) de cloreto de tosilato.

O MeOTs foi purificado por extração líquido-líquido com HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> (2 × 10 mL) para neutralizar o sistema básico, após 3h de reação. As extrações continuaram com água destilada(3 × 10 mL), NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (3 × 10 mL) e uma solução saturada de NaCl (2 × 10 mL). A fase orgânica final foi recolhida, tratada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente eliminado em evaporador rotatório (GUAN et al., 2010).

### 3.4 *Síntese de porfirinas*

Em geral, a síntese de porfirinas do tipo A<sub>3</sub>B (onde A = 2-piridil e B = vanilina ou Oalquilvanilina) são realizadas a partir da condensação de pirrol e os aldeídos 2-piridinacarboxaldeído e R-vanilina, utilizando a relação estequiométrica de 3:1 entre os aldeídos, reportado anteriormente (SARMENTO-NETO, 2016).

### 3.4.1 Síntese da 5-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina ( $H_2VanTri-2-PyP$ ).

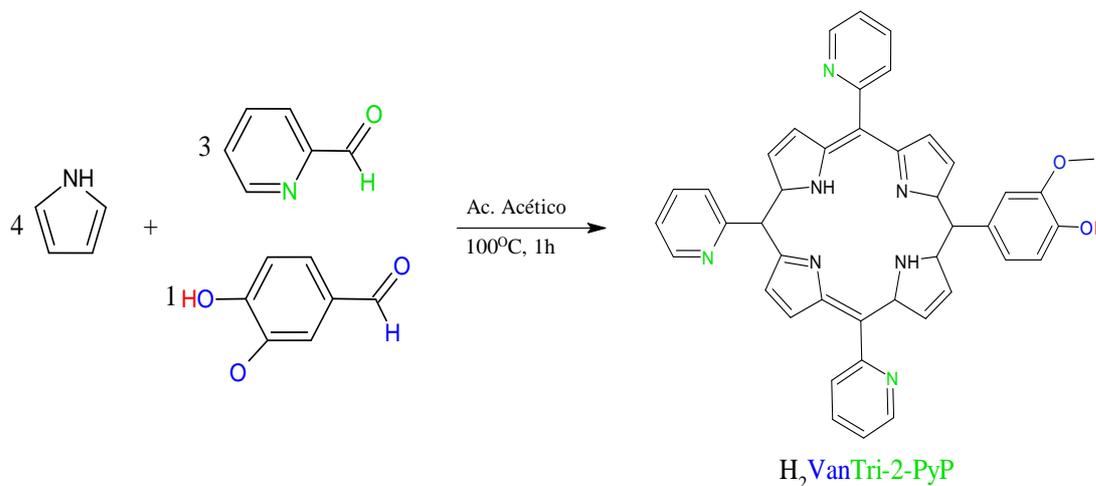


Figura 13: Síntese da porfirina base-livre ( $H_2VanTri-2-PyP$ )

Os procedimentos para síntese da porfirina base-livre,  $H_2VanTri-2-PyP$ , 5-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-10,15,20-tris(2-piridil)porfirina, consistiu na adaptação do método de Adler e Longo (ALDER et al., 1964), por meio da condensação do pirrol com 2-piridinacarboxaldeído e vanilina (*O*-alquilvanilina), sob refluxo em ácido acético, sendo este o catalisador da reação. Essa reação pode resultar em uma mistura de até seis meso-tetraarilporfirinas do tipo  $A_4$ ,  $A_3B$ , *cis*- $A_2B_2$ , *trans*- $A_2B_2$ ,  $AB_3$  e  $B_4$ , onde A e B representam, respectivamente, os grupos 2-piridil e vanilina/*O*-alquilvanilina.

Essa síntese foi realizada em um balão de fundo redondo, que continha 40 mL de ácido acético, previamente aquecido até estabelecer um equilíbrio térmico de 100°C, e ao estabelecer, foi adicionado a *R*-vanilina (2,5 mmol). Conseqüente, foram adicionados 713  $\mu$ L (7,5 mmol) de 2-piridinacarboxaldeído e, na seqüência, 700  $\mu$ L (10 mmol) de pirrol, lentamente.

Em seguida, esperou o sistema resfriar por 1h, até a temperatura ambiente, e, dilui-se em água. Foram feitos ajustes na acidez com uma solução de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) até pH 3,2, utilizando cerca de 80 mL, e ao atingir o pH esperado, foi observado a formação de um precipitado, denominado de “porfirina bruta”.

Após a precipitação, o sistema foi resfriado por mais 2 horas, e, lavado com água (3  $\times$  100 mL), solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (3  $\times$  25 mL) e, por último, água novamente (3  $\times$  100 mL), consecutivamente, levado a estufa para ser secado a 60°C por 12h.

Essa “porfirina bruta” foi submetida a um processo de purificação, através da

extração sólido-líquido com alíquotas de  $\text{CHCl}_3$  ( $8 \times 10 \text{ mL}$ ), sendo o sistema filtrado após cada uma delas. O sólido resultante foi dissolvido em  $\text{CHCl}_3$  (20 mL) e a esta solução foram adicionados, nesta ordem, 20 mL de acetato de etila e 15 mL de hexano, resultando em uma mistura ternária  $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}:\text{Hex}$  (4:4:3, v/v/v) e levando à formação de um precipitado preto, o qual foi filtrado, lavado com a mesma mistura ternária, sendo os sobrenadantes violetas e as soluções ternárias, retirados em evaporador rotatório. Ela foi caracterizada por cromatografia em camada delgada em sílica ( $\text{CCD-SiO}_2$ ) e UV-vis (rendimento: 3%).

CCD-SiO<sub>2</sub> ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeCN}$ , 1:1 v/v):  $R_f = 0,40$ .

UV-vis (acetona):  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ : 415 (Soret), 517, 545, 586, 644.

### 3.4.2. Síntese da cloreto de 5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirina ( $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyPCL}_3$ )

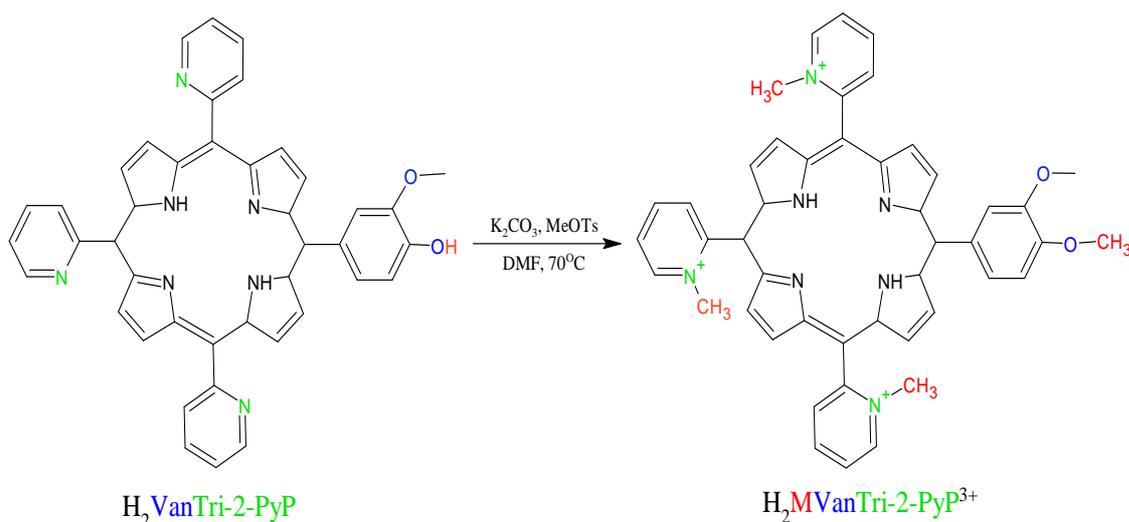


Figura 14: Síntese da Porfirina Catiônica ( $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyPCL}_3$ ) (FERREIRA, 2016).

A um balão de fundo redondo foram adicionados 5 mg (0,0075 mmol) da correspondente porfirina neutra  $\text{H}_2\text{VanTri-2-PyP}$  e dissolvidos em 0,5 mL de DMF. Após 5 minutos, foram adicionados 171  $\mu\text{L}$  de tosilato de metila (MeOTs; 1,125 mmol;  $\text{MM} = 186,23 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $d = 1,234 \text{ g mL}^{-1}$ ), de modo que relação molar tosilato:porfirina fosse de 150:1. Ao balão, foi conectado um condensador e mantendo o sistema sob agitação constante a  $70^\circ\text{C}$ . O progresso da reação foi monitorado por  $\text{CCD-SiO}_2$  (eluente  $\text{KNO}_3(\text{aq, sat}):\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ , 1:1:8 v/v;  $R_f = 0,25$ ) e espectroscopia de absorção UV-vis (em água destilada). Passados 8h de reação, o sistema foi resfriado e adicionado  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 mL), levando a precipitação de um material pastoso. O solvente DMF foi retirado e esse material lavado mais duas vezes em porções de 2 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$ .

Após eliminação do solvente, o material foi dissolvido em H<sub>2</sub>O e a porfirina foi precipitada na forma de sal de PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, na forma de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (3 mol L<sup>-1</sup>). O sólido obtido foi dissolvido em um funil de placa sinterizada e secado na estufa a 50 °C. Ao ser resfriada, a porfirina catiônica foi imediatamente dissolvida em acetona, filtrada em um funil de placa sinterizada e precipitada na forma de sal de Cl<sup>-</sup>, Aliquat 336 (cloreto de *N*- trioctilmetilamônio) gota a gota. O sólido resultante foi lavado com acetona e levado a estufa a 50 °C por 2 horas, sendo repetidos esse processo visando uma maior pureza.

A alquilação do OH da vanilina foi investigada por CCD-SiO<sub>2</sub> (eluente KNO<sub>3</sub>(aq, sat):NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>:MeCN, 1:1:2 v/v/v) e UV-vis (em tampão borato pH ~ 9,3).

CCD-SiO<sub>2</sub> (KNO<sub>3</sub>(sat):H<sub>2</sub>O:MeCN, 1:1:8 v/v/v): R<sub>f</sub> = 0,25.

UV-vis (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub>/nm (log ε/L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): H<sub>2</sub>O: 264 (4,28), **417 (Soret; 5,23)**, 517 (4,17),

583 (3,83), 635 (3,29).

RMN de <sup>1</sup>H: (500 MHz; d<sup>6</sup>-DMSO; TMS): δ 9,73 (d largo, 3H, H<sup>3</sup>-Piridil), 9,25-9,10 (m, 6H, H<sup>β</sup>-pirrol), 9,10-9,01 (5H, H<sup>δ</sup>-piridil + H<sup>β</sup>-pirrol) 9,01-8,82 (m, 3H, H<sup>ε</sup>-piridil) 8,74 (t, 3H, H<sup>δ</sup>-piridil), 7,90-7,65 (m, H<sup>2,5,6</sup>-fenil), 4,24-4,01 (m, 9H, Me-piridil), 3,93 (s, 3H, *m*-OCH<sub>3</sub>), - 2,85 (s, 2H, N-H).

### 3.4.3. Síntese da Cloreto de 5-(3,4-dimetoxifenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-2-il)porfirinatozínco(II) (ZnMVanTriM-2-PyPCL<sub>3</sub>)

A ZnMVanTriM-2-PyPCL<sub>3</sub> foi sintetizada utilizando um procedimento adaptado da ZnTM-2-PyPCL<sub>4</sub> (BENOV *et al.*, 2002). A síntese consistiu na dissolução de 10 mg (0,023 mmol) de H<sub>2</sub>MVAnTriM-2-PyPCL<sub>3</sub> em 1 mL de solução aquosa de NaOH (pH 12,5), ao que se adicionaram, à temperatura ambiente, 50 mg de Zn(AcO<sub>2</sub>)·2H<sub>2</sub>O (0,23 mmol) (Fig. 15).

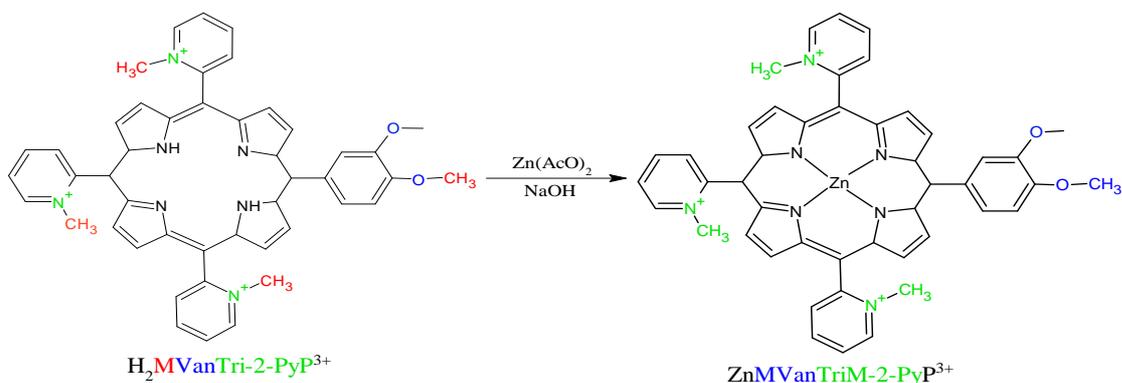


Figura 15: Esquema geral de síntese da Zn-porfirina catiônica ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> (FERREIRA, 2016).

O progresso da reação de metalização foi monitorado por CCD-SiO<sub>2</sub> (KNO<sub>3</sub>(sat):H<sub>2</sub>O:MeCN, 1:1:8 v/v) e espectroscopia de absorção UV-vis. O sistema foi mantido sob agitação por 30 min à temperatura ambiente.

Após o consumo total da base-livre, o sistema foi filtrado em funil de placa sinterizada e a ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> presente no filtrado foi precipitada na forma de sal de PF<sub>6</sub><sup>-</sup> com adição gota a gota de uma solução aquosa de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (3 mol L<sup>-1</sup>). O sólido foi separado por filtração, lavado com Et<sub>2</sub>O e secado em estufa a 50 °C *overnight*.

O sólido foi, então, resfriado e dissolvido em acetona, sendo a ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> precipitada na forma de Cl<sup>-</sup> com adição gota a gota de Aliquat 336. O sólido resultante foi lavado com acetona, secado em estufa a 60 °C por 4 horas e transferido para um dessecador. A massa isolada da ZnMVanTriM-2-PyPCL<sub>3</sub> foi 12 mg (rendimento: 91%).

CCD-SiO<sub>2</sub> (KNO<sub>3</sub>(sat):H<sub>2</sub>O:MeCN, 1:1:8 v/v/v): R<sub>f</sub> = 0,30.

UV-vis (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub>/nm: 322, **428 (Soret)**, 558, 590

RMN de <sup>1</sup>H: (500 MHz; *d*<sup>6</sup>-DMSO; TMS): δ 9,59 (d largo, 3H, H<sup>3</sup>-Piridil), 9,05-8,93 (m, 6H, Hβ-pirrol), 8,93-8,84 (6H, H<sup>6</sup>-piridil + Hβ-pirrol), 8,79-8,76 (m, H<sup>5</sup>-piridil), 8,67 (t, 3H, H<sup>4</sup>-piridil), 7,86-7,20 (m, H<sup>2,5,6</sup>-fenil), 4,05-3,85 (m, 9H, Me-piridil), 4,06 (s, 3 H, *p*-OCH<sub>3</sub>) 3,92 (s, 3H, *m*-OCH<sub>3</sub>).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas 2-*N*-alquilpiridilporfirinas, a quelação de um elemento diamagnético como Zn(II) pelo núcleo de porfirina, para produzir ZnPs, vem comprovadamente acompanhada de melhorias nas propriedades espectroscópicas e fotofísicas, bem como na estabilidade dos derivados da porfirina.

A rota clássica de preparação das Zn-Porfirinas, como aponta a literatura, especificamente a ZnTalquil-2-PyP<sup>4+</sup> (alquil = metil, etil, n-hexil etc.), segue um modelo que envolve (i) a alquilação da porfirina de base-livre H<sub>2</sub>T-2-PyP, com o correspondente tosilato de alquila para isolamento, das bases-livres catiônicas correspondentes, seguido (ii) da metalização (inserção de Zn) na porfirina alquilada tetracatiônica (BENOV et al., 2002).

##### 4.1. Porfirinas do tipo A<sub>3</sub>B x A<sub>4</sub>

Normalmente, os estudos envolvendo Zn(II)-porfirina descritos na literatura são com os sistemas ZnA<sub>4</sub> e [ZnA<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>, em que os substituintes *meso* são todos

idênticos. Ainda, que escassos, os estudos envolvendo os sistemas  $ZnA_3B$  e  $[ZnA_3B]^{3+}$ , têm resultado em bons fotossensibilizadores para a inativação fotodinâmica, a exemplo da meso-tetraquis(N-metilpiridínio-4-il)porfirina ( $H_2TM-4-PyP^{4+}$ ) e meso-tetraquis(N,N,N-trimetilanilínio-4-il)porfirina ( $H_2TTriMAP^{4+}$ ), inativando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOUZA, 2021).

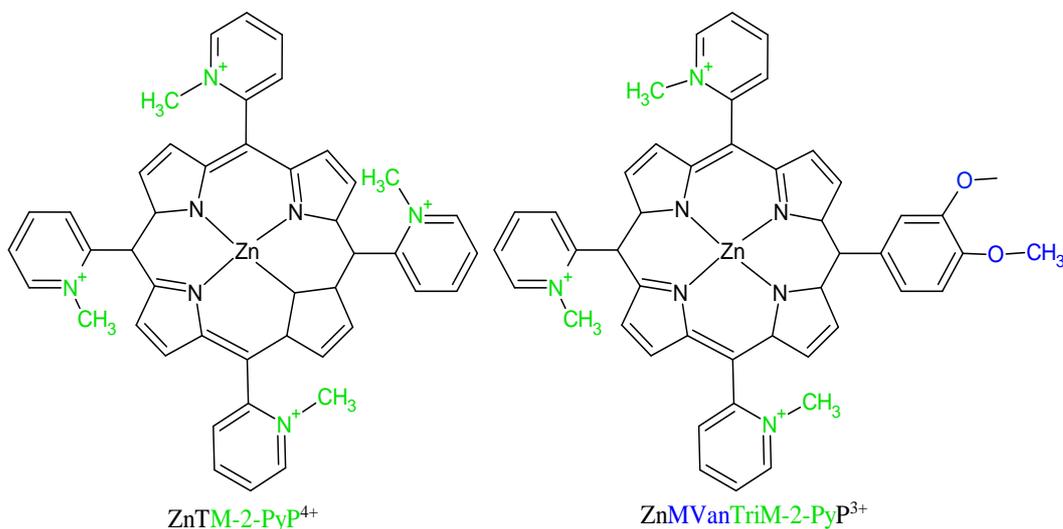


Figura 16: Modelo comparativo dos sistemas  $A_4$  comparado ao  $A_3B$  das ZnPs.

Sabe-se que toda e qualquer modificação em sistemas químicos afetam, de alguma forma, as propriedades fotofísicas, a absorção e distribuição celular, solubilidade, e, podendo ampliar seu espectro de ação. Alves e cols. em seus estudos comparativos observando a influência da mudança de carga, constataram que a porfirina tricatiônica contendo um grupo *mesopentafluorofenil* e três porções N-metilpiridínio-4-il,  $H_2PFPhTriM-4-PyP^{3+}$ , quando comparada à tetracatiônica,  $H_2TM-4-PyP^{4+}$ , apresentou melhorias na absorção e solubilidade.

A substituição de um grupo catiônico 2-*N*-metil-piridínio da  $ZnTM-2-PyP^{4+}$ , que apresenta um maior caráter eletrorretirador, por um grupo neutro de maior caráter eletrodoador, *O*-metilvanilina (MVan), resulta em um sistema com menos carga total (Figura 18) e, conseqüentemente, espera-se um complexo com maior lipofilia. Nestes sistemas à base de porfirinas catiônicas, demonstrou-se anteriormente que o fator de retenção cromatográfico ( $R_f$ ) medido em condições padrão de CCD-SiO<sub>2</sub> correlaciona-se com a lipofilia determinada por meio do coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log P_{ow}$ ) para esses compostos.

Esse coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log P_{ow}$ ), é uma medida farmacêutica comum de lipofilicidade/ biodisponibilidade de medicamentos. Para os membros hidrofílicos da série de porfirinas foi verificado ainda que, a partir da relação

$\log P_{ow}$  vs  $nC$  apropriada, há uma linearidade com o número de átomos de carbono nas cadeias laterais de alquil ( $nC$ ) (KOS, 2009).

O sistema  $A_4$ , tendo a  $ZnTM-2-PyP^{4+}$  como representante, apresenta espectro UV-Vis com banda de *Soret* em 425 nm e um comportamento cromatográfico em CCD-SiO<sub>2</sub> consistente com um sistema altamente polar ( $R_f = 0,10$ ). Já no sistema  $A_3B$ , a  $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$  apresenta espectro UV-Vis com banda de *Soret* em 428 nm e um comportamento cromatográfico em CCD-SiO<sub>2</sub> ( $R_f=0,30$ ) consistente com uma amostra menos polar que o sistema  $[ZnA_4]^{4+}$  (Tabela 4.1). O deslocamento da *Soret* no espectro de UV-vis é consistente com uma  $ZnP$  mais rica em elétrons.

Tabela 2: Dados comparativos dos fatores de retenção cromatográficos ( $R_f$ ) da  $ZnP$  do tipo  $[ZnA_3B]^{3+}$ ,  $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$ , deste trabalho com  $ZnPs$   $[ZnA_4]^{4+}$  da literatura, usando sílica, como fase estacionária, e  $KNO_3(sat)/H_2O/MeCN$  1:1:8 (v/v/v), como fase móvel.

Zn-Porfirinas	$R_f$
$ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$	0,30
$ZnTM-2-PyP^{4+}$	0,10 <sup>a</sup>
$ZnTE-2-PyP^{4+}$	0,20 <sup>a</sup>
$ZnTnPr-2-PyP^{4+}$	0,28 <sup>b</sup>
$ZnTnBu-2-PyP^{4+}$	0,38 <sup>a</sup>

Tabela 2: <sup>a</sup>(ODEH et al., 2014), <sup>b</sup> Valor estimado com base na equação da reta da correlação entre  $R_f$  vs  $nC$  das  $ZnPs$  ( $y = 0,0671x + 0,0794$ ) (THOMAS et al., 2015).

#### 4.2. *Porfirina catiônica base-livre*

No processo de metilação da porfirina neutra  $H_2VanTri-2-PyP$ , a reação com tosilato de metila em DMF já é bem estabelecida para *N*-alquilação dos grupos piridila, resultando nas porfirinas catiônicas *N*-metilpiridilporfirinas. A reação de *O*-alquilação do grupo vanilina da  $H_2VanTri-2-PyP$  foi realizada no mesmo procedimento com a adição de carbonato ao meio de reação. Assim, o grupo fenólico desprotonado e os grupos piridilas foram concomitantemente metilados pelo MeOTs para gerar a porfirina tricatiônica hidrossolúvel  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$ .

O espectro de UV-vis da  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  é caracterizado por uma menor absorvidade molar e banda *Soret* mais largas que aquela da  $H_2MVanTriM-2-PyP$  (Figura 17). Esse comportamento na  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  é consistente com

uma porfirinas de menor simetria em comparação com a porfirina base livre catiônica simétrica contendo quatro grupos 2-N-metilpiridínio ( $H_2TM-2-PyP^{4+}$ ), como também, a baixa absorvância molar apresentada pelas porfirinas de menor simetria,  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$ , a porfirina catiônica apresenta uma banda Soret mais larga em comparação da base livre.

As análises realizadas por CCD-SiO<sub>2</sub> utilizando, inicialmente, o eluente KNO<sub>3</sub>(sat):H<sub>2</sub>O:MeCN na proporção 1:1:8 (v/v/v), apresentaram valor de R<sub>f</sub> para a  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  superior àquele da porfirina tetracatiônica de referência  $H_2TM-2-PyP^{4+}$ , o que é consistente com a menor carga total (polaridade) da porfirina  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$ .

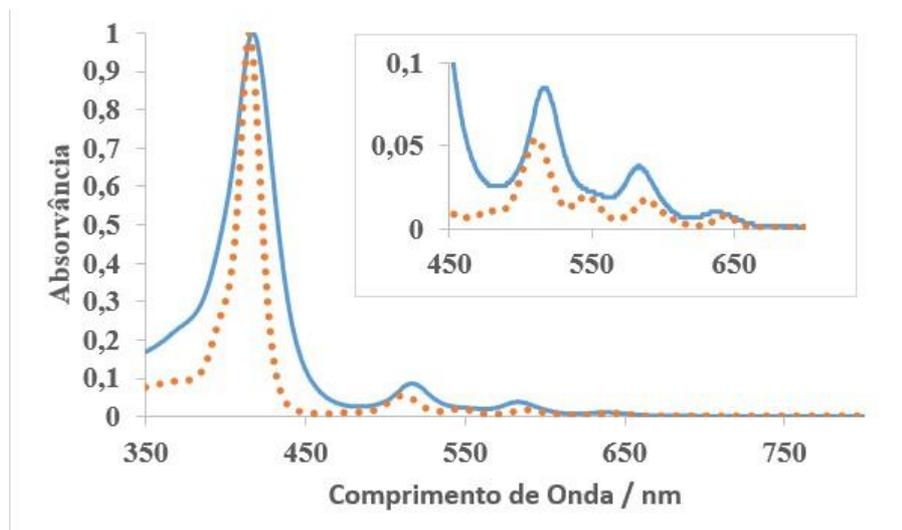


Figura 17: Espectros UV-vis normalizados da porfirina base-livre  $H_2MVanTriM-2-PyP$  (pontilhado vermelho) registrados em  $CHCl_3$ :Acetona e  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  (linha azul) registrados em  $H_2O$ . A expansão corresponde à região das bandas de menor energia (Q).

O sucesso da *O*-metilação do grupo vanilina também é evidente por análises por espectroscopia UV-Vis e CCD-SiO<sub>2</sub>, baseado em dados da literatura (SARMENTO-NETO, 2016, 2020), comparando-se os resultados da  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  com os dados da literatura para a porfirina  $H_2VanTriM-2-PyP^{3+}$ , que foi seletivamente metilada nos grupos piridilas sem afetar o grupo fenol da vanilina (Tabela 3).

Porfirinas	R <sub>f</sub>	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm} (\log \epsilon / \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
H <sub>2</sub> VanTriM-2-PyP <sup>3+</sup>	0,25 <sup>a</sup>	<b>417 (5,29)</b> , 517 (4,21), 583 (3,85), 636 (3,22)
	0,60 <sup>b</sup>	<b>413* (borato)</b>
H <sub>2</sub> MVanTriM-2-PyP <sup>3+</sup>	0,25 <sup>a</sup>	<b>417 (5,23)</b> , 517 (4,17), 583 (3,83), 635 (3,29)
	0,46 <sup>b</sup>	

Tabela 3: Dados de R<sub>f</sub> do ambiente neutro e básico: <sup>a</sup>Eluente KNO<sub>3</sub>(aq, sat):H<sub>2</sub>O:MeCN (1:1:8, v/v/v). <sup>b</sup> EluenteKNO<sub>3</sub>(aq, sat):NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>):MeCN (1:1:2 v/v/v).

A diferenciação da H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> e da H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, cuja modificação estrutural ocorre apenas no grupo da vanilina, não é possível utilizando a análise por CCD-SiO<sub>2</sub> em condição padrão de eluição por KNO<sub>3</sub>(aq, sat):H<sub>2</sub>O:MeCN (1:1:8, v/v/v). No entanto, ao se basificar a fase móvel, possibilita-se a ionização do grupo OH fenólico da vanilina. Assim, com a eluição usando a fase móvel NaOH(aq) (1 mol.L<sup>-1</sup>):H<sub>2</sub>O:MeCN na proporção de 1:1:2 v/v/v, a H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> apresentou valor de R<sub>f</sub> consideravelmente menor que aquele da H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> (que deve estar na forma de uma porfirina com carga global +2, visto que o grupo aniônico fenolato na porção vanilina contrabalança uma das 3 cargas positivas dos grupos N-metilpiridínicos).

Nas análises por espectroscopia UV-vis em H<sub>2</sub>O, os espectros da H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> e da H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> foram essencialmente sobreponíveis, visto que são porfirinas semelhantes estruturalmente. (SARMENTO-NETO,2016) (Figura 20). Compostos em ambientes básicos que possuam hidroxilas fenólicas, normalmente são ionizados e forma-se um fenolato, que se estabiliza em conjugação com o anel porfirínico. Assim, enquanto o espectro da H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> é consideravelmente sensível à mudança de pH (tampão fosfato, pH 7,8, versus tampão borato, pH 9,3), a presença de um grupo O-metila na H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> elimina a possibilidade de formação do fenolato em tampão e resulta que os espectros da H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> em tampão fosfato e borato são pouco afetados pela mudança de pH (de 7,8 para 9,3) (FERREIRA, 2016) (Figura 18).

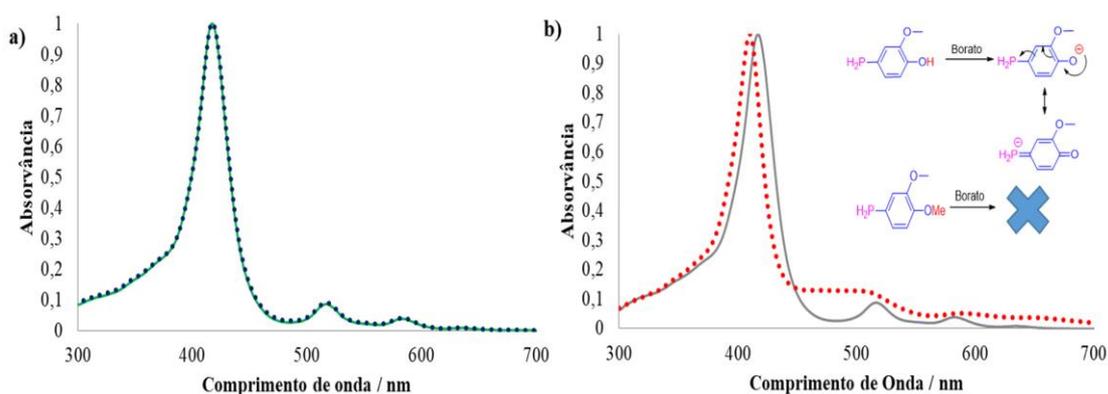


Figura 18: (a) Espectros UV-vis normalizados da  $H_2VanTriM-2-PyP^{3+}$  (b) registrados em tampão fosfato pH 7,8 (linha cinza) e tampão borato pH 9,3 (pontilhado vermelha).

O espectro de RMN de  $^1H$  da porfirina tricatiônica  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$ , apresenta atropoisomerismo, assim como todas as porfirinas catiônicas resultantes da alquilação de 2-*N*-piridilporfirinas, visto que, o grupo 2-piridila alquilado não possui livre rotação (IAMAMOTO et al., 1994; SPASOJEVIĆ et al., 2002; 2007). Essa mistura de atropoisômeros, a saber  $\alpha\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta\alpha$  e  $\alpha\alpha\beta$ , cuja distribuição estatística é 1:1:2, respectivamente, apresentaram sinais que ficavam sobrepostos, não sendo investidos esforço nessa separação (Figura 19).

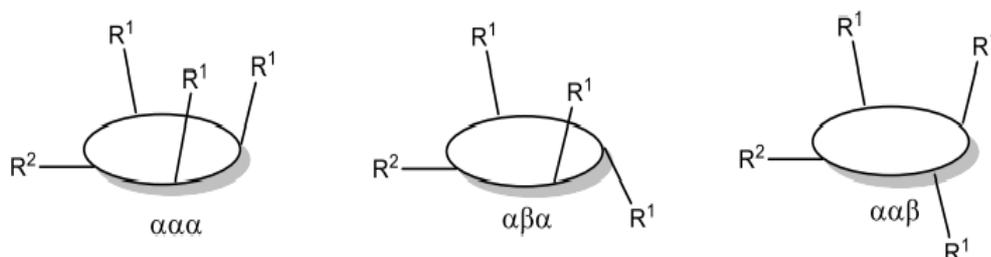


Figura 19: Representação esquemática da mistura de atropisômeros das porfirinas.  $R^1$  = grupos 2-*N*-metilpiridínio;  $R^2$  = grupos 3-metoxi-4-hidroxifenil ou 3,4-dimetoxifenil. O grupo  $R^2$ , por não conter substituinte orto, possui livre rotação (FERREIRA, 2016).

#### 4.3. Zinco Porfirina: $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$

A síntese da  $ZnMVanTriM-2-PyP^{3+}$  foi realizada em meio aquoso básico, favorecendo a desprotonação dos nitrogênios pirrólicos do anel porfirínico e, conseqüente incorporação do íon metálico, tal como descrito para os sistemas correlatos de Zn(II)-porfirinas do tipo  $[ZnA_4]^{4+}$  (BENOV et al., 2002).

A metalação da porfirina de base-livre  $H_2MVanTriM-2-PyP^{3+}$  com  $Zn(II)$  foi monitorada por espectroscopia de absorção UV-vis após 30 min e 2h de reação (Figura 20).

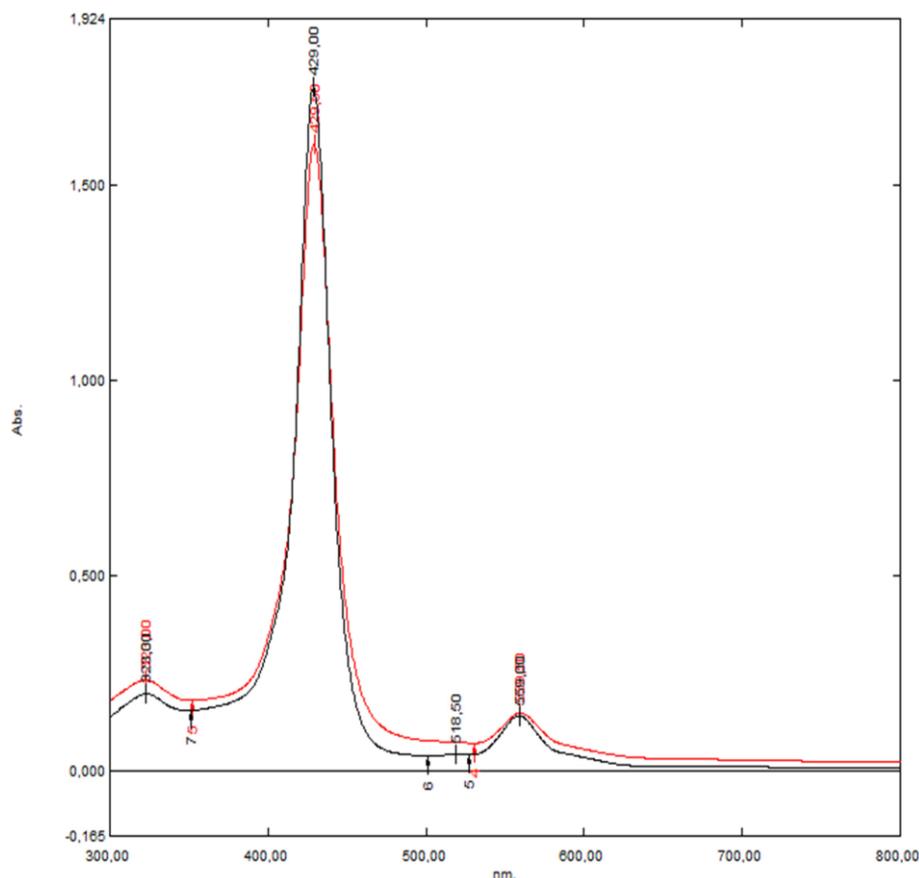


Figura 20: Espectros UV-vis da Metalação com  $Zn(II)$  após 30 minutos (Linha Preta) e 2h (Linha Vermelha).

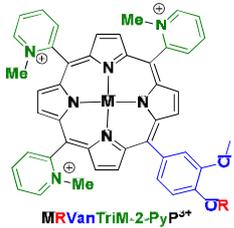
O processo de metalação com  $Zn(II)$  promove um aumento da simetria local das porfirinas e essa mudança resulta em uma redução no número de bandas do visível de 4 (simetria  $D_{2h}$ , porfirina base-livre) para 2 bandas Q (simetria  $D_{4h}$ , metaloporfirina).

As análises dos espectros UV-vis demonstram a metalação com  $Zn(II)$ , sendo este bem característico com as reportadas pela literatura nos sistemas  $[ZnA_4]^{4+}$  (BENOV et al., 2002; EZZEDDINE et al., 2013) e por Sarmento-Neto (2021) para os sistemas  $[ZnA_3B]^{3+}$ , apresentando uma banda *Soret* (428-429 nm), com uma alta absorvidade molar e uma banda de menor intensidade (acompanhada de um ombro) na região de 500 a 600 nm.

#### 4.4. RMN de $^1\text{H}$ das porfirinas: base-livre neutra, catiônica e Zn(II)-porfirina.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das porfirinas do tipo  $\text{A}_3\text{B}$  foram registrados em  $d^6$  – DMSO. Foram observadas diferenças pequenas nos deslocamentos atribuídos aos hidrogênios  $\beta$ -pirrólicos, grupos 2-piridila, vanilina. Em contrapartida, diferenças marcantes foram observadas com relação ao desaparecimento dos sinais dos grupos  $\text{OH}$  da vanilina e  $\text{NH}$ -pirrólicos após a O-metilação da vanilina ( $\text{H}_2\text{VanTriM-2-PyP} \rightarrow \text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+}$ ) e incorporação do Zn(II) ( $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+} \rightarrow \text{ZnMVanTriM-2-PyP}^{3+}$ ), respectivamente (Tabela 4) (Figura 20).

**Tabela 4:** Dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com os respectivos deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm) das porfirinas de interesse nesse trabalho.

Porfirina / Solvente	$\beta$ -pirrólos	2-Py	Ph(Van)	NH-pirrol	<i>m</i> -MeO e <i>p</i> -RO (Van)
 $\text{H}_2\text{VanTriM-2-PyP}^{3+}$ (R = H) (M = $2\text{H}^+$ ) $d^6$ -DMSO (500 MHz)	9,27-9,10 (8H, $\beta^*$ )	9,73 (3H) 9,10-8,70 (9H)	7,90-7,20 (3H)	-2,83 (s, $\text{a}^*$ )	3,93 (s, 3H) 9,87 (s, 1H, OH)
$\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+}$ (R = Me) (M = $2\text{H}^+$ ) $d^6$ -DMSO (200 MHz)	9,27-9,10 (8H, $\beta^*$ )	9,73 (3H) 9,10-8,70 (9H)	7,95-7,35 (3H)	-2,85 (s, $\text{a}^*$ )	3,91 (s, 3H) 4,07 (s, 3H)
$\text{ZnMVanTriM-2-PyP}^{3+}$ (R = Me) (M = $\text{Zn}^{2+}$ ) $d^6$ -DMSO (500 MHz)	9,05-8,95 (8H, $\beta^*$ )	9,59 (3H) 8,84-8,62 (9H)	7,86-7,20	ausente	3,92 (s, 3H) 4,06 (t, 2H)

**Hidrogênios N-pirrólicos (H internos):** Os hidrogênios NH-pirrólicos são um singleto em -2,99 e -2,87 ppm,  $\text{H}_2\text{VanTriM-2-PyP}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+}$ . Para  $\text{ZnMVanTriM-2-PyP}^{3+}$  ocorre um desaparecimento desses hidrogênios indicando a coordenação do íon metálico aos nitrogênios pirrólicos da porfirina base livre foi realmente efetiva.

**Alcoxila e 2-N-metilpiridínios:** Os sinais dos hidrogênios Me dos grupos 2-N-metilpiridínio aparecem na região entre 3,91 e 4,08 ppm, esses hidrogênios metilas dos grupos 2-N-metilpiridínio se apresentam também como um conjunto de sinais

devido a ação dos atropoisômeros (SPASOJEVIĆ et al., 2002; 2007). O singlete em 3,93 ppm correspondente ao grupo m-MeO. Para o sinal atribuído aos hidrogênios do grupo p-OR, observa que se sobrepuseram com os sinais dos hidrogênios Me dos grupos 2-N-metilpiridínio na região de 3,91 e 4,08 ppm. Para a ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, o singlete em 3,91 e o tripleto em 4,06 correspondem a m-MeO e p-OR, respectivamente.

**β-pirrólicos:** Para a H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> e H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> o deslocamento dos sinais associados aos hidrogênios β<sub>2</sub>, β<sub>3</sub> e β<sub>4</sub> resultou em sobreposição parcial com os hidrogênios β<sub>1</sub>, sendo eles idênticos em si. Sobreposição essa, associada à presença de uma mistura de atropoisômeros. Esses atropoisômeros podem aparecer desde a reação inicial na formação da base-livre, como após a alquilação da porfirina neutra. No caso da ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, ocorre um deslocamento na faixa de 9,05-8,95.

**Aromáticos (2-piridila e vanilina):** Para a H<sub>2</sub>VanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> e H<sub>2</sub>MVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> os sinais dos hidrogênios aromáticos meso-arilas (grupos 2-N-metilpiridínio metilvanilina), aparecem entre 7,20 e 9,73 ppm, sendo em sua grande maioria difícil de aparecer devido ao efeito dos atropoisômeros. No caso dos hidrogênios aromáticos do grupo Vanilina, estão presentes na região entre 7,20 ppm e 7,90 ppm. No caso da ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, esses sinais aparecem por volta de 9,59 para os grupos 2-N-metilpiridínio e 7,86 para os hidrogênios aromáticos presentes no grupo da vanilina (Figura 4.8).

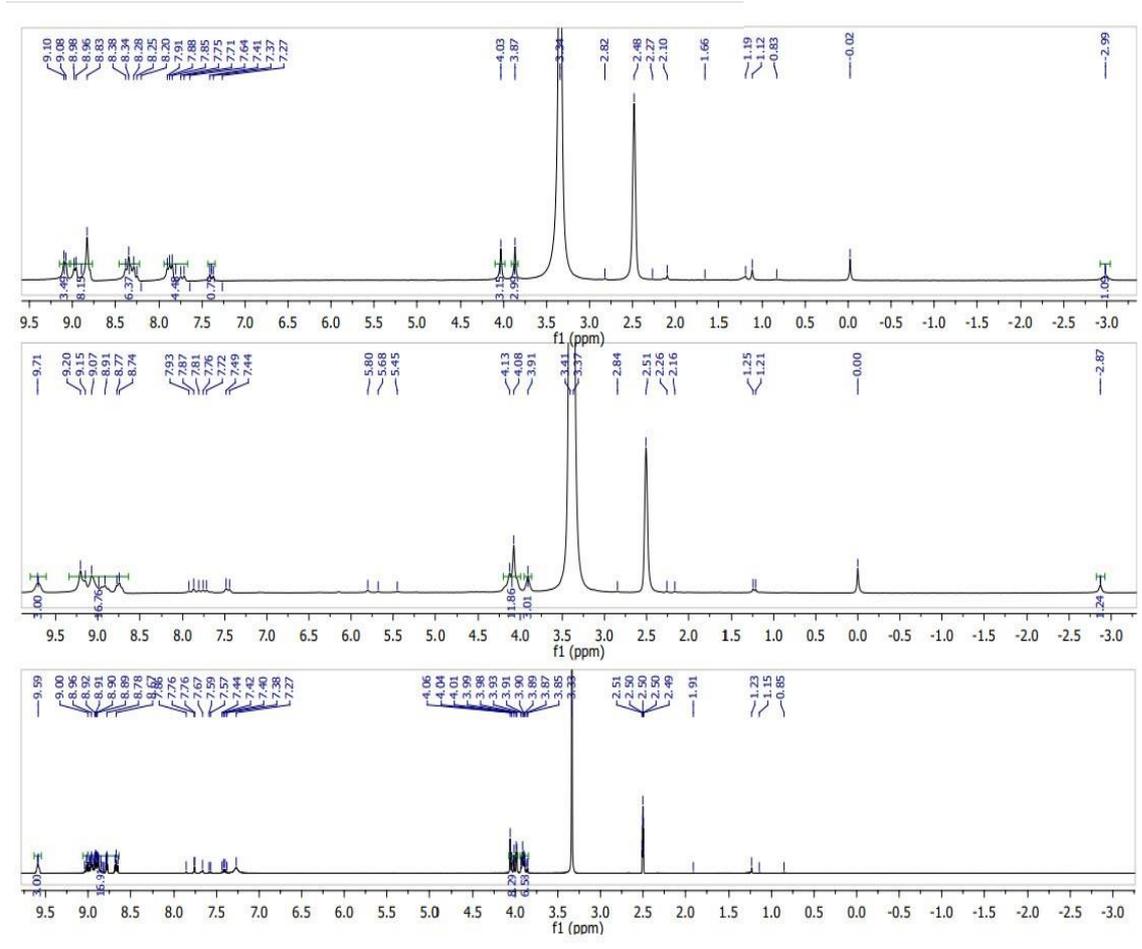


Figura 21: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com os respectivos deslocamentos químicos  $\delta$  (ppm) das porfirinas de interesse nesse trabalho.

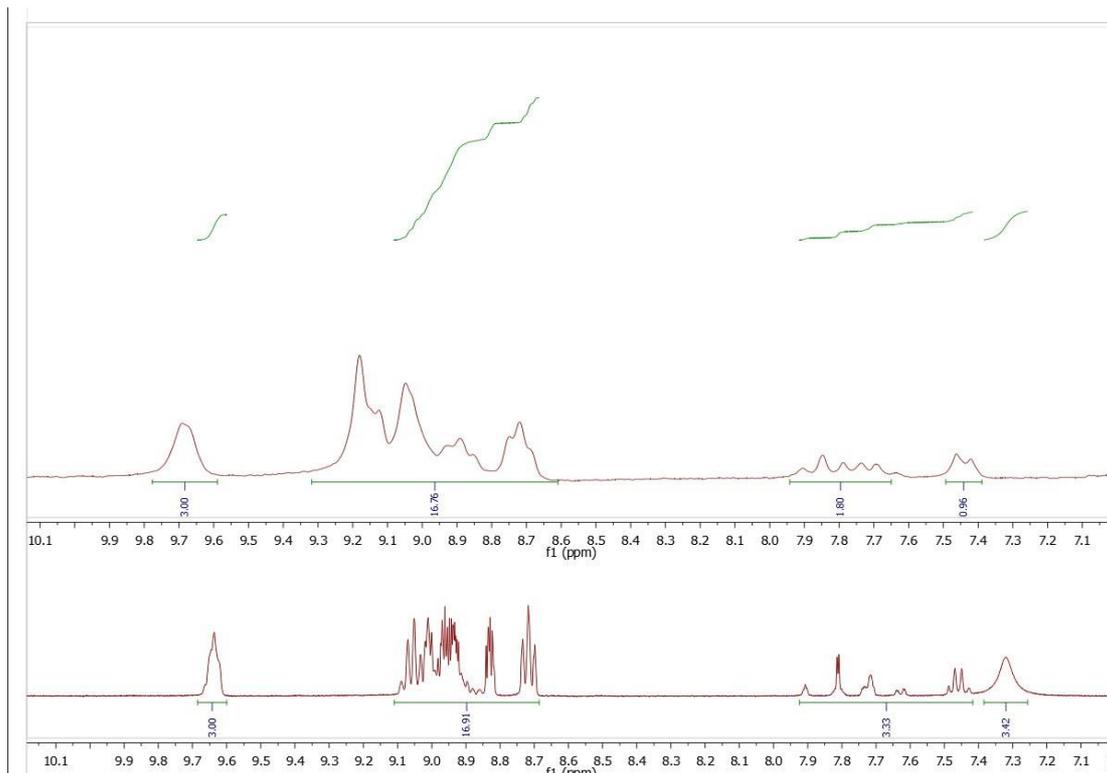


Figura 22: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+}$  (200 MHz;  $\text{d}^6$  -DMSO) na região dos sinais aromáticos.

**RMN de  $^1\text{H}$ :**(200 MHz, DMSO)  $\delta$  9.09 (d,  $J = 4.3$  Hz, 3H), 9.02 – 8.77 (m, 8H), 8.31 (dd,  $J = 19.1, 7.3$  Hz, 6H), 7.79 (dt,  $J = 15.5, 6.6$  Hz, 4H), 7.39 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.87(s, 3H), -2.99 (s, 1H).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A obtenção das 2-*N*-alquilpiridínioporfirinas de Zn(II) do tipo  $[\text{ZnA3B}]^{3+}$  (A = 2-*N*-metilpiridil, B = *O*-alquilvanilina) descrita por Sarmiento-Neto (2016, 2021) foi revisitada com sucesso nesta dissertação. Assim, foi obtida a porfirina de base-livre,  $\text{H}_2\text{VanTri-2-PyP}$ , que foi alquilada por MeOTs em DMF na presença de carbonato para originar a porfirina *O*- e *N*-metilada  $\text{H}_2\text{MVanTriM-2-PyP}^{3+}$ , que foi então metalada com Zn(II), resultando no complexo de interesse  $\text{ZnMVanTriM-2-PyP}^{3+}$ , em rendimentos superiores a 90%. As caracterizações por CCD- $\text{SiO}_2$ , UV-vis e RMN de  $^1\text{H}$  sugeriram os produtos isolados foram consistentes com as formulações propostas e corroboraram os dados obtidos anteriormente (SARMENTO-NETO, 2016, 2020).

Com base em sistemas correlato na literatura, espera-se que a  $\text{ZnMVanTriM-2-PyP}^{3+}$  seja um fotossensibilizador em potencial para inativação fotodinâmica

antimicrobiana (aPDI). A literatura aponta a ZnTnBu-2-PyP<sup>4+</sup> como um fotossensibilizador de boa atividade in vivo, trazendo assim uma boa perspectiva no uso da ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, uma vez que as análises por CCD-SiO<sub>2</sub> sugeriram que a lipofilia da ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> (Rf = 0,30) pode estar perto daquela da ZnTnBu-2-PyP<sup>4+</sup> (Rf = 0,38).

Como continuação dos estudos, há claramente a necessidade de complementação da caracterização da Zn(II) porfirina do tipo [ZnA3B]<sup>3+</sup>, ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup>, por espectrometria de massas (ESI-MS), análise elementar (CHN), Espectroscopia de Fluorescência e estudos de estabilidade (térmica e química).

Finalmente, após as devidas caracterizações, a ZnMVanTriM-2-PyP<sup>3+</sup> é uma excelente candidata a FS para inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDI) de vírus, bactérias, fungos e parasitos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINIS et al., 2011 – AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. **Photodynamic Therapy of Cancer: An Update**. *CA Cancer J, Clin.* 61(4), 250-281, 2011.

AMIT KUMAR, YUICHI KUBOTA, MIKHAIL CHERNOV, HIDETOSHI KASUYA. **Potential role of zinc supplementation in prophylaxis and treatment of COVID-19. Medical Hypotheses** Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. **Characterization of enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern**. *Int J Infect Dis.* 2011;15(2):136-9.

AV TELES, TMA OLIVEIRA, FC BEZERRA, L. ALONSO, A. ALONSO, IE BORISSEVITCH, PJ GONÇALVES, GRL SOUZA, **Inativação fotodinâmica de bovinos herpesvírus tipo 1 (Bohv-1) por porfirinas**, *J. Gen. Virol.* (2018). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001121>.

BAYONA et al., 2016; DĄBROWSKI et al., 2007) - BAYONA, A. M. P.; MROZ, P.; THUNSHELLE, C.; HAMBLIN, M. R. **Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers**, *Chem. Biol. Drug Des.*, 89: 192- 206, 2016.

BENOV et al., 2002; - BENOV, L.; BATINIĆ-HABERLE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; FRIDOVICH, I. **Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers**, *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 159-165, 2002.

CALVO J, MARTÍNEZ LM. **Mecanismos de acción de los antimicrobianos**. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(1):44-52.

CASTEEL - Casteel, M. J.; Jayaraj, K.; Gold, A.; Ball, L. M.; Sobsey, M. D.; *Photochem. Photobiol.* **2004**, 80, 294.

CHANG S, ET AL. **Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus aureus containing the van A resistance gene**. *N Engl J Med.* 2003;348(14):1342-7.

COSTA, 2013 – COSTA, L. D. S. **Síntese e Caracterização de Porfirinas como Potenciais Agentes Fotosensibilizadores em Terapia Fotodinâmica**. Dissertação - Mestrado, Departamento de Ciências da vida, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. 138 p.

Da SILVA, A. C. P. et al. **Atividade Fotodinâmica E Conceitos: Um Experimento Demonstrativo**. *Quim. Nova*, Vol. 41, No. 6, 706-712, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170215>.

DĄBROWSKI, J. M.; PEREIRA, M. M.; ARNAUT, L. G.; MONTEIRO, C. J.; PEIXOTO, A. F.; KAROCKI, A.; URBAŃSKA, K.; STOCHEL, G. **Synthesis, photophysical studies and anticancer activity of a new halogenated water-soluble porphyrin**, *Photochem. Photobiol.*, 83: 897-903, 2007.

DAI T, YING-YING H, HAMBLIN MR. **Photodynamic therapy for localized infections-State of the art**. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2009;6(3-4):170-88.

DE OLIVEIRA, K. T.;;\* DE SOUZA, J. M.; GOBO, N. R. S.; DE ASSIS, F. F.; BROCKSOM, T. J.

**Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotosensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas**. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (1), 310-335, 2014.

DIAS, Ingrid da Silva. **A História do surgimento da Microbiologia: Fatos Marcantes**. Disponível em: <https://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/384-a-historia-do-surgimento-da-microbiologia-fatos-marcantes>. Acessado em 14/03/2022.

DOHMEN, PM. **Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimise surgical site infections**. *J Hosp Infect.* 2008;70(Suppl 2):15-20.

DOUGHERTY, 1992; DOUGHERTY, T. J. **Photodynamic Therapy: yearly review**, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.58, p.895-900, 1992.

EDUARDO et al, 2015 – Eduardo, C. de P.; Bello-Silva, M. S.; Ramalho, K. M.; Lee, E. M. R.; Aranha, A. C. C.; *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* **2015**, 69, 226.

EDUARDO, C. P.; BELLO-SILVA, M. S.; RAMALHO, K. M.; LEE, E. M. R.; ARANHA, A. C. C.

**A Terapia Fotodinâmica como Benefício Complementar na Clínica Odontológica**. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas*, vol.69, n.3, pp. 226-235, 2015.

F. VIGANT, M. JUNG, B. LEE, **Positive reinforcement for virus**, *Chem. Biol.*(2010). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.10.002>

FERRO S, RICCHELLI F, MONTI D, MANCINI G, JORI G. **Efficient photoinactivation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome**. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):1026-34

FOOTE, 1991 – FOOT, C. S. **Definition of type I and type II photosensitized oxidation**, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.54, p.659, 11991.

GENOVESE, 2000 - GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000, 175 p. 26695. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.101, p.206-209, 2010.

HENDERSON; - HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. **How does photodynamic therapy work?** Photochem. Photobiol., 55: 145, 1992.

HERRMANN M, GAUDET G. **The economic dynamics of antibiotic efficacy under open access.** J Environ Econ Manage. 2009;57(3):334-50.

HOIBY N, BJARNSHOLT T, GIVSKOV M, MOLIN S, CIOFU O. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms.** Int J Antimicrob Agents. 2010;35(4):322-32.

STOJILJKOVIC, BD EVAVOLD, V. KUMAR, **Antimicrobial properties of porfirinas, Opiniões de especialistas.** Investig. Drogas. (2001). <https://doi.org/10.1517/13543784.10.2.309>.

ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; COSTA, 2013 – ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M.

**Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation.** Anais Brasileiros de Dermatologia, p.11, 2010.

JM SONG, BL SEONG, **Membranas virais: Um alvo antiviral emergente para vírus envelopados?**, Expert Rev. Anti. Infectar. Ther. (2010). <https://doi.org/10.1586/eri.10.51>.

JORI G, FABRIS C, SONCIN M, FERRO S, COPPELLOTTI O, DEI D. **Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications.** Lasers Surg Med. 2006;38(5):468-81.

KOHANSKI MA, DEPRISTO MA, COLLINS JJ. **Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis.** Mol Cell. 2010;37(3):311-20.

LEVY, SB. **Antibiotic resistance: the problem intensifies.** Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(10):1446- 50.

MACCORMACK, 2007 – MACCORMACK, M. A. **Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes.** Seminars in cutaneous medicine and surgery, Elsevier, p.11, 2007.

MACHADO, AEH. **Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas.** QuimNova. 2000;23(2):237-43.

MANG, TS, MIKULSKI, L., HALL, RE. **Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant Candida species.** Photodiagn Photodyn Ther. 2010;7(2):98-105.

MENDES, 2008 – MENDES, M. C. **Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS4 para potencial aplicação em terapia fotodinâmica.** Dissertação - Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008. 125 p.

MESTER, 1985 – MESTER, E. MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical Effects of Laser Application, *Lasers in Surgery and Medicine*, v.5, p.31-39, 1985.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. *Science*, v.308 (May 13), p.1040-2, 2005.

MOURA S.C.R. **Comparação do Potencial Fotodinâmico de três fotossensibilizadores associados a uma lâmpada de LEDs sobre culturas de *Enterococcus faecalis***. 2011 58p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnólogo em processos ambientais) Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
– UTFPR, 2011.

MUSSI, 2003 - MUSSI, L. **Eficiência Fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco**. Dissertação - Mestrado em Química, Instituto de Química UNICAMP, Campinas, 2003. 90 p.

PAVANI et al., 2009; - PAVANI, C.; UCHOA, A.F.; OLIVEIRA, C. S.; IAMAMOTO, Y.; BAPTISTA M. S. **Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers**. *Photochem, Photobiol, Sci.*, 8: 233- 240, 2009.

PERUSSI, 2007 – PERUSSI, J.R. **Inativação fotodinâmica de microrganismos**. *Quim. Nova.*, v.30(4):p.988- 994, 2007.

PERUSSI, J. R. **Photodynamic inactivation of microorganisms**. *Quím. Nova* 30 (4) • Ago 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>.

PRATES, R.A. **Verde de malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: ação bacteriana sobre actinomyces comitans um estudo in vitro**. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2005.

RYSKOVA L, BUCHTA V, SLEZAK R. **Photodynamic antimicrobial therapy**. *Cent Eur J Biol*. 2010;5(4):400-6.

SILVESTRE, G. F. G. et al. **Utilização De Produtos Naturais Como Fotossensibilizadores: Uma Nova Perspectiva Para A Terapia Fotodinâmica**. In: III Conbracis, 2018, Campina Grande.

SIMPLICIO FI, MAIONCHI F, HIOKA N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços no desenvolvimento de medicamentos**. *Quim Nova*. 2002;25(5):801-7.

SOUZA THS, SARMENTO-NETO JF, SOUZA SO, RAPOSO BL, SILVA BP, BORGES CPF, SANTOS BS, CABRAL FILHO PE, REBOUÇAS JS, FONTES A, **Advances on Antimicrobial Inativação fotodinâmica mediada por porfirinas Zn (II)**, *Journal of Photochemistry e amp; Photobiology, C: Photochemistry Reviews* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2021.100454>

STEFAN CUNHA UJVARI. **A história da disseminação dos microrganismos.** <https://doi.org/10.1590/S0103-40142008000300011>.

TE VELTHUIS AJW, VAN DEN WORM SHE, SIMS AC, BARIC RS, SNIJDER EJ, ET AL. (2010)

**Zn<sup>2+</sup> inibe a atividade da polimerase de RNA de coronavírus e arterivírus in vitro e os ionóforos de zinco bloqueiam a replicação desses vírus em cultura de células.** *PLoS Pathog* 6 (11): e1001176. doi: 10.1371 / journal.ppat.1001176. **Volume 144, November 2020, 109848. 10.1016 / j.mehy.2020.109848**

EDELSON, R. L. *Sci. Am.*, 1988, 259, 68.

ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; SIBATA, C. H. **Photodiagn.** *Photodyn. Ther.*, 2004, 1, 263.

ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 340.

C. PAVANI, AF UCHOA, CS OLIVEIRA, Y. IAMAMOTO, MS BAPTISTA. **Efeito da inserção de zinco e hidrofobicidade nas interações de membrana e atividade PDT de fotossensibilizadores de porfirina,** *Photochem. Fotobiol. ciência* 8 (2009) 233–240, <https://doi.org/10.1039/B810313E>.

K. KASSAB, D. DEI, G. RONCUCCI, G. JORI, O. COPPELLOTTI, **Inativação fotossensibilizada por ftalocianina de um protozoário patogênico, Acanthamoeba palestinensis,** *Photochem. Fotobiol. ciência* 2 (2003) 668, <https://doi.org/10.1039/b300293d>.

ALVARADO, D. R.; ARGYROPOULOS, D. S.; SCHOLLE, F.; PEDDINTI, B. S. T.; GHILADI, R. A. **A facile strategy for photoactive nanocellulose-based antimicrobial materials,** *Green Chem.*, 21: 3424-3435, 2019.

ALVES, E.; ESTEVES, A. C.; CORREIA, A.; CUNHA, Â.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; ALMEIDA, A. **Protein profiles of Escherichia coli and Staphylococcus warneri are altered by photosensitization with cationic porphyrins,** *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14: 1169-1178, 2015.

BENOV, L. **Photodynamic therapy: current status and future directions,** *Med. Princ. Pract.*, 24:14-28, 2015.

BENOV, L.; BATINIĆ-HABERLE, I.; SPASOJEVIĆ, I.; FRIDOVICH, I. **Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers,** *Arch. Biochem. Biophys.* 402: 159-165, 2002.

COOK, L. P.; BREWER, G.; WONG-NG, W. **Structural aspects of porphyrins for functional materials applications,** *Crystals*, 7: 223-244, 2017.

MERCHAT, M.; SPIKES, J. D.; BERTOLONI, G.; JORI, G. **Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins.** *J. Photochem. Photobiol. B.*, 149-157, 1996b.

ROTHEMUND, P. **A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin**, *J. Am. Chem. Soc.*, 58: 625-627, 1936.

COLUSSI, V.C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J. H. **Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers**. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.42, n.4, p. 229-236, 1996.

COLUSSI, V.C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos**. 1997. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

MELO, C.A.S.; IMA, A.L.L.A.; BRASIL, I.R.C.; CASTRO E SILVA, O. Jr; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. **Characterization of light penetration in rat tissues**. *J. Clin. Laser Medicine & Surgery*, v.19, n<sup>o</sup>4, p.175-179, 2001.

BOWN, B.G.; C. J. TRALAU, P.D. COLERIDGE, D. AKDEMIR AND T. J. WIEMAN. **Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitization: Quantitative studies in normal rat liver**. *Br. J. Cancer*. 54, 43. 1986.

MANOEL, C. A.; PAOLILLO, F.R.; DE MENEZES, P. F. C.; **Conceitos fundamentais e práticos da Fotoestética**, Compacta: São Carlos, 2014.

de Oliveira, K. T.;\* de Souza, J. M.; Gobo, N. R. S.; de Assis, F. F.; Brocksom, T. J. *Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (1), 310-335. 2014.

DABROWSKI, J.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOL, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. **Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers**. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 325, p. 67-101, 2017

DNDi Drugs for neglected diseases initiative 2022, **Novas recomendações para o tratamento das leishmanioses nas Américas**, Disponível: <https://www.dndial.org/2022/comunicacao-e-informacao/novas-recomendacoes-para-o-tratamento-das-leishmanioses-nas-americas>

GUTERRES, K. B. et al. **Metal center ion effects on photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic porphyrins**. *BioMetals*, v. 33, n. 4–5, p. 269– 282, 2020.

ZHOU, Z. et al. **Advances in photosensitizer-related design for photodynamic**

**therapy**. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 16, n. 6, p. 668–686, 2021.

de OLIVEIRA, R. F. et. al., **Terapia fotodinâmica associada a laser no tratamento endodôntico**. Arch Health Invest (2021) 10(2):236-240. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v10i2.5051>

FREITAS, L. S. F. **Efeito antimicrobiano de múltiplas sessões de terapia fotodinâmica sobre biofilmes de Candida spp.** Formados in vitro. 2015. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/127698>>.

NÚÑEZ, S. C; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **PDT - Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 253 p. 2019.

BASTOS, M. M.;\*<sup>a</sup> Boechat, N.;<sup>a</sup> Gomes, A. T. P. C.;<sup>b</sup> Neves, M. G. P. M. S.;<sup>b</sup> Cavaleiro, J. A. S.<sup>b</sup>. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (3), 257-267. Data de publicação na Web: 18 de abril de 2012.

BRAGA, N. S. M.;\* Tenório, A. G.; Silva, C. B. V.; Oliveira, E. R.; Pires, L. L. S.; Santos, A. F. Ação Antibacteriana e Composição Fenólica do Óleo Essencial dos Frutos de Schinus terebinthifolius Raddi frente a Patógenos Multirresistentes. Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (5), 1057-1065. Data de publicação na Web: 4 de Agosto de 2020