



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2021

**Xavier Barbosa
Moreira**

**Conjugados porfirina-imidazol β -catiônicos na terapia
fotodinâmica antimicrobiana**

**β -cationic porphyrin-imidazole conjugates in antimicrobial
photodynamic therapy**



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2021

**Xavier Barbosa
Moreira**

**Conjugados porfirina-imidazol β -catiônicos na terapia
fotodinâmica antimicrobiana**

**β -cationic porphyrin-imidazole conjugates in antimicrobial
photodynamic therapy**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Teresa Peixoto de Campos Gomes, Investigadora de Nível 2 do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e do Doutor Nuno Miguel Malavado Moura, Investigador Júnior do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Doutor Brian James Goodfellow

Professor Assistente do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Teresa Peixoto de Campos Gomes

Investigadora de Nível 2 do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves

Investigadora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação. Aqui lhes presto o meu reconhecimento:

À Professora Graça Neves e Professora Adelaide Almeida por me terem carinhosamente recebido no laboratório.

À Doutora Idalina Gonçalves e Paulo Brites pelo auxílio prestado na síntese dos materiais de amido e quitosana.

À Doutora Maria Azevedo pela disponibilidade demonstrada na análise dos materiais.

A todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial aos meus orientadores Nuno Moura e Ana Gomes pela orientação científica, disponibilidade e apoio incondicional que permitiram a concretização desta dissertação.

Um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã por me proporcionarem todas as condições necessárias para a concretização de um sonho, que também era deles. Agradecer também à Patrícia pela paciência, companheirismo e motivação que sempre demonstrou ao longo destes anos.

Palavras-chave

PDI; porfirinas catiónicas; micelas de PVP; amido; quitosana; carbono nitreto grafítico

Resumo

Devido ao aumento de infecções bacterianas induzidas pela resistência a antibióticos, é urgente desenvolver novas abordagens terapêuticas para reverter essa situação. A terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDI) é considerada uma alternativa promissora ao tratamento com antibióticos, nomeadamente em infecções localizadas. A PDI combina luz, oxigénio e um fotossensibilizador (PS), produzindo espécies reativas de oxigénio (ROS) que conduzem à inativação celular. Neste contexto, as porfirinas têm-se mostrado particularmente eficientes como PSs em PDI. A imobilização de PSs em materiais sólidos tem-se revelado bastante vantajoso uma vez que permite a reutilização dos PS, evita o uso de solventes orgânicos e permite a extensão da terapia para diversas áreas. Este trabalho tem como objetivo a síntese e a caracterização de híbridos porfirina-imidazol β -catiônicos, a sua incorporação em micelas de polivinilpirrolidona (PVP) e a imobilização destes derivados em filmes de amido e quitosana e em nitreto de carbono grafítico. A caracterização fotofísica dos híbridos porfirina-imidazol β -catiônicos, assim como das formulações destes derivados em PVP e dos materiais preparados, foi também estudada. Por fim, a eficiência fotodinâmica dos PSs livres, incorporados em PVP e suportados em materiais sólidos foi avaliada na inativação de bactérias resistentes a antibióticos, a *E. coli* e a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Os resultados obtidos são demonstrativos da potencialidade dos materiais sintetizados em atuarem como PSs em PDI, tendo-se observado, no geral, decréscimos significativos na viabilidade de ambas as estirpes bacterianas.

Keywords

PDI; cationic porphyrins; PVP micelles; starch; chitosan; graphitic nitride carbon

Abstract

Due to the increase of bacterial infections induced by antibiotic resistance, it is urgent the development of new therapeutic approaches to reverse this situation. Antimicrobial photodynamic therapy (PDI) is considered a promising alternative to treatment with antibiotics, namely in localized infections. PDI combines light, oxygen and a photosensitizer (PS), producing reactive oxygen species (ROS) that lead to cell inactivation. In this context, porphyrins have been shown to be particularly effective as PSs in PDI. The immobilization of PSs in solid materials has proved to be quite advantageous since it allows the reuse of PSs, avoids the use of organic solvents and allows the extension of therapy to several areas. This work aims at the synthesis and the characterization of β -cationic porphyrin-imidazole hybrids, its incorporation into polyvinylpyrrolidone (PVP) micelles and the incorporation of these derivatives in amide and chitosan films and in graphitic carbon nitride. The photophysical characterizations of such hybrids, as well the PVP formulations and the materials prepared was also studied. The photodynamic efficiency of these PSs in solution, incorporated into PVP micelles and supported was also evaluated in antibiotic resistant bacteria, the *E. coli* and methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA). The results obtained are demonstrative of the potential of the synthesized materials to act as PSs in PDI, having observed, in general, significant decreases in the viability of both bacterial strains.

Índice

Índice de figuras	9
Lista de abreviaturas e símbolos	12
1. Introdução geral	15
1.1-Terapia fotodinâmica antimicrobiana	15
1.2- Porfirinas	20
1.2.1-Métodos de síntese.....	23
1.3- Efeito fotodinâmico antibacteriano de porfirinas catiónicas <i>meso</i>-substituídas	25
1.4-Efeito fotodinâmico antibacteriano de porfirinas catiónicas β- substituídas	31
1.5-Imobilização de PSs em materiais	35
1.5.1-Quitosana	35
1.5.2-Amido	39
1.5.3-Micelas	40
1.5.4-Nitreto de Carbono Grafítico.....	43
2- Derivados porfirina-imizadol β-catiônicos: Síntese, incorporação em micelas de PVP e imobilização em filmes de amido e de quitosana e em nitreto de carbono grafítico.	45
2.1-Preâmbulo.....	45
2.2-Síntese dos derivados porfirina-imidazol neutros 35a,b.....	46
2.3-Síntese dos derivados porfirina-imizadol β -catiônicos 36a,b	49
2.4-Incorporação dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em micelas de PVP	52
2.5-Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de amido, A-36a,b	53
2.6- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de quitosana, Q-36a,b	57
2.7- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em nitreto de carbono grafítico, CN _{b,m,ex} -36a,b	60
2.8- Procedimento experimental	63
2.8.1-Síntese dos derivados porfirina-imidazol neutros 35a-b	63
2.8.1.1- Síntese do derivado porfirina-imidazol neutro 35a.....	63
2.8.1.2-Síntese do derivado porfirina-imidazol neutro 35b	64
2.8.2-Síntese dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b	64

2.8.3-Incorporação dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em micelas de PVP, PVP-36a,b.....	65
2.8.4-Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de amido, A-36a,b.....	66
2.8.5- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de quitosana, Q-36a,b	66
2.8.6- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em nitreto de carbono grafitico, CN _{b,m,ex} -36a,b.....	67
3-Estudo da eficiência fotodinâmica antimicrobiana dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, das suas formulações em PVP e dos materiais sólidos preparados.....	67
3.1-Preâmbulo.....	67
3.2-Estudos de fotoestabilidade.....	68
3.2.1- Estudos de fotoestabilidade dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b e das suas formulações em PVP	68
3.2.2-Estudos de fotoestabilidade dos materiais sólidos preparados	69
3.3-Estudo da geração de oxigênio singlete (¹ O ₂) dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b, das suas formulações em PVP e dos materiais sólidos preparados.....	70
3.4-Estudo da fotoinativação da bactéria <i>E. coli</i>	73
3.4.1- Estudo da fotoinativação da bactéria <i>E. coli</i> na presença dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, 36a,b, e das formulações PVP-36a,b	73
3.4.2-Estudo da fotoinativação da bactéria <i>E. coli</i> na presença dos materiais suportados A-36a e Q-36a	74
3.5- Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA	76
3.5.1- Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, 36a,b e das formulações PVP-36a,b.....	76
3.5.2-Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos materiais suportados A-36a,b e Q-36a,b.....	77
3.5.3-Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos materiais CN _{b,m,ex} -36a,b.....	78
3.6- Procedimento experimental	80
3.6.1- Estudos de fotoestabilidade.....	80
3.6.1.1- Estudos de fotoestabilidade dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b e das formulações em PVP	80
3.6.1.2- Estudo de fotoestabilidade dos materiais sólidos	81
3.6.2-Estudo da geração de ¹ O ₂	81
3.6.3-Fotossensibilizadores	82
3.6.4- Fonte de luz.....	82
3.6.5- Caracterização das espécies microbianas e das condições de cultura.....	83
3.6.6- Procedimento geral para os ensaios de PDI.....	83
3.6.7-Análise estatística	84

3.7-Conclusões e perspectivas futuras	84
4-Bibliografia	86
5-Anexos	95

Índice de figuras

Figura 1- Diagrama de Jablonski. Adaptado de [8].....	16
Figura 2- Estrutura das paredes celulares de bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo. Adaptado do site: https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007	19
Figura 3- Estrutura química do grupo heme e da clorofila.	20
Figura 4- Sistemas de nomenclatura propostos por Fischer e IUPAC, respetivamente.	21
Figura 5- Exemplo de núcleos tetrapirrólicos.	22
Figura 6- Espectro UV-Vis característico de meso-tetra-arilporfirinas na forma de base livre... 23	23
Figura 7- Estrutura do PS 1.....	26
Figura 8- Estruturas dos PSs 2-8.....	28
Figura 9- Estrutura dos PSs 9-13 e MB.	30
Figura 10- Estrutura dos PSs 14-17.	31
Figura 11- Estrutura dos PSs 18a-c,19 e 20.....	33
Figura 12- Estrutura dos PSs 21-23.	34
Figura 13- Estrutura dos PSs 24-27.	35
Figura 14- Estrutura molecular da quitosana.	36
Figura 15- Estrutura dos PSs 28 e 29.....	37
Figura 16- Estrutura dos PSs 30-33.	38
Figura 17- Estrutura do amido.	40
Figura 18- Estrutura representativa de uma micela.....	41
Figura 19- Estrutura dos PSs 34a-f.	42
Figura 20- Estrutura do PS Zn(II)-Ft.	43
Figura 21- Estrutura química do Nitreto de Carbono Grafítico (g-C ₃ N ₄).	45
Figura 22- Estrutura de fármacos derivados do imidazol.....	46
Figura 23- Espectros de absorção dos derivados neutros e β-catiónicos 35,36a (A) e 35,36b (B) em DMF, à temperatura ambiente ([35,36a] = [35,36b] = 3 x 10 ⁻⁶ M).	51
Figura 24- Espectros de absorção no estado sólido dos derivados β-catiónicos 36a (A) e 36b (B) “diluídos” em óxido de magnésio (MgO), à temperatura ambiente.	52
Figura 25- Imagem representativa dos filmes resultantes da imobilização das porfirinas 36a,b em filmes de amido. Na Figura 25A encontra-se representado o filme de amido evidenciando a precipitação das porfirinas. A Figura 25B é representativa do resultado após as modificações das condições de reação.....	55
Figura 26- Espectros de absorção no estado sólido do filme de amido e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas 36a,b, A-36a e A-36b, à temperatura ambiente.....	56
Figura 27- Imagem representativa dos filmes resultantes da imobilização das porfirinas 36a,b em filmes de quitosana.....	58
Figura 28- Espectros de absorção no estado sólido do filme de quitosana e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas 36a,b, Q-36a e Q-36b, à temperatura ambiente.	59

Figura 29- Espectros de absorção no estado sólido dos materiais CN e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas 36a,b em CN_b (A), CN_m (B) e CN_{ex} (C), à temperatura ambiente.	63
Figura 30- Espectros de absorção, em PBS, dos PSs 36a (A) e 36b (B) a 0,5 µM, e das suas formulações em PVP, PVP-36a (C) e PVP-36b (D) a 5 µM, após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm ² , à temperatura ambiente.	69
Figura 31- Espectros de absorção, em PBS, dos PSs A-36b (A), Q-36b (B) e CN_{ex}-36b (C) a 25 µM, após 0 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm ² , à temperatura ambiente.	70
Figura 32- Fotodecomposição do DFibF (50 µM) através da ação do ¹ O ₂ gerado pelos PSs 36a,b a 0,5 µM , pelas formulações PVP-36a e PVP-36b a 0,5 µM, pela TPP e PVP a 0,5 µM, quando sujeitos a uma irradiação de luz vermelha (654 ± 20 nm) com uma irradiância de 11,0 mW/cm ² , durante 10 minutos, à temperatura ambiente.	71
Figura 33- Fotodecomposição do DFibF (50 µM) através da ação do ¹ O ₂ gerado pelos A-36a e A-36b a 20 µM, pelos Q-36a e Q-36b a 20 µM, e pelos (A) e (Q) sem a incorporação dos PSs 36a,b , quando sujeitos a uma irradiação de luz vermelha (654 ± 20 nm) com uma irradiância de 11,0 mW/cm ² , durante 30 minutos, à temperatura ambiente.	72
Figura 34- Monitorização da viabilidade da bactéria E. coli quando exposta aos PSs 36a,b a 20 µM (A) e a PVP-36a e PVP-36b a 40 µM (B), após 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm ² . CC -controlo claro; CE -controlos escuros.....	74
Figura 35- Monitorização da viabilidade da bactéria E. coli quando exposta a A-36a e Q-36a a 20 µM, após 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm ² . CC -controlo claro; A -filme de amido sem a imobilização do PS 36a ; Q - filme de quitosana sem a imobilização do PS 36a	75
Figura 36- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta aos PSs 36a,b a 0,5 µM (A) e a PVP-36a e PVP-36b , a 5 µM (B) após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm ² . CC -controlo claro; CE -controlos escuros.....	77
Figura 37- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta a A-36a e A-36b (A) e Q-36a e Q-36b (B), a 25 µM após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm ² . CC -controlo claro; CE -controlos escuros; A -filme de amido sem a imobilização dos PSs 36a,b ; Q - filme de quitosana sem a imobilização dos PSs 36a,b	78
Figura 38- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta a CN_b-36a e CN_b-36b (A), CN_m-36a e CN_m-36b (B) e CN_{ex}-36a e CN_{ex}-36b (C), a 25 µM após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm ² . CC -controlo claro; CE -controlos escuros; CN_{b,m,ex} - materiais CN sem a imobilização dos PSs 36a,b	80
Esquema 1- Diferentes métodos de síntese de porfirinas meso-tetra-arilsubstituídas.	25
Esquema 2- Síntese da TPP-CHO	47
Esquema 3- Síntese dos derivados porfirina-imidazol neutros 35a,b através da reação de Radziszewski.....	49
Esquema 4- Síntese dos compostos 36a,b através da alquilação dos compostos 35a,b	50
Esquema 5- Representação esquemática da incorporação dos PSs 36a e 36b em micelas de PVP, PVP-36a,b	53
Esquema 6- Representação esquemática da preparação dos híbridos A-36a,b através da imobilização dos PSs 36a,b em filmes de amido.	55

Esquema 7- Representação esquemática da preparação dos híbridos Q-36a,b através da imobilização dos PSs 36a,b em filmes de quitosana.....	58
Esquema 8- Representação esquemática da imobilização dos PSs 36a,b em nitreto carbono gráfico, CN_{b,m,ex}-36a,b	61
Esquema 9- Degradação do DFiBF em 1,2-Dibenzoibenzeno por ação do ¹ O ₂	71

Lista de abreviaturas e símbolos

- **CC**- Controlo claro
- **CE**- Controlo escuro
- **Cu(II)-TPP**- Complexo de cobre(II) da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina
- **DDQ**- 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
- **DFiBF**- 1,3-difenilisobenzofurano
- **DMF**- *N-N'*-dimetilformamida
- **DOX**- Doxorrubicina
- **EDTA**- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **EPS**- Substâncias poliméricas extracelulares
- **EtOH**- Etanol
- **g-C₃N₄**- Nitreto Carbono Grafítico
- **GlcN**- D-glucosamina
- **GlcNAc**- N-acetil-D-glucosamina
- **GQDs**- *Quantum dots*
- **ISC**- Cruzamento de intersistemas
- **IUPAC**- International Union of Pure and Applied Chemistry
- **LED**- Diodo emissor de luz
- **LPS**- Lipopolissacarídeos
- **MB**- Azul de metileno
- **Min.**- Minutos
- **MRSA**- *S. Aureus* resistente à meticilina
- **O₂^{•-}**- anião superóxido
- **¹O₂**- Oxigénio singleto
- **³O₂**- Oxigénio molecular
- **OH[•]**- radicais hidroxilos livres
- **PBS**- Tampão Fosfato-Salino
- **PDI**- Terapia fotodinâmica antimicrobiana
- **PDT**- Terapia fotodinâmica
- **PPM**- Partes por milhão
- **PS**- Fotossensibilizador
- **PVP**- Polivinilpirrolidona
- **RMN**- Ressonância magnética nuclear
- **ROS**- Espécies reativas de oxigénio
- **TFA**- Ácido trifluoroacético
- **TLC**- Cromatografia em camada fina
- **TPP**- 5,10,15,20-tetrafenilporfirina
- **TPP-CHO**- 2-formil-5,10,15,20-tetrafenilporfirina
- **TSA**- Trypticase Soy Agar
- **TSB**- Tryptic Soy Broth
- **UV-Vis**- Ultravioleta-Visível
- **γ-ZrP**- γ-fosfato de zircónio

- **Zn(II)-Ft-** Complexo de Zn(II) da ftalocianina

1. Introdução geral

As infecções bacterianas têm vindo a revelar-se uma preocupação crescente e urgente de resolver para a comunidade científica, não só no meio clínico, mas também em outras áreas, como a alimentar. Este tipo de infecções é responsável por uma taxa de mortalidade elevada, principalmente, em pacientes que foram sujeitos a intervenções cirúrgicas ou que apresentam lesões traumáticas.¹ Estes microrganismos possuem a habilidade de se reproduzirem rapidamente alterando o seu DNA através de mutações genéticas aumentando, em cada nova geração, a capacidade de resistência aos antibióticos.² As bactérias possuem mecanismos de resistência aos antibióticos, que são responsáveis pela diminuição da eficiência destas drogas. Estes mecanismos podem ser inatos ou adquiridos a partir de outros microrganismos, sendo que os principais são: 1) limitação da captação da droga; 2) alterações nos alvos da droga; 3) inativação da droga e 4) efluxo ativo da droga.¹ A formação de biofilmes é também uma das principais causas responsáveis pelo aumento da resistência microbiana.³ As adaptações constantes por parte das bactérias, aliadas à prescrição inadequada e consumo exacerbado de antibióticos, provocaram, junto da comunidade científica, a necessidade de desenvolver novas metodologias no combate a estes microrganismos.⁴

1.1-Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (PDI) tem-se demonstrado muito eficiente no processo de inativação de um vasto espectro de microrganismos, mesmo naqueles que apresentam resistência aos antibióticos ou que possuem a capacidade de formar biofilmes, sendo considerada uma alternativa aos antibióticos.⁵ A PDI assenta na combinação de um fotossensibilizador não-tóxico (PS), luz e oxigénio molecular ($^3\text{O}_2$), com o intuito de gerar espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que são extremamente tóxicas para os microrganismos.⁵ O diagrama de Jablonski (Figura 1), ilustra os diversos estados energéticos de uma molécula e a transição entre eles. Quando o PS é excitado, através da irradiação com luz, num determinado comprimento de onda, passa de um estado fundamental (S_0) para um estado excitado (S_1), o qual apresenta um tempo de vida

reduzido (10^{-6} a 10^{-9} segundos).⁶ Neste estado excitado, o PS pode voltar ao estado fundamental, com emissão de fluorescência ou, através de um processo de cruzamento de intersistemas (ISC), transitar para um estado tripleto de menor energia (T_1), que apresenta um tempo de vida mais longo (microsegundos).⁵ Este tempo de vida mais longo permite que o PS participe em reações através de dois mecanismos distintos, Tipo I ou Tipo II.⁷ No Tipo I, o PS promove a transferência de elétrons para os substratos biológicos resultando na formação de $O_2^{\bullet-}$ que pode sofrer dismutação em H_2O_2 , que é um precursor dos radicais hidroxilos OH^{\bullet} .⁸ Já o mecanismo de Tipo II é caracterizado pela transferência de energia do PS para o 3O_2 convertendo-o em 1O_2 . O decaimento do PS, no estado T_1 , para o estado fundamental pode também ocorrer ainda por via radioativa, com emissão de fosforescência.⁹

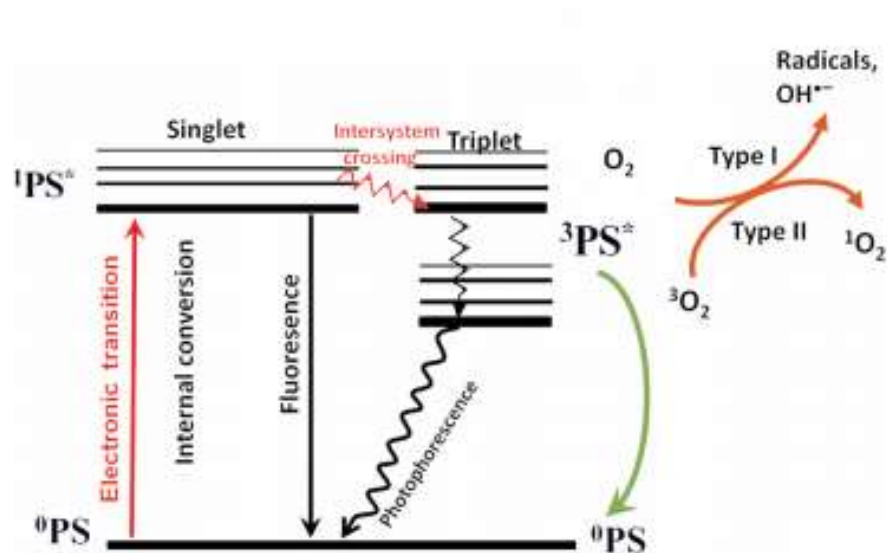


Figura 1- Diagrama de Jablonski. Adaptado de [8].

De entre as diversas vantagens da PDI quando comparada às técnicas anteriormente utilizadas, a potencial falta de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos parece ser a mais preponderante. Uma vez que o PS não necessita de penetrar nos microrganismos para se iniciar a fotoinativação, sendo a adesão às diferentes estruturas suficiente para que esta se mostre eficiente, estes não conseguem desenvolver mecanismos de resistência tais como, a diminuição da absorção do PS ou o aumento da

taxa de saída deste.¹⁰ Dado que as ROS apresentam um tempo de meia-vida bastante reduzido e, conseqüentemente, são bastante reativos, apenas estruturas e moléculas próximas da área da formação destes são diretamente danificadas. Esta particularidade permite direcionar o efeito danoso da técnica para os microrganismos, evitando a danificação de células hospedeiras.¹¹

Apesar desta técnica não apresentar alvos específicos, julga-se que as estruturas externas, membranas citoplasmáticas e paredes celulares são as mais afetadas.¹² O carácter oxidativo das ROS conduz a danos irreversíveis em diversos componentes vitais da célula como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Os danos nestas estruturas originam a libertação do conteúdo celular e a conseqüente inativação de sistemas de transportes membranares e enzimas.¹³ O efeito provocado pelo dano nos ácidos nucleicos depende do tipo de microrganismos, nomeadamente da capacidade do sistema de reparação de DNA, não sendo este considerado uma das principais causas da fotoinativação. Existem relatos na literatura que sustentam esta afirmação, tendo já sido demonstrado que a bactéria *Deinococcus radiodurans*, a qual apresenta um sistema de reparação de DNA bastante eficiente, é facilmente fotoinativada pela PDI.^{14,15} Existem algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase que têm a capacidade de conferir proteção contra alguns ROS, nomeadamente às geradas através do mecanismo Tipo I.⁸ No entanto, este mecanismo de defesa baseado na ação destas enzimas, não consegue anular a ação do $^1\text{O}_2$, gerado através do mecanismo de Tipo II.⁸

A eficácia da inativação de bactérias do tipo Gram-negativo e Gram-positivo é fortemente influenciada pela estrutura do PS. De um modo geral, PSs neutros, aniónicos ou catiónicos demonstram elevada eficácia na inativação de bactérias de Gram-positivo. No entanto, a resistência por parte das bactérias de Gram-negativo é, significativamente, superior à apresentada pelas de Gram-positivo.¹⁶ Esta diferença de suscetibilidades é explicada pela diferente composição estrutural da parede celular das bactérias (Figura 2).¹⁷ A grande maioria das bactérias de Gram-positivo apresentam uma única parede celular predominantemente constituída por peptideoglicanos e ácidos teicóicos e lipoteicóicos que concedem um elevado grau de porosidade, permitindo a passagem dos PS. Já as bactérias de Gram-negativas, para além de apresentarem uma parede celular composta por peptideoglicanos, dispõem de uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos (LPS) que impossibilita a passagem dos PS e outros agentes antimicrobianos.¹² As soluções encontradas para solucionar este problema passam pela

utilização de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou nonapetido da polimixina B que promovem a disrupção da membrana extracelular, ou pela escolha de PSs catiónicos.¹¹ A interação eletrostática entre a carga positiva do PS e as cargas negativas do fosfato presente nos LPS da membrana externa, promove a desestabilização da organização estrutural da parede celular resultando numa maior eficiência do tratamento.¹⁸ Dado que as células bacterianas apresentam, na sua superfície, uma maior presença de cargas negativas, em relação às células mamíferas, a escolha deste tipo de PSs com carga positiva permite uma taxa de penetração superior e, ao mesmo tempo, evita a morte de células não-nocivas.¹¹

As diferenças de suscetibilidade apresentadas pelas diferentes espécies de mesmo Gram são mais complexas de explicar. Investigadores julgam que fatores como o tamanho da célula microbiana, permeabilidade das membranas e a presença de enzimas antioxidantes podem influenciar a eficiência da terapia.¹¹ A densidade bacteriana é também um fator importante na eficiência da terapia.¹⁹ Uma curva típica de crescimento bacteriano apresenta-se dividida em 4 etapas distintas (fase de latência; fase exponencial; fase estacionária e fase de decréscimo) demonstrativas da densidade celular. As bactérias são mais suscetíveis à terapia fotodinâmica quando se encontram na fase exponencial (ou fase log). Por outro lado, na fase estacionária, as bactérias apresentam uma maior resistência ao tratamento, uma vez que a competição pela ligação ao PSs e a reação com as espécies citotóxicas são influenciadas.²⁰

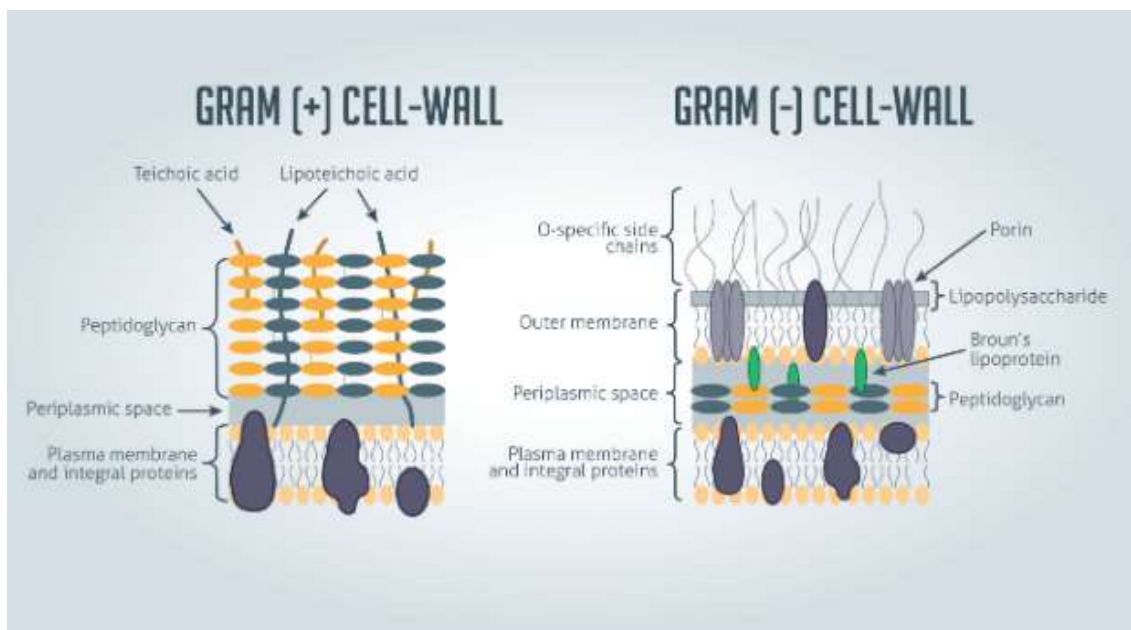


Figura 2- Estrutura das paredes celulares de bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo. Adaptado do site: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>.

Dos 3 elementos necessários para a fotoinativação através da PDI, o PS é aquele que aufere maior preponderância. Um PS ideal, segundo a literatura, deve obedecer a uma série de características entre as quais se destaca: alto rendimento quântico para a geração de oxigénio singlete; ter um espectro de absorção coincidente com o espectro de emissão da fonte de luz; fotoestabilidade; geração eficiente de ROS; apresentar carácter anfifílico; ser seletivo para os tecidos (ou células) alvo; ser solúvel em meio aquoso e apresentar um método de síntese económico e simples.^{21,22} Assim sendo, a busca pelo PS ideal tem motivado, nos últimos anos, uma investigação cuidadosa e incessante por parte da comunidade científica. A grande maioria dos PSs, apresenta uma estrutura baseada no macrociclo tetrapirrólico tipicamente encontrado em compostos como porfirinas, clorinas bacterioclorinas e ftalocianinas.²³ As porfirinas, apresentam diversas propriedades físico-químicas que suscitam a atenção de diversas áreas científicas. De entre as diversas áreas de aplicação destes macrociclos, tais como, agentes de contraste para imagem de ressonância magnética, sensores, catálise, materiais eletrónicos e células solares fotovoltaicas, a sua aplicação na Medicina, nomeadamente em PDI ou PDT (terapia fotodinâmica), é a que atrai mais foco por parte dos investigadores.²⁴⁻²⁶ A elevada capacidade que esta classe de compostos, geralmente, apresenta para produzir oxigénio

singleto, confere-lhes notáveis potencialidades em atuarem como PSs.^{18,27-29} A aplicação desta classe de *N*-heterocíclis aromáticos nestas técnicas, tem estimulado a síntese de diversos análogos sintéticos com diferentes propriedades físicas, químicas e eletrônicas adequadas às diferentes condições de fotoativação.

1.2-Porfirinas

Os macrociclos tetrapirrólicos ocorrem na natureza e estão presentes numa grande variedade de sistemas vivos. Estes fazem parte de algumas estruturas biológicas de elevada importância, participando em processos bioquímicos vitais para os organismos que as possuem.³⁰ A hemoglobina e a mioglobina, proteínas funcionais responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio no sangue e tecidos musculares, respectivamente, possuem na sua estrutura, pelo menos, um grupo *heme* (Figura 3).³¹ Este é formado por quatro anéis do tipo pirrólico ligados entre si por pontes metínicas formando um macrociclo porfirínico.³² No grupo *heme* os átomos de azotos presentes no interior do macrociclo estão coordenados a um átomo de ferro(II). As clorofilas (Figura 3) são responsáveis pela fotossíntese, processo pelo qual se obtém energia química a partir de energia solar.³¹ Estas são constituídas, também, por um macrociclo porfirínico em que uma das unidades pirrólicas se encontra na sua forma reduzida e os átomos de azoto encontram-se coordenados a um átomo de magnésio(II).

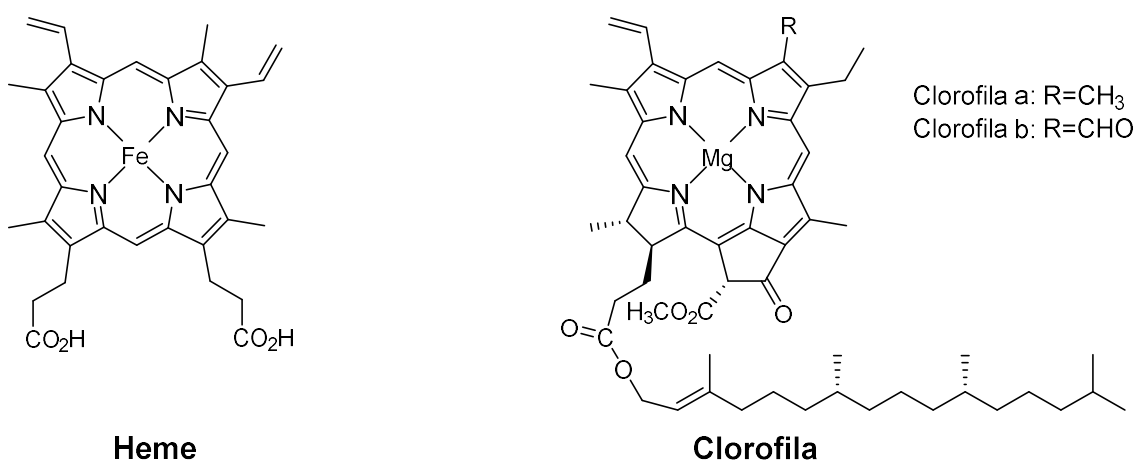


Figura 3- Estrutura química do grupo heme e da clorofila.

Estruturalmente, as porfirinas são compostas por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas. Estas pontes metínicas são designadas de posições *meso*, enquanto que as posições β dos anéis pirrólicos designam-se por posições β -pirrólicas.³³ Atualmente, existem dois sistemas de nomenclatura aceites para os macrociclos tetrapirrólicos. A nomenclatura semi-trivial proposta por H. Fischer (Figura 4) e, a mais recente, estabelecida pela IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Figura 4).³⁴ No sistema introduzido por H. Fischer os anéis pirrólicos são designados por A, B, C e D, sendo que os carbonos na periferia dos anéis designam-se por β -pirrólicos tendo uma numeração de 1 a 8. Os carbonos metínicos (que estabelecem ligações entre os anéis pirrólicos) situam-se nas posições *meso* sendo representados pelas letras gregas α , β , γ e δ .³⁵ Já no sistema proposto pela IUPAC, os carbonos são numerados de 1 a 20 e os azotos pirrólicos de 21 a 24. Os carbonos são designados de forma diferente consoante a posição em que se encontram. As posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 correspondem aos carbonos β e são denominadas por posições β -pirrólicas, enquanto que as posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 correspondem aos carbonos α dos anéis pirrólicos. As posições 5, 10, 15 e 20 são designadas por posições *meso* do macrociclo porfirínico.³³ Quando o macrociclo é substituído, os grupos substituintes são referenciados pelo número do átomo de carbono ao qual se encontram ligados e ordenados alfabeticamente.

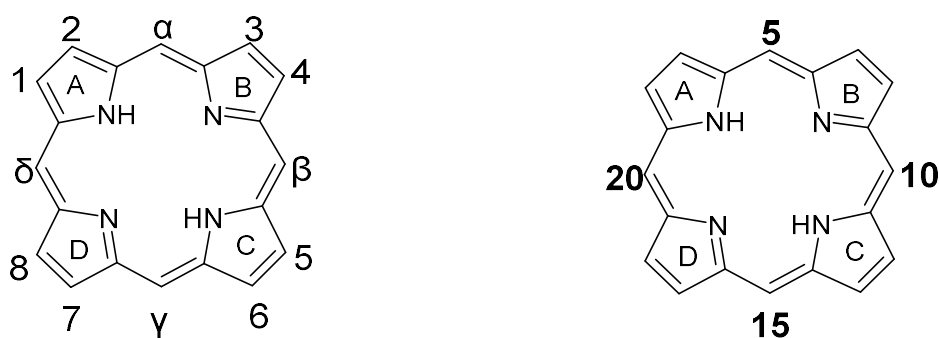


Figura 4- Sistemas de nomenclatura propostos por Fischer e IUPAC, respetivamente.

O macrociclo porfirínico é um sistema altamente conjugado podendo ser representado por duas estruturas de ressonância. Apesar dos vinte e dois eletrões π que o constituem seguirem a regra de Hückel para a aromaticidade ($4n + 2$), apenas dezoitos

deles se encontram em condição para se deslocalizarem em torno do macrociclo.³⁰ Assim os quatro elétrons π restantes podem reagir formando clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas (Figura 5).³⁶

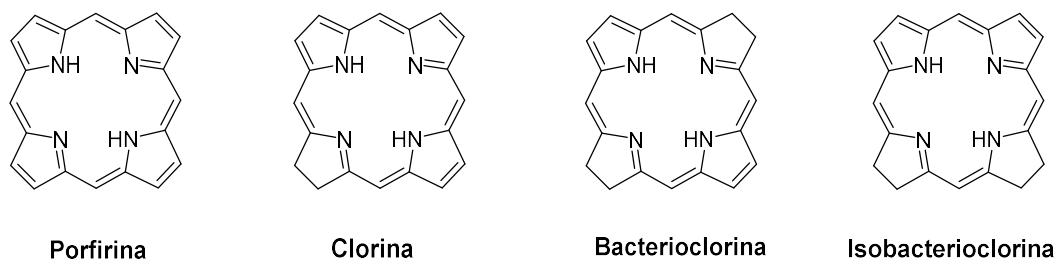


Figura 5- Exemplo de núcleos tetrapirrólicos.

As porfirinas são compostos altamente corados devido à elevada conjugação que apresentam, sendo assim os espectros de ultravioleta-visível (UV-Vis) outra característica importante destes compostos. As *meso*-tetra-arilporfirinas na sua forma de base livre apresentam uma banda de absorção de elevada intensidade no intervalo dos 400-450 nm designada por banda Soret, e a ainda um conjunto de 4 bandas de menor intensidade na região dos 450-700 nm designadas por bandas Q, que são identificadas como I, II, III e IV (Figura 6).³⁶ Porém, estas características são influenciadas tanto pelo número, posição e tipo dos grupos substituintes que se encontram nas posições periféricas, assim como pelo ambiente eletrónico no interior do macrociclo.

Os núcleos porfirínicos apresentam um espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de protão muito característico que se deve à forte deslocalização dos elétrons π do anel, protegendo os protões do interior e desprotegendo os do exterior. Assim sendo, o sinal de ressonância dos protões N-H aparecem a campos altos com um desvio químico entre δ -2 e δ -4 ppm, enquanto que os protões β -pirrólicos aparecem a campos mais baixos com um desvio químico entre δ 10 e δ 8 ppm.³⁷ Quando uma das unidades pirrólicas se encontra reduzida, como no caso da clorina, a diminuição da conjugação resulta num aumento no desvio químico dos protões N-H e numa diminuição no desvio químico dos protões β -pirrólicos. No caso da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP), os sinais de ressonância dos protões dos grupos substituintes aromáticos aparecem entre δ 6 e δ 8 ppm.³⁷

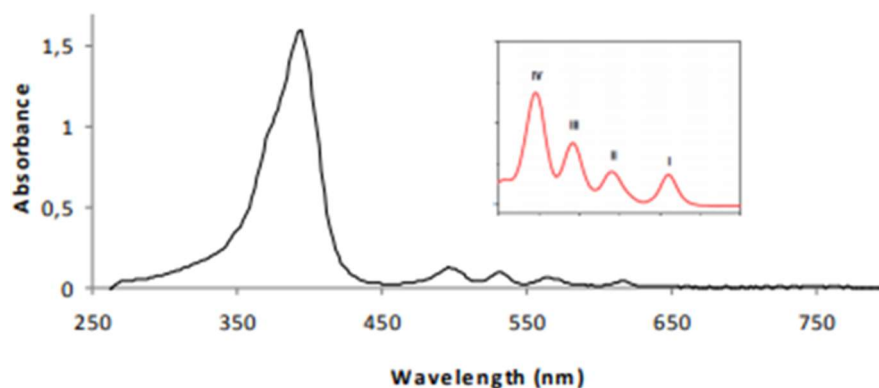


Figura 6- Espectro UV-Vis característico de *meso*-tetra-arilporfirinas na forma de base livre.

Sendo as porfirinas compostos aromáticos, estas sofrem o mesmo tipo de reações de substituição eletrofílica características destes, como halogenação, formilação, nitração, sulfonação e alquilação.^{30,38} Este tipo de reações pode ocorrer tanto nas posições β como nas posições *meso*-pirrólicas. As porfirinas livres contêm, no seu interior, 2 átomos de azoto com carácter ácido (ligados a 2 hidrogénios) e 2 átomos de azoto com carácter básico, que proporcionam um carácter anfotérico a estes compostos. Em meio básico os dois azotos perdem os seus protões originando um di-anião e em meio fortemente ácido todos átomos de azoto encontram-se protonados originando um dicatião.³⁸ Estes azotos internos permitem uma outra reação característica destes macrociclos, que envolve a complexação com uma vasta série de iões metálicos com diferentes estados de oxidação, como Fe(II), Cu(II) e Ni(II), entre outros.³³ Este tipo de reação forma metaloporfirinas e permite não só a proteção dos átomos de azoto internos relativamente ao ataque de espécies electrofílicas e ao uso de bases fortes, como também afeta a reatividade dos macrociclos tetrapirrólicos.

1.2.1-Métodos de síntese

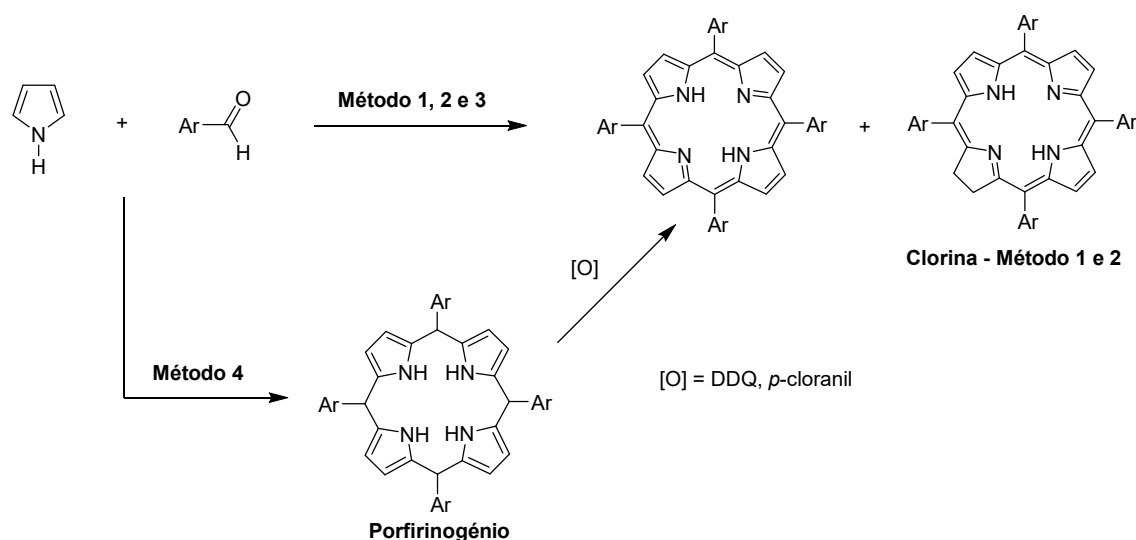
A síntese de porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas (Esquema 1), o tipo de macrociclo usado neste projeto, teve a sua origem com Paul Rothmund, que em 1935, descreveu a síntese da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP). Em 1941, esta porfirina foi

sintetizada através da condensação do pirrol com benzaldeído em piridina a 220 °C durante 48 horas em condições anaeróbicas, obtendo-se como produto principal a TPP. Sob estas condições obtiveram-se rendimentos bastante baixos, por norma abaixo dos 10%, além de que a porfirina isolada se encontrava contaminada com a respetiva clorina.³⁹ Com o objetivo de melhorar os resultados obtidos por Rothmund, Adler e Longo sintetizaram a TPP através da condensação do pirrol com o benzaldeído em meio ácido (ácido propiónico) e em condições aeróbicas. A reação foi realizada sob refluxo a 140 °C durante 30 min., obtendo-se rendimentos na ordem dos 20%. Apesar da melhoria em termos de rendimento, a porfirina isolada continuava a se encontrar contaminada com a respetiva clorina.⁴⁰ De forma a minimizar a presença de clorina, Smith sugeriu o tratamento da mistura reacional com um agente oxidante, como por exemplo, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ).⁴¹

Com o intuito de contornar os problemas obtidos nos métodos anteriores, Lindsey desenvolveu um método dividido em duas etapas.⁴² A primeira etapa é baseada na condensação do pirrol com o aldeído, em diclorometano, à temperatura ambiente na ausência de oxigénio e luz, na presença de um catalisador, como o ácido trifluoroacético (TFA) ou o eterato de trifluoreto de boro (BF₃), maximizando assim a formação do porfirinogénio, uma forma reduzida da porfirina. Numa segunda etapa, o porfirinogénio obtido é oxidado à correspondente porfirina (no caso de se usar benzaldeído, TPP) através da utilização de um agente oxidante como a DDQ ou *p*-cloranil. Este método possibilitou a obtenção de rendimentos entre os 30% a 40%, permitindo ainda utilizar aldeídos que eram sensíveis às condições ácidas propostas por Adler e Longo. Posteriormente, em 1991, Gonsalves e colaboradores, demonstraram que se poderiam sintetizar porfirinas *meso*-substituídas, como a TPP, em apenas um passo e sem a presença de clorina. A síntese era conseguida através da condensação do pirrol com o aldeído apropriado, numa mistura de ácido acético, ou ácido propiónico, e nitrobenzeno em refluxo.⁴³ O uso de nitrobenzeno tem como propósito a oxidação do porfirinogénio à respetiva porfirina, evitando a formação de clorina. Uma vantagem adicional destas condições reacionais está na cristalização direta da porfirina no meio reacional, obtendo-se um rendimento na ordem dos 50%.

Nos últimos anos, a síntese de algumas porfirinas tem sido descrita através da utilização da irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento. Esta metodologia sintética, para além de diminuir o tempo de reação, reduz os custos do processo e o

impacto ambiental uma vez que utiliza um volume mínimo de solvente.⁴⁴ Em 2014, Pereira e colaboradores, desenvolveram um método que permite a síntese de porfirinas usando água como aditivo, sob irradiação de micro-ondas. Os autores concluíram que as condições ótimas de reação para a síntese da TPP envolviam a condensação do pirrol com o benzaldeído usando água sob irradiação de micro-ondas, a 200 °C e com pressão superior a 16 bar, durante 10 min., obtendo-se a TPP em rendimentos na ordem dos 27%.⁴⁵ Uma vez que o pirrol e o aldeído se encontram em altas concentrações, podemos considerar a água adicionada à reação como um aditivo para ambos, promovendo assim a ativação ácida do grupo carbonilo e a oxidação do porfirinogênio. Podemos assim considerar que a água assume um papel de solvente, catalisador ácido e oxidante.⁴⁵



Método 1- P. Rothmund: piridina, 220 °C, 48 h, sistema fechado.

Método 2- Adler e Longo: meio ácido (CH₃CH₂CO₂H ou CH₃CO₂H); 140 °C; 30 min.

Método 3- R. Gonsalves: CH₃CO₂H; C₆H₅NO₂; 120 °C; 1h.

Método 4- Lindsey: 1) CH₂Cl₂, catalisador ácido; 2) agente oxidante.

Esquema 1- Diferentes métodos de síntese de porfirinas *meso*-tetra-arylsubstituídas.

1.3- Efeito fotodinâmico antibacteriano de porfirinas catiônicas *meso*-substituídas

Existem, na literatura, diversos exemplos que mostram a utilização de porfirinas *meso*-catiônicas como PSs, em solução, na fotoinativação de diversos microrganismos

resistentes através da PDI. Taşlı e colaboradores⁴⁶, estudaram a eficiência de 4 porfirinas tetra catiônicas (Figura 7) na fotoinativação da bactéria de Gram-positivo MRSA. Os autores usaram como fonte de irradiação um laser de diodo (665 nm) e avaliaram qual seria a combinação de concentração do PS e dose de energia de irradiação que promoveria um maior impacto na viabilidade da MRSA. Estes comprovaram que a combinação era diferente para os PSs, tendo registrado que, à exceção do PS **1b**, todos os PSs necessitavam de uma dose de energia de 150 J/cm² para promover um decréscimo de 6,33 logs na viabilidade da MRSA, sendo que o PS **1a** se encontrava a uma concentração de 200 µM e os PSs **1c,d** a uma concentração de 12,5 µM. O PS **1b** revelou que a combinação mais eficiente era atingida quando este se encontrava a 50 µM irradiado sob uma dose de energia de 50 J/cm² promovendo um decréscimo de 7,01 logs na viabilidade da bactéria. Os autores demonstraram ainda diferentes combinações de concentração do PS e dose de energia que provocavam reduções significativas na densidade bacteriana. Na presença dos PSs **1a-d** a 100 µM, sob uma dose de energia de 25 J/cm² os autores observaram decréscimos na viabilidade bacteriana de 2,63, 4,13, 3,69 e 5,54 respectivamente. Com este estudo, é possível constatar que estes PSs catiônicos, em diferentes combinações de concentração e dose de energia, têm a capacidade de promover decréscimos significativos na viabilidade da MRSA. Por outro lado, podemos também observar que é possível a obtenção de reduções significativas na viabilidade da bactéria com concentrações mais reduzidas do PS, desde que se promova um aumento na dose de energia de irradiação.

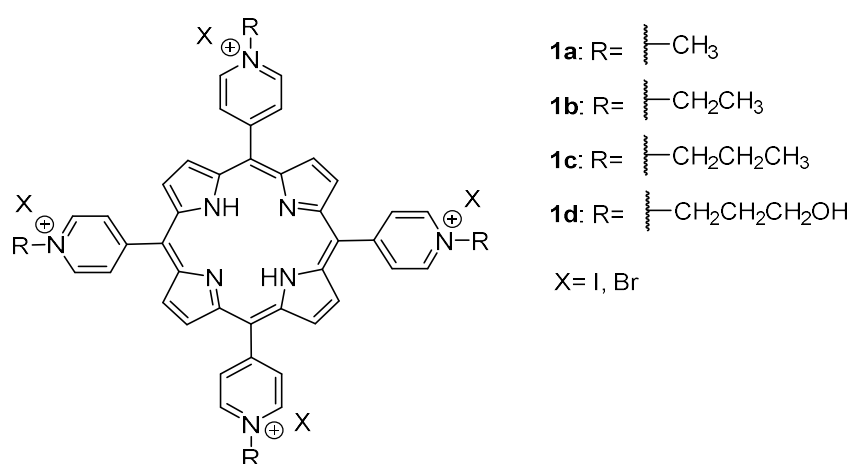


Figura 7- Estrutura do PS 1.

Banfi e colaboradores⁴⁷, testaram a eficiência de seis porfirinas *meso*-catiônicas e uma porfirina neutra (Figura 8) na fotoinativação de bactérias de Gram-negativo, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e de Gram-positivo, *S. aureus*. Os PSs foram testados a diferentes concentrações e irradiados com luz branca (380-780 nm) fornecida por uma lâmpada de halogéneo-tungstênio com uma potência de 500W. O estudo consistia na avaliação da eficiência das porfirinas tetra catiônicas **2-6**, di-catiônica **7** e neutra **8** na fotoinativação de 3 estirpes bacterianas. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato-salino (PBS), sendo que o tempo total de irradiação foi 60 min. para as bactérias de Gram-negativo e 30 min. para a bactéria de Gram-positivo. Os autores comprovaram que a bactéria *S. aureus* foi a que apresentou menor resistência ao tratamento, seguida da *E. coli* e da *P. aeruginosa*. Estas diferenças de suscetibilidade são relativas às diferentes composições da parede celular entre as bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo. O PS **8** demonstrou ser o menos eficiente na fotoinativação das 3 estirpes bacterianas, quando comparado aos restantes PSs. Este resultado é explicado pela ausência de carga(s) positiva(s) na periferia da porfirina, afetando a interação entre o PS e a parede celular da bactéria. Os PSs **4-7** demonstram ser mais eficientes que os PSs **2,3** induzindo, em geral, decréscimos superiores na viabilidade das bactérias. Enquanto que na presença dos PSs **2** e **3**, a 7,33 μM , se registou uma redução de, aproximadamente, 4 logs na viabilidade da *E. coli*, foram necessárias concentrações bastante mais reduzidas dos PSs **4-7** (0,4 a 1,7 μM) para promover um decréscimo semelhante. Apesar dos PSs **2-6** apresentarem na sua estrutura quatro cargas positivas, esta diferença de eficácia está relacionada com as estruturas dos mesmos, isto é, os PSs **4-6** contêm um grupo benzil ligado ao nitrogénio do piridil, que providencia um aumento da lipofilicidade destes compostos. O PS di-catiônico **7** demonstrou ser mais eficiente que os PSs tetra-catiônicos, tendo mesmo observado uma diminuição de 7 logs na viabilidade da *P. aeruginosa*, a uma concentração de 7,33 μM . De forma a induzir uma diminuição de 3 logs, foi necessário preparar soluções com concentrações superiores a 35 μM para as porfirinas **2,3** e **6**, e uma redução de, aproximadamente, 6 logs foi obtida na presença dos PS **4** e **5** em concentrações de 15 μM . Esta diferença de eficácia pode ser explicada pelo maior carácter anfifílico que o PS **7** apresenta em relações aos PSs tetra-catiônicos.

Após este estudo, os autores concluíram que a presença de carga(s) positiva(s) é essencial para uma eficiente fotoinativação, principalmente quando se trata de estirpes bacterianas de Gram-negativo. Os investigadores poderam ainda observar que a

introdução de grupos aromáticos, como o benzil, aumenta a lipofilicidade dos compostos, aumentando a eficiência no tratamento dos mesmos.

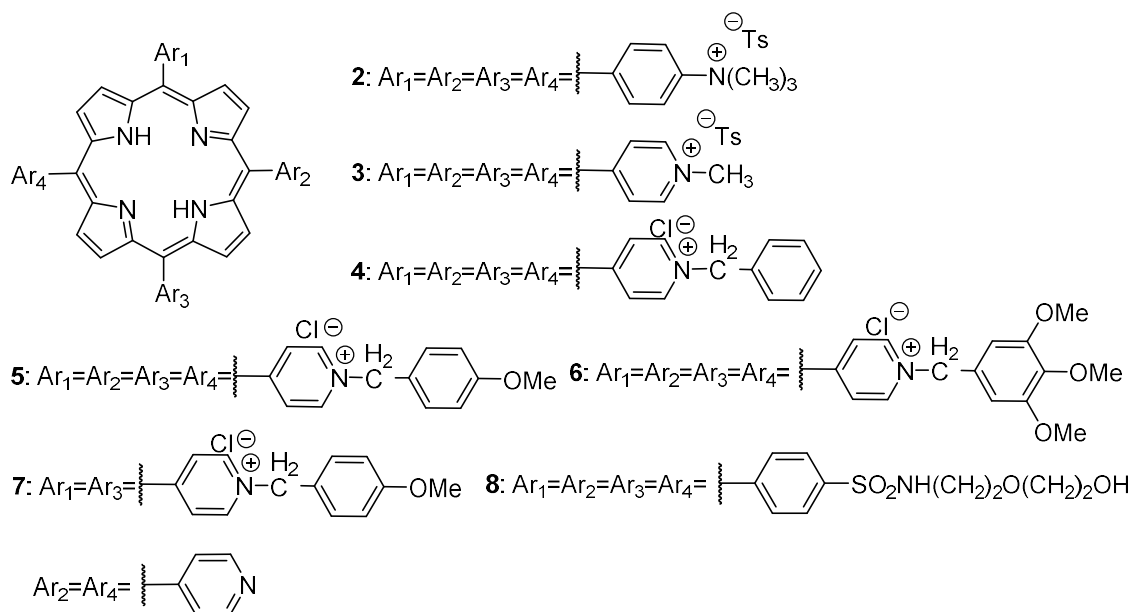


Figura 8- Estruturas dos PSs 2-8.

Investigadores da Universidade de Aveiro demonstraram a fotoinativação do fungo *Candida albicans* através da PDI.⁴⁸ Os autores estudaram a eficiência do PS **12** e de uma formulação (**FORM**) (Figura 9) que consistia na mistura de 5 *meso* porfirinas com diferente número de cargas (**9-13**), na fotoinativação da *C. albicans* no plasma e no sangue, com o intuito de comparar os resultados obtidos pelos mesmos com os obtidos pelo azul de metileno (MB), que é considerado um PS eficiente na fotoinativação de microrganismos no plasma (Figura 9). Inicialmente, os investigadores começaram por avaliar a eficiência dos PSs, em PBS, sob irradiação de uma luz branca com uma potência de 2,5 mW/cm². O PS **FORM** demonstrou ser o mais eficiente, pois induziu um decréscimo na viabilidade da bactéria até ao limite de deteção do método ao fim de 30 min. Os PSs **12** e **13**, a 5 µM, mostraram-se eficientes, tendo alcançado o limite de deteção da metodologia após 180 e 270 min., respetivamente. De seguida, os autores avaliaram o efeito da concentração dos PSs na fragilidade osmótica dos eritrócitos de forma a seleccionar a que concentrações poderiam ser usados os PS em PDI, sem promover dano nos componentes sanguíneos. Após este estudo, os PSs **FORM**, **12** e MB foram avaliados a 5 e 10 µM na fotoinativação da *C. albicans* no plasma, sob uma irradiação de luz branca com uma irradiância de 150 mW/cm². O PS **12** demonstrou ser o mais eficiente, tendo

promovido um decréscimo de 2,5 logs na viabilidade do fungo ao fim de 270 min. de irradiação, enquanto que a **FORM** e o MB induziram reduções de 1,7 e 0,5 logs, respetivamente, na viabilidade do fungo ao fim de 270 min. de irradiação. Após o tratamento do plasma através da PDI, os autores avaliaram se este induziria algum dano na membrana dos eritrócitos do recetor, simulando uma transfusão de sangue. Nenhum dos PSs utilizados, a 5 e 10 μM , promoveu a hemólise dos eritrócitos após 30 min. e 6 horas de incubação entre o plasma após a PDI e os componentes sanguíneos, em condições isotónicas (0,9% NaCl). Os autores avaliaram ainda a eficiência dos PSs **12** e **FORM**, sob as mesmas condições de irradiação do ensaio anterior, na fotoinativação do mesmo microrganismo, mas desta vez no sangue. Os resultados obtidos demonstram que os PSs **FORM** e **12** induziram um decréscimo de 0,7 logs na viabilidade do fungo, após 270 min. de irradiação, sendo que o decréscimo no sinal vital do fungo apenas começou após 180 e 90 min, respetivamente.

Com este estudo extensivo, os autores demonstraram que as porfirinas **12** e a **FORM** são potenciais PSs na fotoinativação do fungo *C. albicans* no plasma, tendo mesmo observado que estes promovem um decréscimo superior na viabilidade do fungo, quando comparado com o MB, que é considerado um PS eficiente na fotoinativação de microrganismos no plasma. Esta diferença de eficácia é explicada pela presença de apenas uma carga positiva na estrutura do MB, sendo que se encontra bem reportado na literatura que PSs com três ou quatro cargas positivas apresentam uma maior eficiência em PDI quando comparados com PSs mono catiónicos, nomeadamente em bactérias de Gram-negativo e fungos. Os investigadores também demonstram que o plasma, após o tratamento com os PSs **12** e **FORM** a 5 e 10 μM , não promovia danos significativos na membrana dos eritrócitos, em condições isotónicas, o que possibilita o uso destes PSs na desinfeção do plasma. Os resultados menos eficientes obtidos pelos PSs **12** e **FORM** na fotoinativação da *C. albicans* no sangue, foi explicada pela complexa matriz do mesmo, sendo necessários outros estudos de forma a contornar esta dificuldade, melhorando assim a eficiência do tratamento.

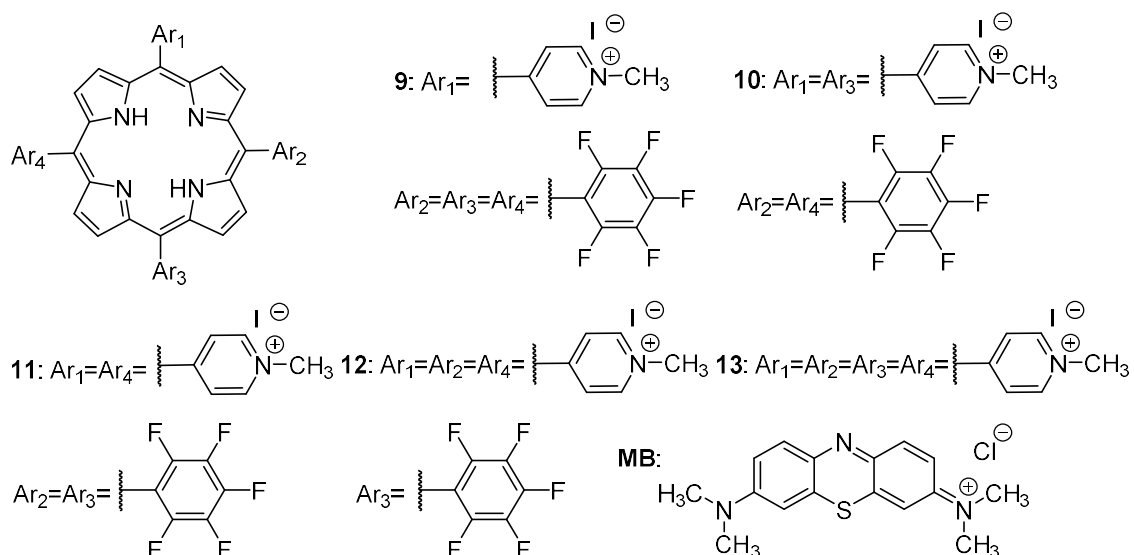


Figura 9- Estrutura dos PSs **9-13** e MB.

Hurst e colaboradores¹⁸, utilizaram quatro porfirinas com diferentes números de cargas positivas (Figura 10), com o intuito de avaliar o efeito da carga na fotoinativação da bactéria de Gram-negativo, *E. coli*, e o modo como influenciam a interação das mesmas com a parede celular da bactéria. Os autores avaliaram a eficiência dos PSs **14-17**, num intervalo de concentração de 0,01-10 μM , na fotoinativação da bactéria *E. coli* após 20 min. de irradiação com luz branca (400-700 nm) com irradiância de 44 J/cm^2 . Os resultados obtidos pelos investigadores, demonstram que os PSs **16** e **17** são bastante mais eficientes do que os derivados mono- e di-catiônicos. Quando estudados a 1 μM , apenas os PSs **16** e **17** promoveram um decréscimo na viabilidade da bactéria até ao limite de deteção, enquanto que o PS **15** apenas atingiu este decréscimo quando avaliado a 10 μM . O PS **14** não foi capaz de atingir o limite de deteção do método em nenhuma das concentrações estudadas. Este resultado pode ser explicado pela baixa solubilidade que, geralmente, os PSs mono-catiônicos apresentam, o que resulta na agregação dos mesmos e, conseqüente, redução da geração de $^1\text{O}_2$. Os resultados observados pelos autores, são indicativos da maior eficiência que os PSs tri- e tetra-catiônicos apresentam em relação aos PSs com duas ou uma carga, sendo que existem diversos relatos na literatura que corroboram esta constatação.^{29,49,50} Os autores avaliaram também, através de um ensaio de microscopia de fluorescência, o efeito do número de cargas na localização do PS. Desta forma, os PSs, a 1 μM , foram incubados com a suspensão bacteriana durante 30 min. e os resultados demonstraram que os PSs **14-16** encontram-se apenas localizados na membrana celular da bactéria, enquanto que o PS tetra-catiônico **17** é interiorizado pelas

células bacterianas. A presença de um elevado número de cargas resulta num aumento da porosidade dos LPS permitindo assim que ocorra a absorção do PS. A maior eficiência do PS **16** em relação ao PS **17**, uma vez que este foi o único que promoveu um decréscimo significativo na viabilidade da bactéria quando estudados a uma concentração de 0,01 μM , é explicado pelo maior carácter anfífilico que apresenta. O carácter anfífilico de um PS, juntamente com a capacidade do mesmo em gerar $^1\text{O}_2$ e a sua afinidade às células bacterianas, são parâmetros influentes na eficiência em PDI.⁴⁹

Os autores demonstraram assim a importância do número de cargas do PS na eficiência em PDI, uma vez que estas influenciam a interação entre o PS e a membrana celular da bactéria e a localização do mesmo durante o tratamento.

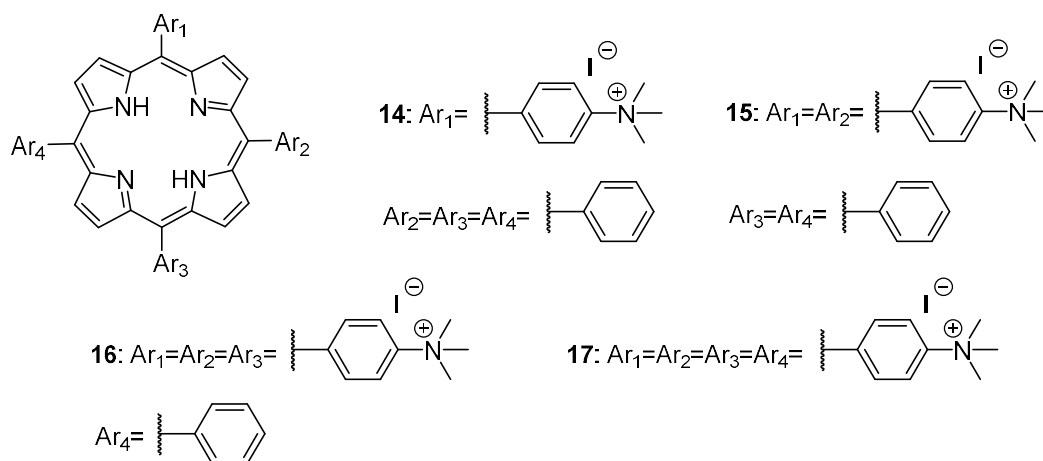


Figura 10- Estrutura dos PSs 14-17.

1.4-Efeito fotodinâmico antibacteriano de porfirinas catiónicas β -substituídas

O número de estudos encontrados na literatura sobre a fotoinativação de estirpes resistentes através da aplicação de porfirinas β -catiónicas em PDI, comparativamente às porfirinas *meso*-catiónicas, é bastante mais reduzido. No entanto, existem alguns que comprovam a sua eficácia.

Investigadores da Universidade de Aveiro sintetizaram e demonstraram o potencial de porfirinas mono-catiónicas β -funcionalizadas com núcleos imidazol (Figura 11) em atuarem como PSs na fotoinativação da bactéria de Gram-negativo bioluminescente, *E. coli*.²⁷ Os diferentes PSs foram estudados a diferentes concentrações (5, 10 e 20 μM), irradiados sob uma luz branca (380-700 nm) com irradiância de 25,0 W/m^2 , durante um período máximo de 240 min. O PS **18a** mostrou-se ser o mais eficiente, tendo induzido uma redução no sinal de bioluminescência de 4,1, 3,5 e 1,6 logs a 20, 10 e 5 μM , respetivamente. Já os derivados **18b** e **18c**, a 20 μM , provocaram uma diminuição na viabilidade de 3,7 e 3,2 logs, respetivamente, enquanto que a uma concentração de 10 μM , ambos promoveram uma redução de, pelo menos, 3,1 logs no sinal vital da bactéria. No entanto, quando estudados a uma concentração de 5 μM nenhum destes derivados se mostrou eficiente. As porfirinas **19** e **20**, mesmo a uma concentração de 20 μM , não causaram qualquer efeito fotoinativador na estirpe bacteriana ao fim de 240 min. de irradiância.

Os resultados obtidos por estes investigadores, são demonstrativos da eficiência destes derivados porfirínicos com núcleos imidazol em posições β em atuarem como PSs na fotoinativação de bactéria de Gram-negativo, nomeadamente *E. coli*. Os derivados **18a-c** revelaram serem os mais eficientes, uma vez que possuem um carácter menos hidrofóbico do que aquele apresentado pelos PSs **19** e **20**.

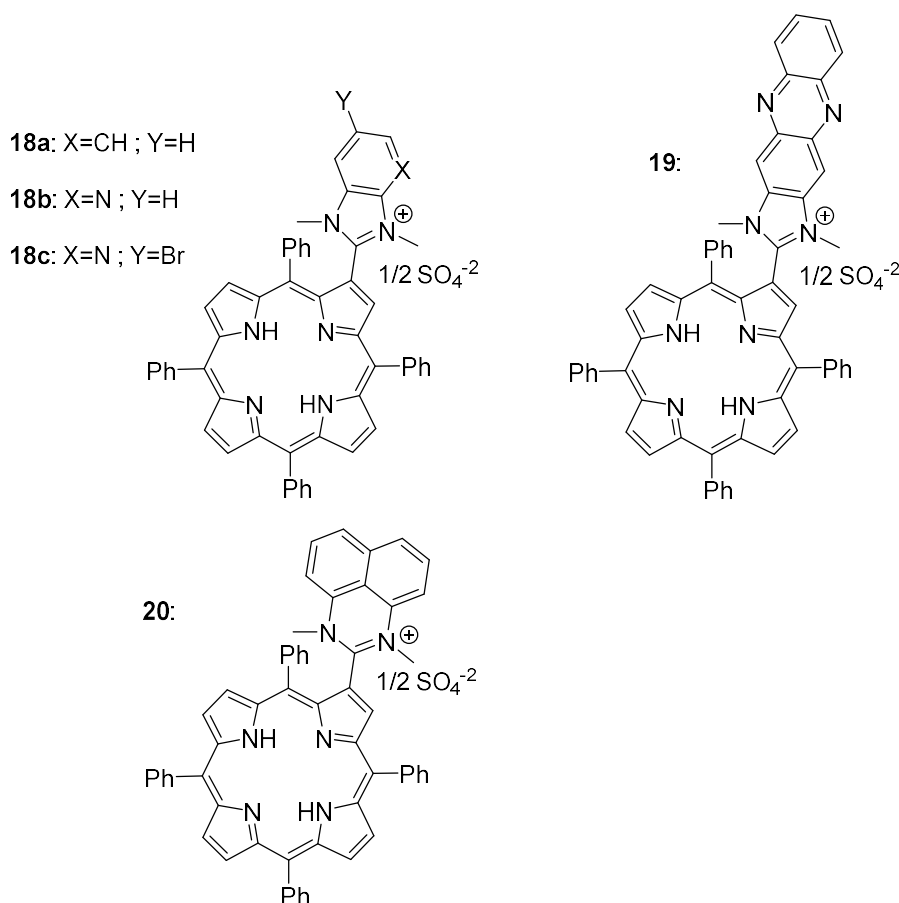


Figura 11- Estrutura dos PSs **18a-c,19** e **20**.

Num outro estudo, também conduzido por investigadores da Universidade de Aveiro, novos compostos foram avaliados como potenciais PSs na fotoinativação da espécie bacteriana bioluminescente, *E. coli*.⁵¹ Desta forma, procederam à síntese de três derivados do tipo porfirina-terpiridina dicatiônicos (Figura 12) e avaliaram a eficiência destes em atuarem como PSs em PDI, a 20 μM , sob irradiação de uma luz branca (380-700 nm) com irradiância de 4,0 mW/cm^2 . Após 270 min. de irradiação os três PSs apresentaram resultados satisfatórios, tendo-se registado decréscimos no sinal de bioluminescência da bactéria de 2,4, 1,4 e 2,0 logs induzidos pelos PSs **21**, **22** e **23**, respetivamente. O grupo de investigadores estudou também a influencia da concentração do PSs na eficiência da terapia. Para isso, prepararam soluções de 5, 10, 20 e 40 μM do PS mais eficiente, **21**, mantendo as restantes condições de fotoinativação iguais. O grupo verificou que a eficácia de fotoinativação aumenta na presença de concentrações maiores, tendo, no entanto, registado um *plateau* ao fim de 270 min. Conscientes que a irradiância da luz promove alterações na eficácia da terapia, os investigadores estudaram a eficiência

do derivado **21**, a 20 μM , sob uma irradiância de 150 mW/cm^2 . Foram registradas reduções de 2,9, 4,0 e 5,4 logs após 30, 60 e 210 min. de irradiação, respectivamente.

Os autores demonstraram, através deste estudo, a eficiência dos derivados porfirina-terpiridina β -dicatiônicos em atuarem como PSs em PDI. O PS **21** revelou ser o mais eficiente na geração de $^1\text{O}_2$, o que se traduziu numa maior eficiência do tratamento quando comparado com os restantes que, no entanto, também demonstraram uma elevada capacidade de gerar esta espécie citotóxica. Os investigadores, com este estudo, demonstraram que a concentração do PS, a habilidade em gerar $^1\text{O}_2$, a distribuição das cargas e a irradiância são parâmetros influentes na eficácia em PDI.

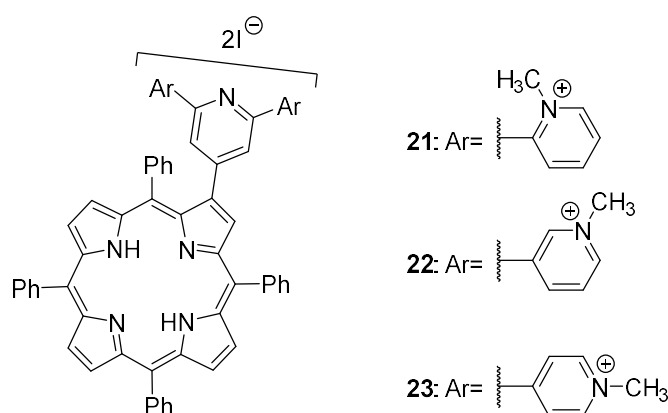


Figura 12- Estrutura dos PSs **21-23**.

Novos híbridos porfirina-imidazol β -catiônicos (Figura 13) demonstraram elevada potencialidade em atuarem como PSs na fotoinativação da bactéria bioluminescente, *E. coli*.²⁸ Os quatro derivados β -catiônicos foram estudados a duas concentrações diferentes (5 e 20 μM) em solução, irradiados com luz branca (380-700 nm) com uma irradiância de 25 mW/cm^2 durante 90 min. As porfirinas **24**, **25**, **26** e **27**, a 20 μM , promoveram uma redução de 3,85, 3,01, 0,63 e 1,44 logs no sinal vital da estirpe, respectivamente. A 5 μM a redução observada foi, logicamente, inferior tendo-se registado decréscimos de 2,38, 1,86, 0,63 e 1,10 logs pelos derivados **24**, **25**, **26** e **27**, respectivamente.

Os autores demonstraram que, apesar dos PSs sintetizados apresentarem apenas uma carga positiva na sua estrutura, revelaram eficiência na fotoinativação da estirpe bacteriana *E. coli*.

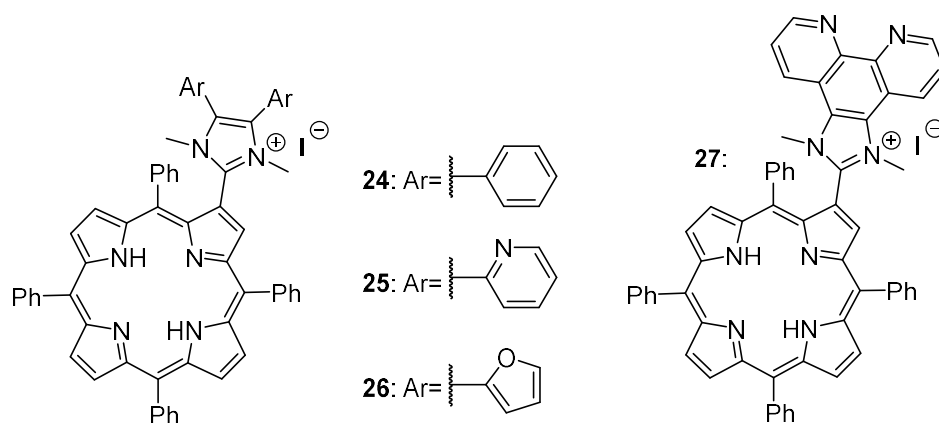


Figura 13- Estrutura dos PSs 24-27.

1.5-Imobilização de PSs em materiais

O maior reconhecimento, por parte dos investigadores, da eficiência do tratamento através da PDI tem, não só, originado o desenvolvimento de novos PSs, como a incorporação dos mesmos em materiais sólidos. Esta incorporação, para além de permitir um aumento na eficácia da técnica em diferentes contextos, como desinfeção de sangue, de águas residuais e de superfícies, também acarreta diversas vantagens em relação ao tradicional uso dos PSs em solução.²² A possibilidade de reutilização dos PSs e a não utilização de solventes orgânicos permitem a criação de uma técnica mais económica, sustentável e amiga do ambiente.⁵² A seleção destes materiais, no entanto, não deve ser aleatória e deve obedecer a uma série de padrões que podem influenciar a eficácia do tratamento, entre as quais se evidenciam: compatibilidade com o PS; estabilidade e força mecânica quando na presença da irradiação de luz; métodos de síntese baratos e facilmente reprodutíveis; boa permeabilidade de oxigénio de forma a se obter uma eficiente formação de $^1\text{O}_2$ e elevada biocompatibilidade de maneira a maximizar a interação entre o suporte e o microrganismo.¹⁶

1.5.1-Quitosana

A quitosana é um biopolímero obtido através da *N*-desacetilação da quitina presente no exoesqueleto dos crustáceos. É constituída por duas unidades estruturais, D-

glucosamina (GlcN) e *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), ligadas entre si por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 14).

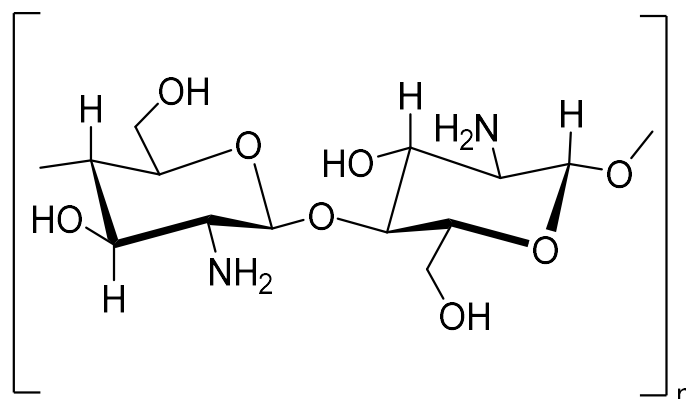


Figura 14- Estrutura molecular da quitosana.

Devido à sua biocompatibilidade, a quitosana pode ser usada em diversas áreas como agrícola, alimentar e farmacêutica. O fácil processamento em diferentes formas como filmes e géis, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e antioxidante, são algumas das propriedades pelas quais este biopolímero é tão, recorrentemente, aplicado em diversos contextos.⁵³ A atividade antimicrobiana deste material, depende de diversos fatores entre os quais se destacam: o tipo de agente patogénico, o pH do meio e a concentração da quitosana.⁵⁴ Esta, apresenta atividade antimicrobiana em meios com pH inferior a 6,5 devido ao aumento de cargas positivas resultantes da protonação dos grupos amina.⁵⁵ Esta atividade pode ainda ser aumentada através da incorporação covalente ou não-covalente de compostos como PSs.⁵⁶ O mecanismo exato pelo qual a quitosana exerce a sua atividade antimicrobiana ainda não é totalmente compreendido. No entanto, o mecanismo mais aceite atualmente, assenta na ideia que ocorre a ligação dos grupos amina protonados da quitosana às células bacteriana, conduzindo à sua disrupção.⁵⁴ Será importante realçar que os agentes antimicrobianos encontram-se subdivididos em duas classes: os bactericidas, que são agentes que apresentam capacidade de matar as bactérias, e os bacteriostáticos, que apenas inibem o crescimento bacteriano. A quitosana, tendo sido reportada como um agente bacteriostático.⁵⁷

Existem alguns estudos na literatura que comprovam o potencial deste material como suporte de PSs em PDI. Um grupo de investigadores da Universidade de Aveiro procedeu à imobilização dos PSs **12**, **28** e **29**, (Figura 15) em quitosana e avaliou a eficiência destes na fotoinativação da bactéria *E. coli* bioluminescente.⁵⁸ Os autores

avaliaram, primeiramente, a eficiência dos PSs **28** e **29** na fotoinativação da bactéria *E. coli* bioluminescente, em solução, a 5 μM . Após 120 min. de irradiação com luz branca com irradiância de 3,0 mW/cm^2 , o PS **29** promoveu um decréscimo de 3 logs na viabilidade da bactéria, enquanto que o **28** induziu um decréscimo até ao limite de deteção do método, ao fim do mesmo período. O resultado apresentado pelo PS **28** foi semelhante ao apresentado pelo **12**, que é considerado um eficiente PS em PDI. Após a imobilização dos PSs na estrutura da quitosana, os investigadores avaliaram a eficiência dos materiais na fotoinativação da mesma estirpe bacteriana, a 3 μM , sob as mesmas condições de irradiação. O PS **12** imobilizado em quitosana, mostrou ser eficiente, pois ao fim de 90 min., induziu um decréscimo de 4,1 logs na bioluminescência da bactéria. No que diz respeito aos PSs **28** e **29**, os resultados obtidos são indicativos da ineficácia no tratamento, uma vez que ao fim de 90 min., apenas se registou decréscimos na viabilidade da bactéria de 0,63 e 0,31 logs, respetivamente.

A imobilização dos PSs na estrutura da quitosana, resultou numa diminuição da eficiência dos PSs **28** e **29**. O mesmo fenómeno não se observou após a imobilização do PS **12**, uma vez que este promoveu um decréscimo significativo no sinal de bioluminescência da bactéria. Após o estudo da habilidade destes PSs em gerar $^1\text{O}_2$, os autores observaram que os PSs livres possuem a capacidade de gerar esta espécie citotóxica contundo, após a imobilização na estrutura da quitosana, apenas o PS **12** continuou a exibir essa capacidade, o que se traduziu na eficiência do tratamento por parte deste PS quando incorporado em quitosana. Este estudo demonstra que as escolhas do PS e do suporte não devem ser aleatórias, uma vez que influenciam, significativamente, a eficiência do tratamento.

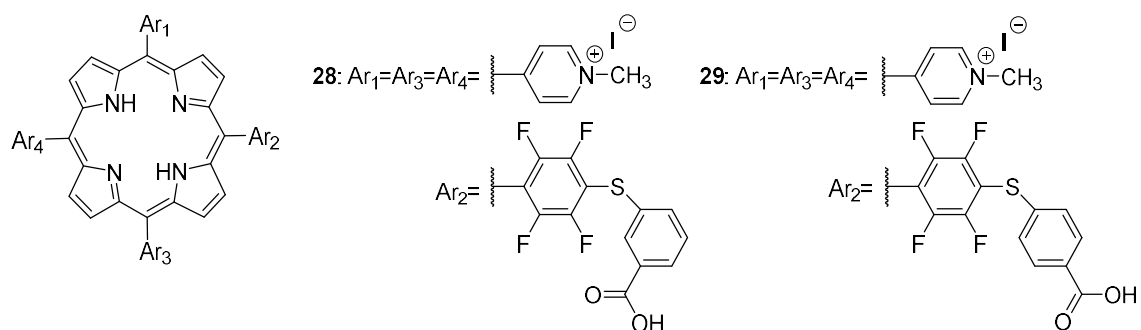


Figura 15- Estrutura dos PSs **28** e **29**.

Num outro estudo, desenvolvido na Universidade de Aveiro, os investigadores estudaram a eficiência dos PSs **30-33** (Figura 16) imobilizados na estrutura da quitosana na fotoinativação da bactéria de Gram-positivo *Listeria innocua*.⁵⁹ Os diferentes materiais, com o PS a 0,2 μmol , foram irradiados por uma luz branca (400-800 nm) com uma irradiância de 10 mW/cm², durante 24 horas, com o intuito de impedir a adesão das células bacterianas e consequente formação do biofilme. Os autores observaram que todos os PSs estudados promoveram reduções na concentração das células bacterianas quando comparados aos resultados obtidos pelo controlo (lâmina de vidro). A quitosana, mesmo sem a imobilização do PS, também registou uma redução na adesão das células bacterianas, quando comparada há observada pelo controlo, evidenciando a sua atividade antimicrobiana intrínseca. A formação do biofilme por parte desta bactéria foi praticamente inibida pelos PSs **30** e **32**, que revelaram ser os mais eficientes. Os PSs **31** e **33** imobilizados em quitosana evidenciaram resultados satisfatórios, mas menos eficientes, uma vez que apresentam menos capacidade de gerar ¹O₂ do que os PSs **30** e **32**.

Os autores demonstraram a eficiência dos PSs **30-33** imobilizados em quitosana na prevenção da adesão das células bacterianas impedito a formação do biofilme. A capacidade de gerar ¹O₂ por parte destes PSs, mesmo após a imobilização, permitiu a obtenção de resultados eficientes. Os investigadores evidenciaram ainda a atividade antimicrobiana intrínseca da quitosana, demonstrando que esta é potencializada após a incorporação de um PS.

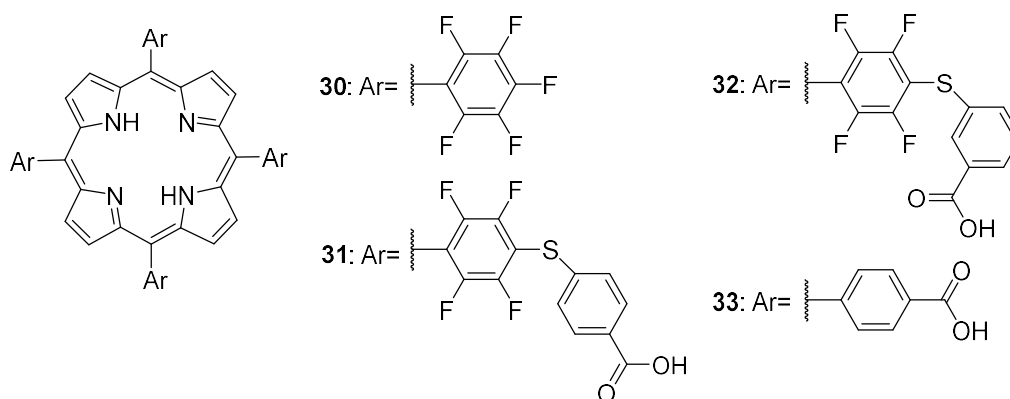


Figura 16- Estrutura dos PSs **30-33**.

A aplicação da quitosana como suporte de PSs para tratamento através da PDI tem sido empregue em outras áreas, nomeadamente na alimentar. Buchovec e colaboradores⁶⁰, procederam à imobilização da clorofilina na estrutura da quitosana com o intuito de fotoinativar a bactéria *Salmonella enterica* presente na superfície de morangos. Os autores avaliaram a eficiência do complexo clorofilina-quitosana ($1,5 \times 10^{-5} \text{ M} - 0,1 \%$), sob irradiação de luz (405 nm) com uma irradiância de 38 J/cm^2 , na fotoinativação desta estirpe de Gram-negativo. Após 30 min. de incubação, o complexo promoveu um decréscimo de 2,2 logs na viabilidade da bactéria, enquanto que a presença apenas da quitosana resultou num decréscimo de 0,6 logs. A eficácia deste complexo foi também avaliada na fotoinativação de leveduras/bolores presentes na superfície dos morangos. Nas mesmas condições de irradiação, e ao fim de 30 min., observou-se um decréscimo de 1,4 logs na viabilidade destes microrganismos. Decréscimo este superior ao observado na presença apenas da clorofilina (0,9 logs) ou da quitosana (0,4 logs).

Este estudo é indicativo da diversificada aplicação da quitosana na fotoinativação de microrganismos através da PDI. Os autores demonstraram a eficiência no tratamento de uma bactéria de Gram-negativo presente na superfície dos morangos através da PDI, recorrendo a um complexo clorofilina-quitosana. Os resultados são reveladores do aumento da eficiência no tratamento após a imobilização de um PS na estrutura da quitosana.

1.5.2-Amido

O amido é um dos biopolímeros mais abundantes do mundo, sendo o carboidrato mais comum da dieta humana. Estruturalmente, este polissacarídeo é constituído por várias unidades de 1,4-D-glucose que podem ser subdivididas em duas formas principais: amilose e amilopectina (Figura 17).⁶¹ Existem diversas fontes naturais de amido, e a sua abundância é responsável pelo reduzido custo associado a este tipo de materiais sendo, claramente, uma opção muito viável aos combustíveis fósseis. Este polímero apresenta uma elevada compatibilidade com tecidos biológicos, o que aumenta a eficácia do tratamento. Este biopolímero apresenta propriedades óticas (transparente), organolépticas (sem odor e sem sabor) e físicas (excelente permeabilidade ao CO_2 e O_2) que são ideais na formação de filmes.⁶²

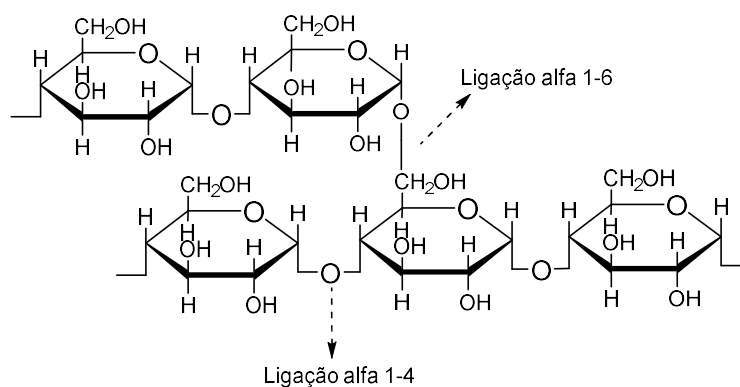


Figura 17- Estrutura do amido.

Atualmente, ainda não existem muitos estudos referentes à potencial aplicação de filmes de amido em PDI ou PDT. No entanto, Saboktakin e colaboradores⁶³, conduziram um estudo onde constataram as potenciais vantagens de incorporar um PS na estrutura do amido. O grupo de investigação procedeu à síntese de um hidrogel de amido carboximetilado usando dextrano de sulfato como polímero polianiónico, com o intuito de encapsular a 5, 10, 15, 20-tetraquis(3-hidroxifenil)porfirina. Os autores observaram que, após a encapsulação, o PS demonstrou maior capacidade de geração de ¹O₂. Esta constatação pode ser justificada pelo aumento da solubilidade deste composto, evitando que este se agregue e, conseqüentemente, esteja mais disponível para gerar ROS. Observaram também que a encapsulação impediu que ocorresse a liberação do PS por ação das extremas condições promovidas pelo meio, como variações de pH. O grupo demonstrou que a pH 7,4, a 37 °C, o PS mantém-se retido durante, aproximadamente 3 horas, sendo totalmente libertado ao fim de 10 horas. Esta proteção permite que o PS se mantenha retido na estrutura do hidrogel aumentando a eficiência do tratamento, nomeadamente pela maior taxa de liberação do PS nos locais desejados.

1.5.3-Micelas

A natureza hidrofóbica da maior parte dos PSs, incluindo as porfirinas, resulta na agregação destes em meio aquoso reduzindo a eficácia do processo de PDI. Esta redução é promovida pela diminuição da formação de ¹O₂, uma vez que este sofre um efeito de *quenching* por parte do mesmo (*self-quenching*).⁶⁴ A aplicação das micelas (Figura 18) como transportadores de PSs tem-se revelado muito promissor em PDI²², uma vez que

induz uma alteração na solubilidade do PS evitando que este se agregue em ambientes aquosos. A preparação deste tipo de material é bastante simples e económica o que o torna bastante vantajoso em relação a outros transportadores, como lipossomas.⁶⁵

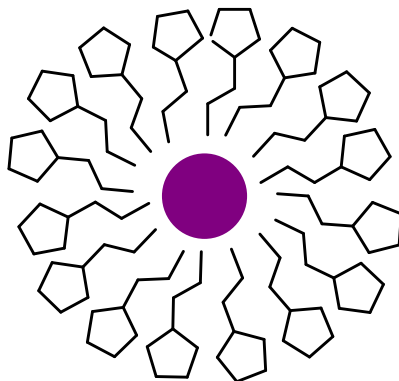


Figura 18- Estrutura representativa de uma micela.

Polivinilpirrolidona (PVP) é um polímero sintético obtido através da polimerização do monómero *N*-vinilpirrolidona. Este material apresenta diversas características que permitem a aplicação do mesmo em diversas áreas como farmacêutica, medicinal, alimentar e cosmética. O PVP é solúvel em diversos solventes, como água, etanol, metanol, entre outros, não apresenta toxicidade, é resistente à temperatura, estável às variações de pH e apresenta elevada afinidade para PSs hidrofílicos e hidrofóbicos.^{66,67} Na literatura, de entre as diversas potenciais aplicações, encontramos relatos demonstrativos da potencialidade deste material em atuar como veículo de transporte de drogas em PDT ou PDI, por exemplo.

Gomes e colaboradores⁶⁸, avaliaram a eficiência fotodinâmica dos PSs **34a-f** (Figura 19) incorporados em micelas de PVP na fotoinativação de células humanas do cancro da bexiga (linha celular HT-1376), e compararam os resultados aos obtidos nas células ARPE-19, que foram utilizadas como controlo. Os investigadores observaram que todos os PSs incorporados nas micelas de PVP demonstraram capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ apresentando ainda fotoestabilidade nas condições de estudo recriadas. Os PSs foram incubados com as diferentes células no escuro durante 4 horas, seguindo-se um período de irradiação de 40 min. com luz branca com irradiância de 20 mW/cm^2 . Todos os PSs demonstram-se eficientes na fotoinativação das células da linhagem HT-1376, revelando um efeito fotodinâmico inferior nas células ARPE-19. Esta constatação revela a importância da unidade triazol no efeito citotóxico dos PSs em células tumorais.

Os autores demonstraram a eficiência fotodinâmica dos PSs incorporados em micelas de PVP, tendo registado decréscimos superiores a 30% na viabilidade da linha celular HT-1376, quando estudados a 10 μM . O efeito citotóxico dos PSs nas células ARPE-19 foi sempre inferior ao registado na linha celular HT-1376, demonstrando o potencial destes compostos em atuarem como PSs em PDT, uma vez que são seletivos para as células tumorais. Os autores relataram ainda que o PVP não promoveu decréscimos significativos na viabilidade de nenhuma linha celular estudada, demonstrando que este não apresenta um caracter citotóxico em relação às células.

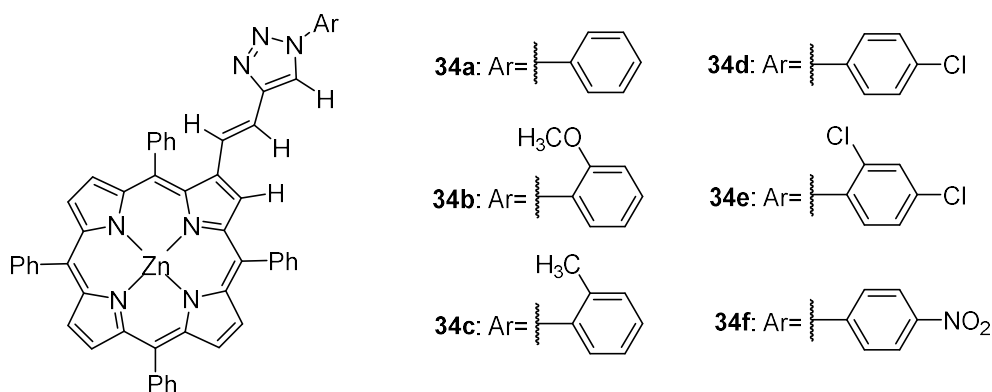


Figura 19- Estrutura dos PSs **34a-f**.

Pehlivan e colaboradores⁶⁹, avaliaram a eficiência do complexo de Zn(II) da ftalocianina [Zn(II)-Ft] (Figura 20) na fotoinativação das células MDA-MB-231 (linha celular do cancro da mama). Os autores compararam os resultados obtidos pela Zn(II)- Ft quando incorporada em micelas de PVP, com os obtidos quando esta se encontra solubilizada em água ou DMSO. Após um período de incubação de 24 horas entre o PS e as células MDA-MB-231, os autores procederam à irradiação durante 6 min. com uma irradiância de 10 mW/cm². Após este período, observou-se que seria necessário que o PS apresentasse uma concentração de 0,11 μM quando imobilizado em micelas de PVP para registar um decréscimo de 50% na viabilidade das MDA-MB-231. A mesma concentração é necessária para obter um decréscimo semelhante, quando o PS se encontra solubilizado em DMSO. Quando se apresenta solubilizado na água, é necessária uma concentração de 0,19 μM . A inibição completa da viabilidade das MDA-MB-231 é alcançada na presença do PS a uma concentração de 0,28, 0,16 e 0,31 μM quando este se encontra solubilizado em micelas de PVP, DMSO e água, respetivamente.

Os resultados obtidos são demonstrativos da eficiência deste PS incorporado em micelas de PVP na fotoinativação das células MDA-MB-231. A solubilização do PS em DMSO revelou ser a formulação mais eficiente, no entanto os resultados obtidos para a formulação em PVP são demonstrativos da enorme potencialidade deste material em atuar como veículo de transporte de PSs.

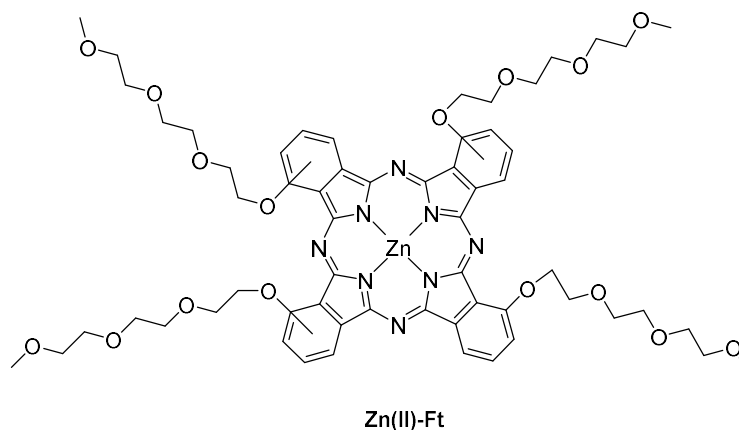


Figura 20- Estrutura do PS Zn(II)-Ft.

Devido ao aumento da utilização da PVP em projetos de investigação científica, foi necessário avaliar a potencial toxicidade do material. Os estudos desenvolvidos neste âmbito, demonstraram que a PVP atua como substância inerte, não apresentando toxicidade quando administrado quer por via oral quer de forma tópica. Além disso, ficou também demonstrado que a PVP não despoleta reações alérgicas ou irritativas.^{67,70}

1.5.4-Nitreto de Carbono Grafítico

Nitreto de Carbono Grafítico ($g-C_3N_4$) é um tipo de material à base de moléculas de carbono e azoto (Figura 21) que tem, recentemente, despertado interesse junto dos investigadores científicos devido às suas potencialidades.⁷¹ Este tipo de material apresenta propriedades semicondutoras, alta estabilidade sob condições fisiológicas, excelente biocompatibilidade, fotorresponsividade e fotoabsorção intrínseca.⁷² Para além destas características, o carbono e o azoto são elementos bastante abundantes possibilitando uma síntese simples e económica. Neste material não ocorre a incorporação do PS no mesmo, mas sim a adsorção permitindo que este apresente uma maior liberdade podendo ser traduzida em melhores resultados.⁷³

Na literatura, podemos encontrar relatos da potencial aplicação deste tipo de material em diversas áreas, nomeadamente em PDT, onde pode atuar como PS ou como veículo de transporte de drogas.^{74,75} Lin e colaboradores⁷⁴, conduziram um estudo onde demonstraram a eficiência deste material em atuar como PS em PDT, e ainda a sua capacidade de atuar como veículo de transporte de drogas sensível ao pH. Os autores, observaram que, nas mesmas condições experimentais, as nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ apresentam maior capacidade de geração de ROS do que “*quantum dots*” (GQDs), que têm sido utilizados em PDT. A potencial eficácia das nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ em PDT, foi avaliada através da análise da viabilidade de células HeLa. Após um período de incubação de 12 horas com as nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$, a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, sob uma irradiação de 20 mW/cm^2 durante 10 min., obteve-se um decréscimo de, aproximadamente, 80% na viabilidade das células. A influência do tempo de irradiação na eficiência do tratamento foi observada através da irradiação das nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$, a 50 $\mu\text{g/mL}$ sob as mesmas condições de irradiação. Os resultados obtidos foram indicativos de que o decréscimo da viabilidade aumenta quanto maior o tempo de irradiação, tendo-se registado um decréscimo de, aproximadamente, 30% após 20 min. de irradiação. Este grupo de investigação demonstrou ainda a elevada capacidade que este tipo de material apresenta como veículo de transporte de drogas. Os autores procederam à incorporação de Doxorrubicina (DOX), que é uma droga utilizada no tratamento de diversos cancros, na estrutura das nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ e observaram que, quando o pH do meio é inferior a 5, ocorre uma maior libertação da droga, permitindo assim que esta atue no alvo de forma mais direta. Durante este estudo, os autores também observaram que a pH superior (7 e 9) a quantidade de droga libertada é bastante inferior, e que as nanofolhas de $g\text{-C}_3\text{N}_4$ possibilitam que esta se encontre estável em meios neutros e básicos.

Investigadores da Universidade de Aveiro procederam à adsorção, através de um método de impregnação, de diferentes porfirinas na estrutura do $g\text{-C}_3\text{N}_4$, com o intuito de avaliar a atividade fotocatalítica para a geração de Hidrogénio (H_2), sob irradiação UV-Vis e visível.²⁵ Este estudo permitiu constatar que as porfirinas, mesmo adsorvidas neste tipo de material, conseguem transferir a energia (eletrões) do seu estado excitado para o $g\text{-C}_3\text{N}_4$, potencializando a produção fotocatalítica de H_2 .

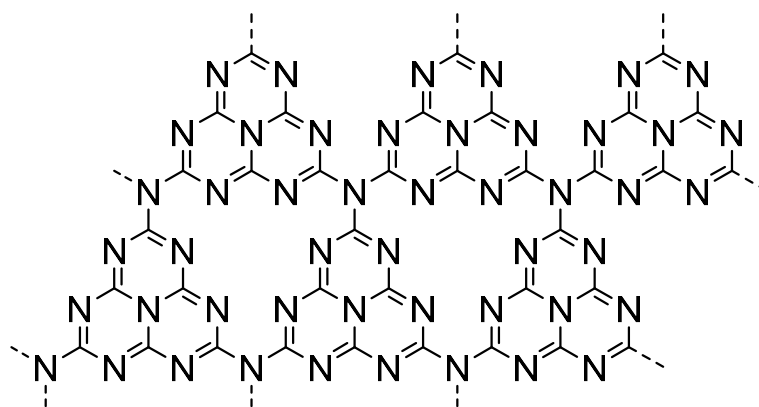


Figura 21- Estrutura química do Nitreto de Carbono Grafítico ($g\text{-C}_3\text{N}_4$).

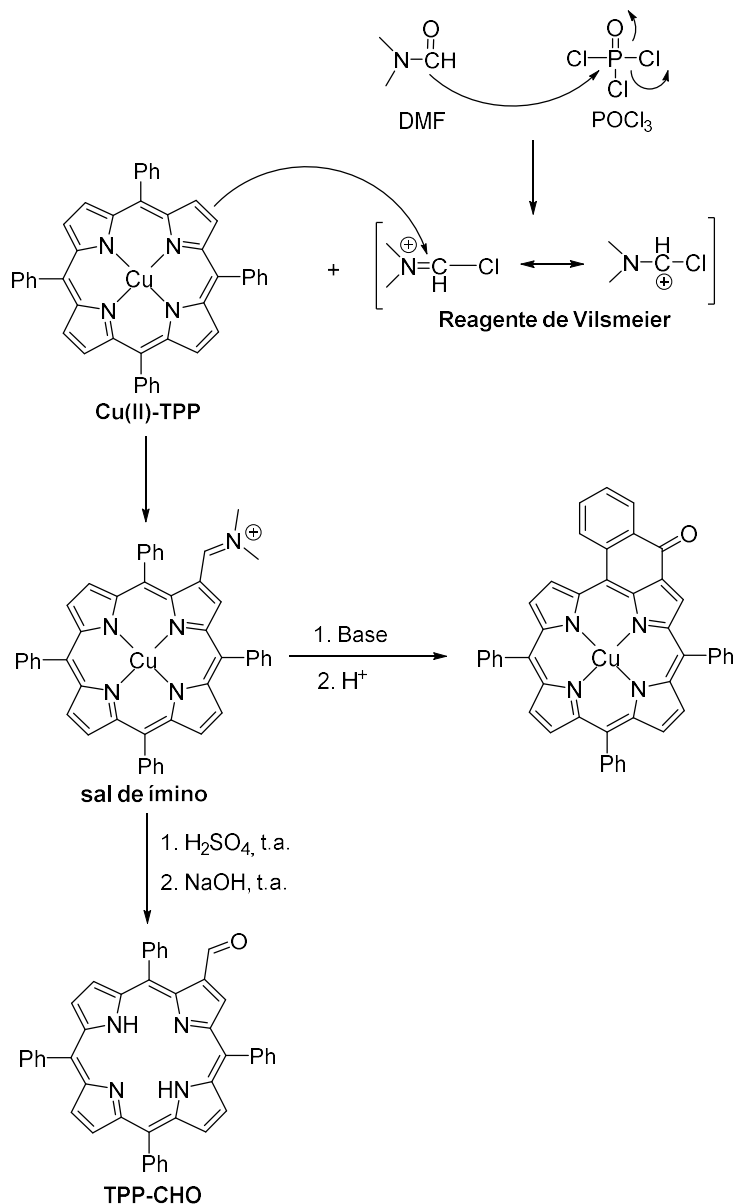
A presente dissertação teve como objetivo a síntese de híbridos porfirina-imidazol β -catiônicos, a sua incorporação em micelas de PVP e a imobilização destes derivados em materiais sólidos (amido, quitosana e $g\text{-C}_3\text{N}_4$). A incorporação/imobilização dos PSs teve como propósito proporcionar a extensão do tratamento através da PDI para outros contextos, como a fotoinativação de microrganismos em sangue, água ou superfícies. Neste trabalho, após o estudo da capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ e da estabilidade perante a irradiação de luz, a eficiência fotodinâmica, em solução, dos PSs livres, das formulações em PVP e dos materiais sólidos foi avaliada na inativação de bactérias resistentes a antibióticos, nomeadamente *E. coli* e MRSA.

2- Derivados porfirina-imidazol β -catiônicos: Síntese, incorporação em micelas de PVP e imobilização em filmes de amido e de quitosana e em nitreto de carbono grafítico.

2.1-Preâmbulo

Este capítulo visa descrever a síntese de derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, a sua incorporação em micelas PVP e a imobilização em filmes de amido e quitosana e carbono nitreto grafítico, tendo como objetivo a preparação de novos híbridos com potencial aplicação em PDI. A incorporação e imobilização em diferentes materiais acarreta diversas vantagens, entre as quais se destaca: a reutilização do PS e a não utilização de solventes orgânicos, permitindo assim a extensão da técnica para diversos contextos, nomeadamente sangue ou água. De forma a proceder à síntese dos derivados

(DMF), que são responsáveis pela formação do reagente de Vilsmeier (Esquema 2). A mistura reacional foi deixada sob agitação a 80 °C durante a noite, possibilitando assim a formação do sal de íminio. A descomplexação deste intermediário foi obtida por tratamento com ácido sulfúrico, seguido da hidrólise básica na presença de hidróxido de sódio. Utilizando este procedimento evita-se a formação da ciclização intramolecular entre o grupo formilo e o anel fenilo adjacente. A análise por TLC permitiu constatar a formação de um novo composto, que foi purificado e obtido com um rendimento de 66%.



Esquema 2- Síntese da TPP-CHO.

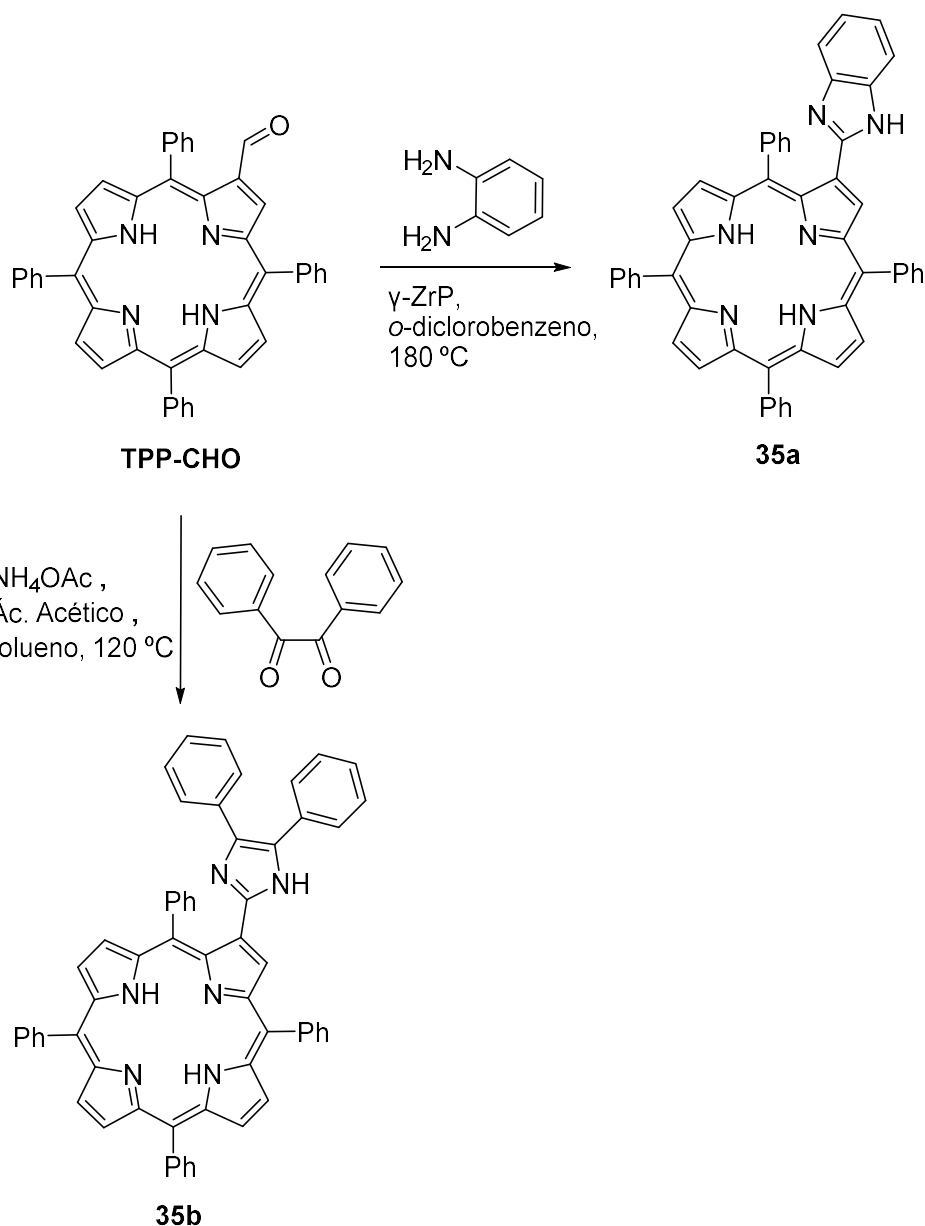
A síntese dos compostos **35a,b** foi obtida através da metodologia descrita por Radziszewski, em 1882, que permite a síntese de imidazóis a partir da reação de um

reagente dicarbonilado com um aldeído, na presença de acetato de amónio (Esquema 3).⁷⁷ Embora a síntese de ambos os compostos seja baseada numa reação do tipo Radziszewski, existem diferenças no procedimento experimental. Na síntese do composto **35a** é usado um derivado diamina (*o*-fenilenodiamina) em vez do derivado dicarbonilado. Esta adaptação evita assim a adição de acetato de amónio à reação, que tem como propósito a obtenção do amoníaco que reage com o carbono do grupo carbonilo da porfirina, promovendo a formação da diamina. Na síntese do composto **35b** é adicionado o reagente dicarbonilado (benzil), sendo necessário a adição do acetato de amónio pelas razões explicadas anteriormente.

No caso do composto **35a**²⁷, este foi preparado através de uma reação de condensação entre a **TPP-CHO** e a *o*-fenilenodiamina, na presença de quantidades catalíticas (0,6 mol%) de γ -fosfato de zircónio (γ -ZrP), em *o*-diclorobenzeno a refluxo, durante 6 horas. A adição do catalisador γ -ZrP, permitiu a redução do tempo de reação e o aumento do rendimento da mesma²⁷. Após o período de reação, a análise por TLC confirmou a formação de um novo composto e o consumo total do composto de partida. Após o “workup” da reação, procedeu-se à sua purificação por coluna cromatográfica. Primeiramente foi efetuada a eluição apenas com hexano para remover o *o*-diclorobenzeno, usado como solvente da reação, e de seguida, utilizou-se uma mistura CH₂Cl₂/hexano como eluente. O composto **35a** foi obtido com um rendimento de 90%.

Relativamente à formação do composto **35b**²⁸, a reação entre o acetato de amónio e o carbono do grupo carbonilo da porfirina promoveu a formação da diamina, uma vez que a dissociação do acetato de amónio em amoníaco e ácido acético promove a reação entre ambos. Uma vez formada, a diamina reagiu com o derivado dicarbonilado, benzil, em tolueno/ácido acético (5:1), a refluxo, formando o respetivo imidazol. A adição do ácido acético teve como propósito a protonação do grupo carbonilo catalisando a reação entre o amoníaco e o carbono do grupo carbonilo. A reação foi controlada através da análise por TLC, sendo que ao fim de 3 horas comprovou-se a formação de um novo composto e o consumo total do composto de partida. Procedeu-se à neutralização do mesmo com bicarbonato de sódio e elaborou-se uma coluna cromatográfica em CH₂Cl₂, tendo-se obtido o composto **35b** com um rendimento de 87%.

As estruturas de ambos os compostos foram confirmadas por espectroscopia de ^1H RMN e espectrometria de massa (MS-ESI), e espectroscopia de absorção UV-vis, e estão de acordo com o apresentado na literatura.^{27,28}

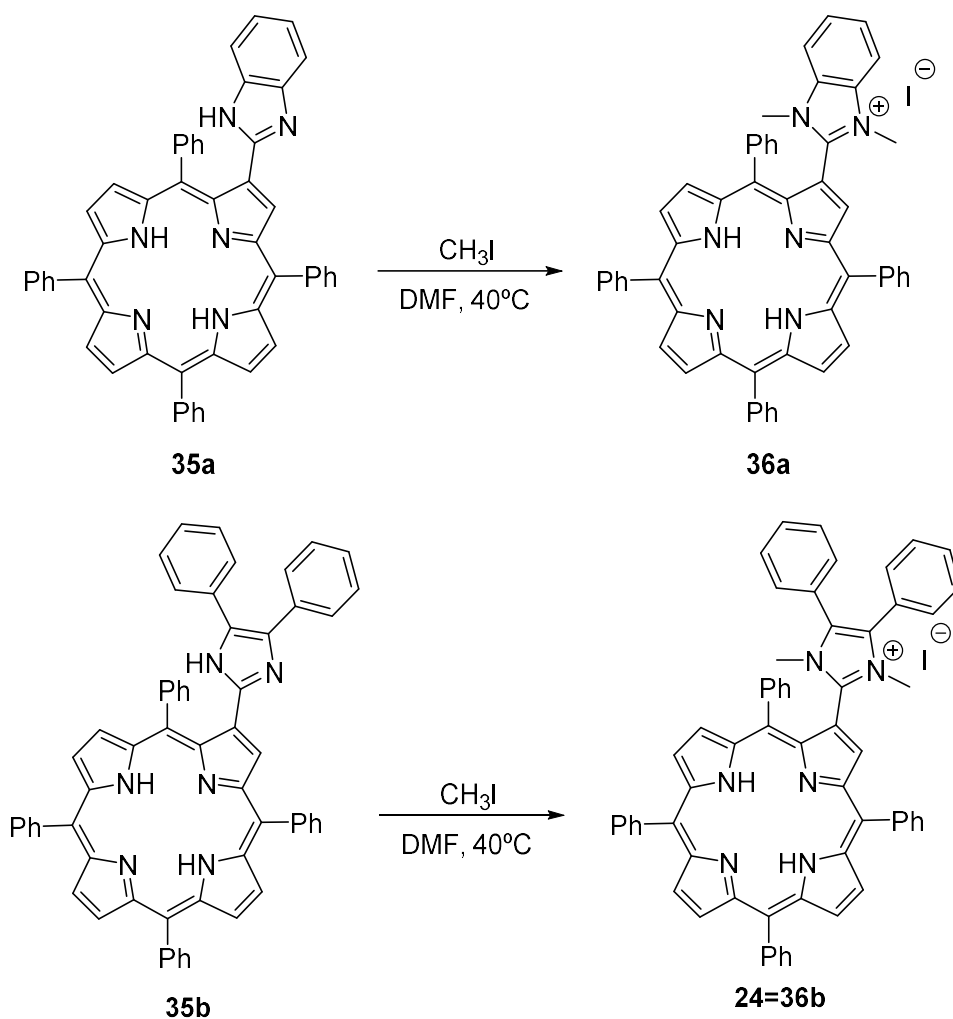


Esquema 3- Síntese dos derivados porfirina-imidazol neutros **35a,b** através da reação de Radziszewski.

2.3-Síntese dos derivados porfirina-imizadol β -catiônicos **36a,b**

Os derivados catiônicos **36a,b** foram preparados a partir das respectivas formas neutras **35a,b** através da quaternização/alquilação dos azotos do anel imidazol usando iodeto de metilo como agente alquilante. As reações de alquilação dos compostos **35a,b**

foram realizadas num tubo selado, em *N,N'*-dimetilformamida (DMF) durante 60 horas, a 40 °C, na presença de um excesso de iodeto de metilo (Esquema 4). Após o período de reação, a análise do TLC, mostrou o consumo total dos reagentes de partida **35a,b** comprovando a formação de compostos mais polares. Os compostos sintetizados foram precipitados em éter etílico e o excesso de iodeto de metilo foi destruído através da reação com uma solução de dietilamina. Os derivados porfirínicos mono-catiônicos **36a** e **36b** foram obtidos com rendimentos de 91 e 89%, respetivamente. As estruturas de ambos os compostos foram confirmadas por ¹H RMN, MS-ESI (+) e espectroscopia de absorção UV-vis, e estão de acordo com o apresentado na literatura.^{27,28}



Esquema 4- Síntese dos compostos **36a,b** através da alquilação dos compostos **35a,b**.

Os espectros de absorção dos respetivos derivados porfirina-imidazol neutros e β-catiônicos **35,36a** e **35,36b**, em DMF, encontram-se representados na Figura 23. Através da análise destes, podemos constatar que se tratam de espectros típicos de meso-tetraaril

porfirinas β -substituídas, uma vez que é perceptível o aparecimento de uma banda de maior intensidade designada banda Soret, e ainda 4 bandas Q de menor intensidade. Os espectros de ambos os compostos neutros e β -catiônicos são bastante idênticos, diferenciando-se apenas em pequenos desvios hipsocrômicos no aparecimento da banda Soret. No caso da porfirina **35a** a banda Soret surge a 421 nm, enquanto que no espectro respetivo ao derivado β -catiônico **36a** esta surge a 423 nm. No espectro referente à porfirina **36a** a banda Soret aparece centrada a 420 nm, sendo que no respetivo derivado catiónico **36b** esta surge a 423 nm. As bandas Q surgem, em ambos os compostos neutros e β -catiônicos, num intervalo entre 518 e 690 nm, não se tendo registado alterações significativas após a alquilação dos derivados neutros. Podemos ainda concluir que, devido ao facto de se ter registado o aparecimento de uma banda intensa, *Soret*, os derivados neutros e β -catiônicos não agregam em DMF.

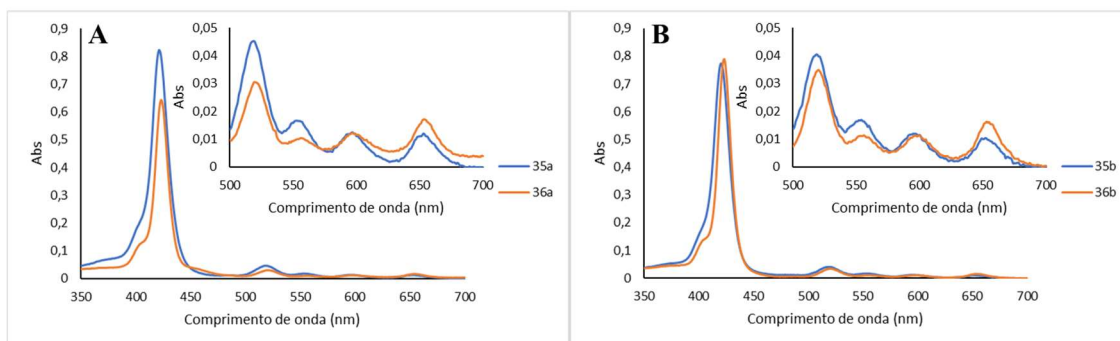


Figura 23- Espectros de absorção dos derivados neutros e β -catiônicos **35,36a** (A) e **35,36b** (B) em DMF, à temperatura ambiente ($[35,36a] = [35,36b] = 3 \times 10^{-6}$ M).

Os espectros de absorção, no estado sólido, das porfirinas β -catiônicas **36a,b**, diluídas em óxido de magnésio, encontram-se representados na Figura 24. O facto dos compostos se apresentarem no estado sólido promove algumas alterações nos espectros de absorção quando comparados aos obtidos pelos mesmos compostos em solução (Figura 23). Embora que seja possível observar que se tratam de espectros típicos de *meso*-tetraaril porfirinas β -substituídas pelo aparecimento da banda *Soret* e das 4 bandas Q, a intensidade das bandas Q é mais idêntica à banda Soret, o que não se observa para os espectros em solução. No espectro de absorção da porfirina **36b** é possível observar que a banda Q I tem, aproximadamente, a mesma intensidade da banda *Soret*. Esta constatação pode ser justificada pelo facto de estas porfirinas se apresentarem no estado sólido, resultando numa maior tendência para se agregarem, resultando numa diminuição da

intensidade da absorção. Foram também observados pequenos desvios hipsocrômicos no aparecimento da banda *Soret* em relação aos espectros referentes às porfirinas solubilizadas em DMF, nomeadamente um desvio para o vermelho de 8 e 6 nm nas porfirinas **36a** e **36b**, respetivamente. No caso das bandas Q, estas surgem, em ambas as porfirinas, num intervalo entre 526 e 699 nm.

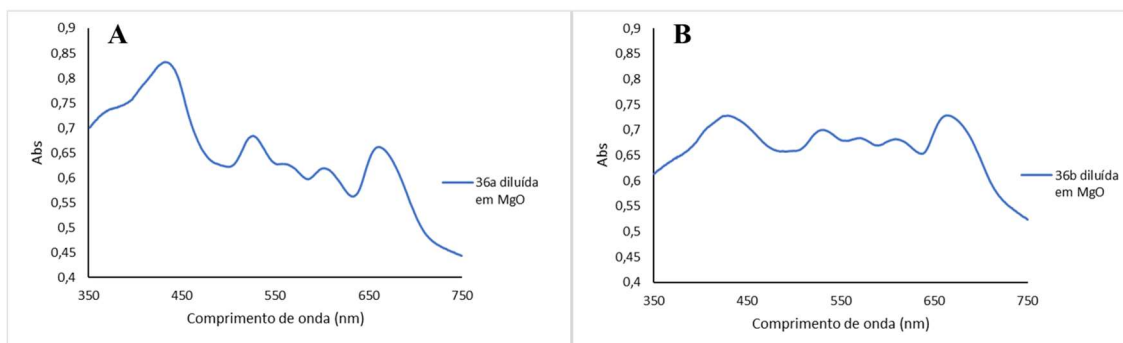
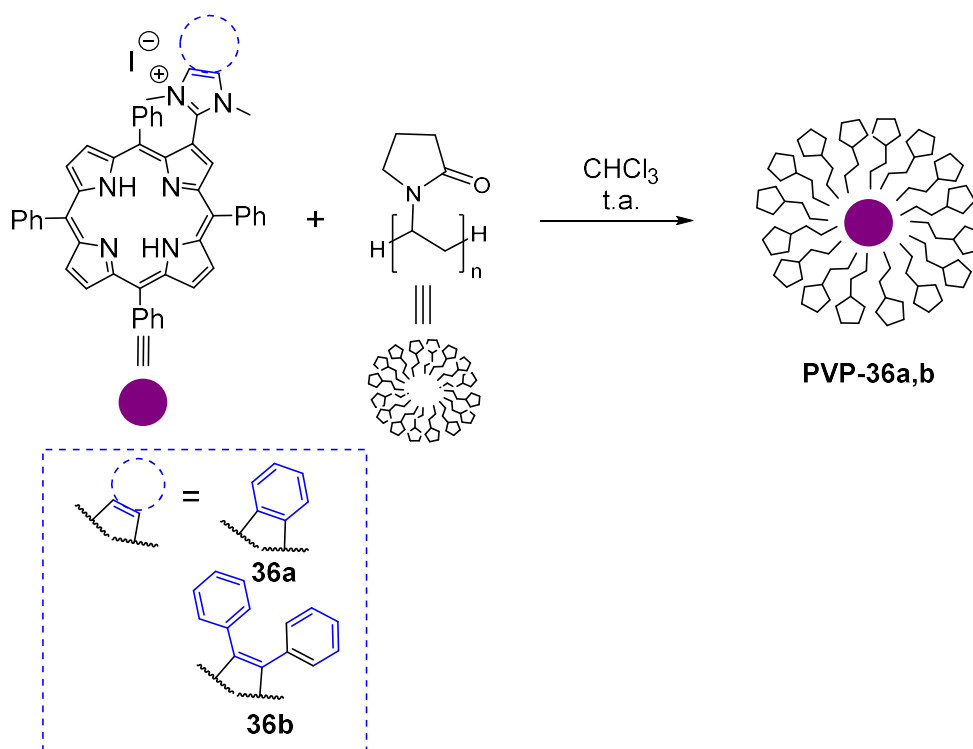


Figura 24- Espectros de absorção no estado sólido dos derivados β -catiônicos **36a** (A) e **36b** (B) “diluídos” em óxido de magnésio (MgO), à temperatura ambiente.

2.4-Incorporação dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** em micelas de PVP

A incorporação dos PSs **36a,b** na estrutura da PVP, originou as formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** e envolveu um processo experimental bastante simples que se encontra representado no Esquema 5. A PVP é um polímero solúvel em meio aquoso, formado através da polimerização do monómero *N*-vinilpirrolidona. Esta incorporação em PVP, confere uma maior solubilidade ao PS, impedindo que este se agregue em meio aquoso. A síntese dos PSs **PVP-36a** e **PVP-36b**, envolveu a solubilização da *N*-vinilpirrolidona, assim como dos derivados porfirínicos **36a,b** (10% m/m), num volume mínimo de clorofórmio. Após a solubilização de ambos os componentes, procedeu-se à mistura de ambos até obter uma mistura homogénea. De seguida procedeu-se à evaporação do solvente, e secagem a 40 °C durante 48 horas, resultando num sólido de cor acastanhada, que foi dissolvido em 1,67 mL de água destilada. Estas soluções aquosas das formulações **PVP-36a,b** foram posteriormente usadas como soluções stock para a sua caracterização e utilização como PSs nos estudos de fotoinativação de microrganismos através da PDI.



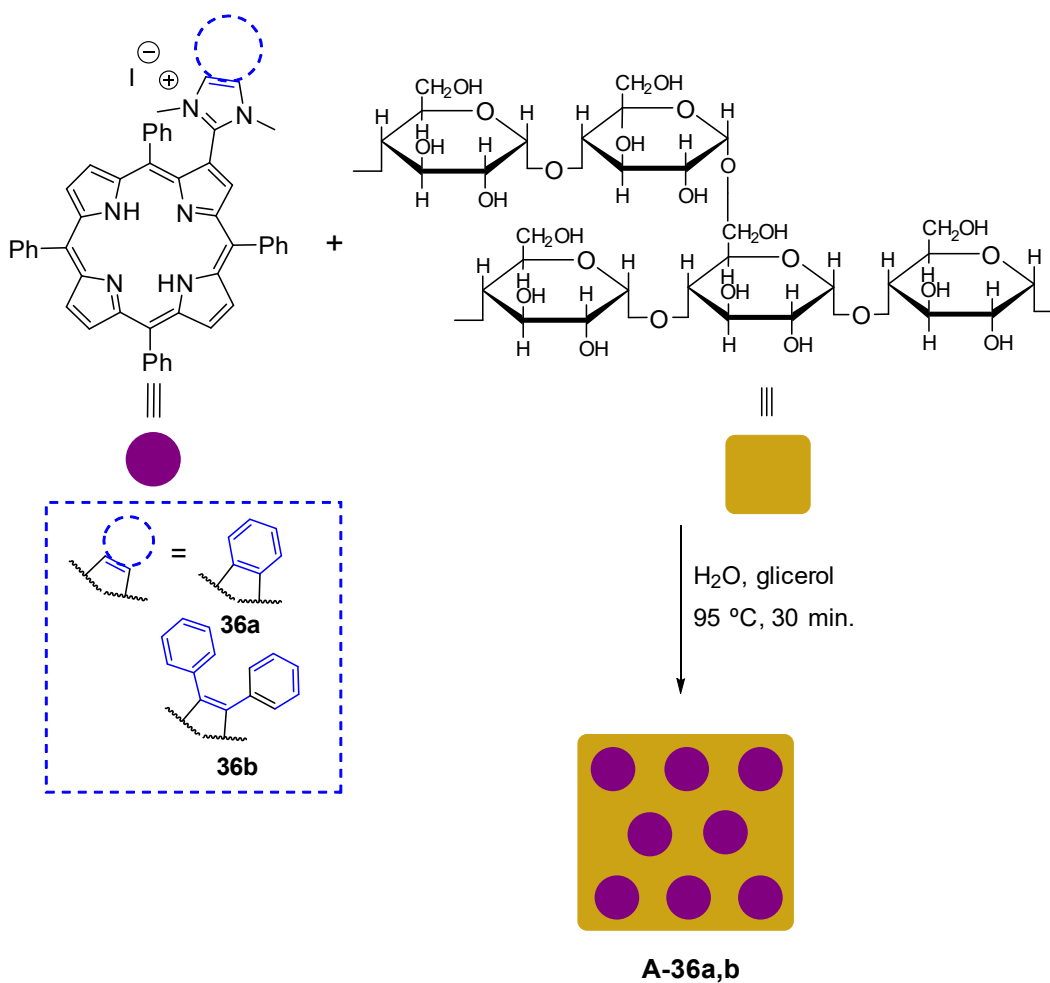
Esquema 5-Representação esquemática da incorporação dos PSs **36a** e **36b** em micelas de PVP, **PVP-36a,b**.

2.5-Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** em filmes de amido, **A-36a,b**

A síntese dos materiais **A-36a** e **A-36b** foi obtida através da incorporação dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** (1% m/m) em filmes de amido (Esquema 6), com o propósito de obter filmes potencialmente eficientes em PDI. Primeiramente, preparou-se uma dispersão de amido liofilizado e glicerol em água destilada, e aqueceu-se a mistura a 95 °C durante 30 min., sob agitação magnética, de forma a promover a gelatinização da mistura. O glicerol é adicionado como agente plastificante providenciando flexibilidade e elasticidade ao filme. Após este período, manteve-se a mistura à mesma temperatura e, sob vigorosa agitação, adicionou-se lentamente os compostos **36a,b** dissolvidos em 3 mL de EtOH, com o intuito de promover a incorporação destes na estrutura do amido. A solubilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** em EtOH, em vez de nos solventes mais recorrentemente usados para a solubilização deste tipo de porfirina (DMF ou DMSO), é justificada pelo facto destes solventes apresentarem pontos de ebulição superiores à temperatura da

reação (DMF-153 °C e DMSO-189 °C). Uma vez que a 95 °C não ocorreria a ebulição destes solventes, estes poderiam interferir com a estrutura do amido, inviabilizando a síntese do filme. O EtOH apresenta um ponto de ebulição de, aproximadamente, 78 °C sendo facilmente evaporado nas condições de reação.

Na primeira tentativa, foi visível a precipitação dos compostos **36a,b** à medida que foram adicionados à mistura e, após a desgaseificação em vácuo, foi nítido a visualização das porfirinas precipitadas, pois não se encontravam dispersas uniformemente no filme (Figura 25A). De forma a evitar a precipitação dos compostos, decidiu-se promover a alteração de algumas condições de reação, nomeadamente aumentar o volume de EtOH para 7 mL com o propósito de facilitar a solubilização dos compostos, sonicar a solução antes da adição à mistura e manter a solução aquecida até à adição. Após estas alterações, não se verificou a precipitação dos compostos **36a,b** quando estas foram adicionadas à mistura, pelo que se procedeu à desgaseificação sob vácuo e verteu-se a solução final para os suportes sólidos de acrílico, colocando em cada um 21 g da solução (Figura 25B). Estes moldes foram guardados na estufa a 25 °C durante a noite, de forma a ocorrer a evaporação do solvente. Após este período, os filmes obtidos foram retirados dos moldes e armazenados numa câmara de humidade controlada com uma solução de nitrato de magnésio (51% de humidade), pelo menos durante 5 dias. Os filmes de amido utilizados como controlo, foram sintetizados segundo o mesmo procedimento experimental com exceção da adição das porfirinas **36a,b**.



Esquema 6-Representação esquemática da preparação dos híbridos **A-36a,b** através da imobilização dos PSs **36a,b** em filmes de amido.

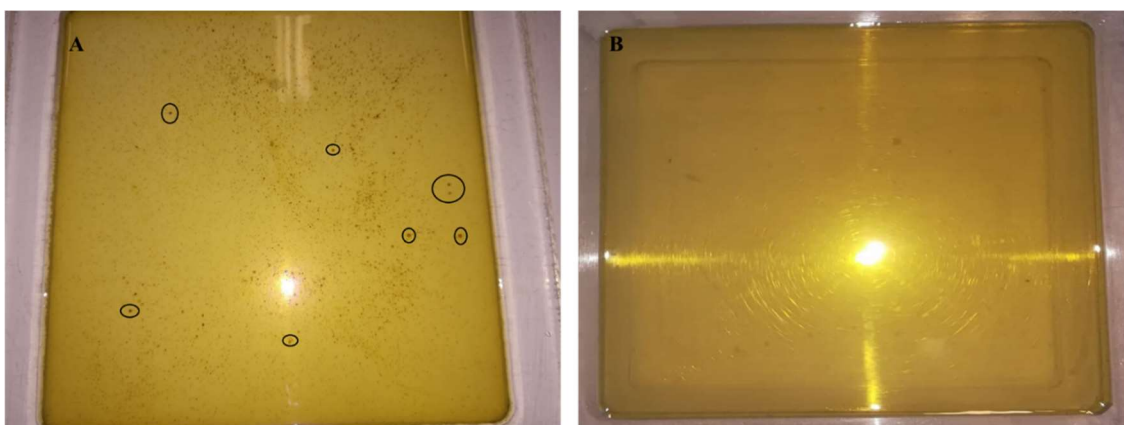


Figura 25- Imagem representativa dos filmes resultantes da imobilização das porfirinas **36a,b** em filmes de amido. Na Figura 25A encontra-se representado o filme de amido evidenciando a precipitação das porfirinas. A Figura 25B é representativa do resultado após as modificações das condições de reação.

A formação dos híbridos **A-36a,b** foi confirmada pela comparação dos espectros de absorção, no estado sólido, dos filmes de amido com e sem a imobilização das porfirinas **36a,b** (Figura 26).

Através da análise do espectro referente ao filme de amido sem os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, podemos constatar que este não possui nenhuma banda de absorção na região de estudo (350 – 750 nm). No entanto, ao analisar os espectros referentes aos filmes **A-36a,b** é visível o aparecimento de uma banda de maior intensidade centrada entre os 350 e os 450 nm, designada banda *Soret*, e de 4 bandas Q de menor intensidade entre os 500 e 700 nm, características das *meso*-tetra-arilporfirinas de base livre. Uma vez que o espectro referente ao filme de amido não absorve nesta região e, após a imobilização dos PSs **36a,b**, obtemos espectros típicos deste tipo de porfirinas, podemos afirmar que a imobilização das porfirinas **36a,b** em filmes de amido foi realizada com sucesso. A imobilização dos compostos **36a,b** em amido, promoveu pequenos desvios hipsocrômicos no aparecimento da banda *Soret* em comparação com os espectros obtidos pelas porfirinas livres, uma vez que esta aparece a 425 e 416 nm no **A-36a** e **A-36b**, respectivamente.

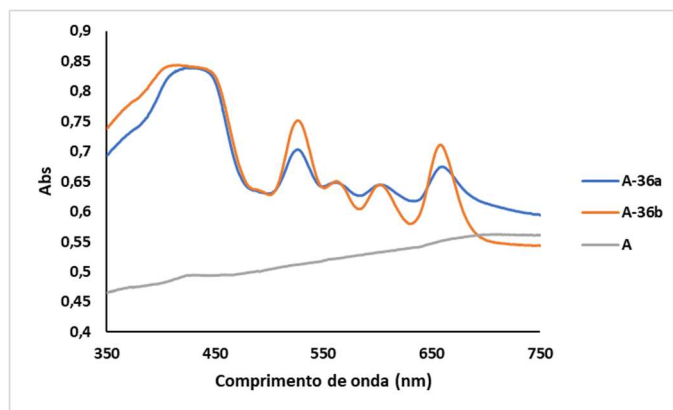
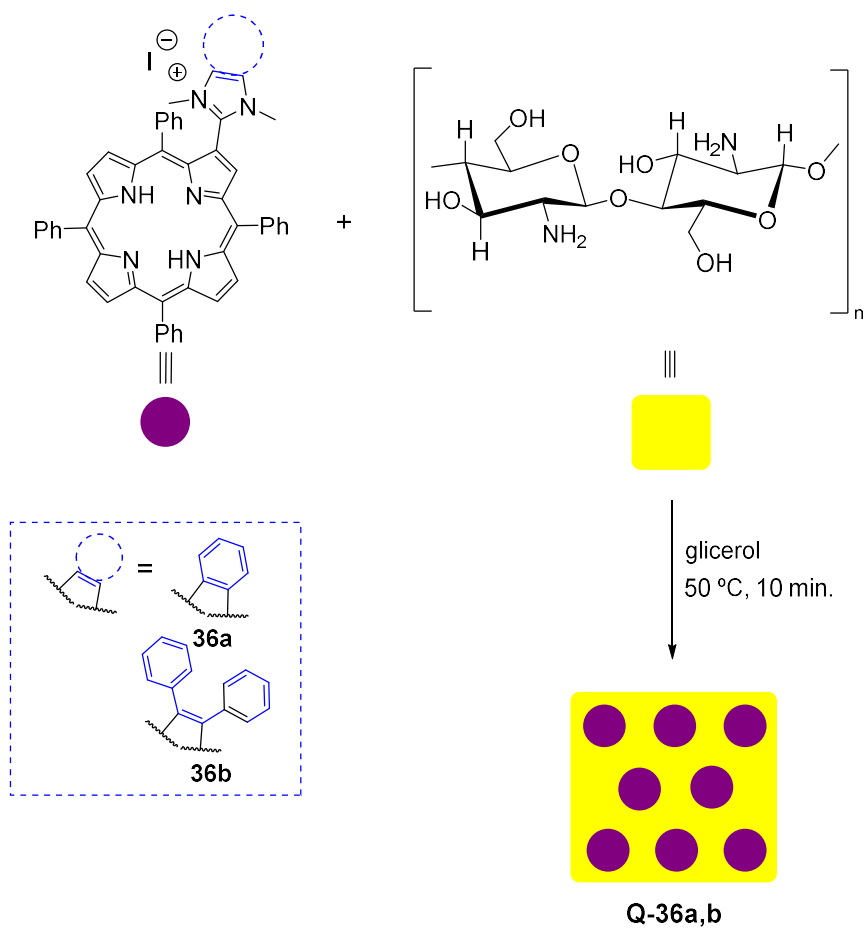


Figura 26- Espectros de absorção no estado sólido do filme de amido e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas **36a,b**, **A-36a** e **A-36b**, à temperatura ambiente.

2.6- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** em filmes de quitosana, **Q-36a,b**

A síntese dos materiais **Q-36a** e **Q-36b** foi obtida através da incorporação das porfirinas **36a,b** (1% m/m) em filmes de quitosana, com o objetivo de obter filmes de quitosana potencialmente eficientes em PDI (Esquema 7). A síntese destes materiais iniciou-se com a solubilização da quitosana em meio ácido. Uma vez que a quitosana é uma base fraca, pelo que não é solúvel em meio neutro, é necessário a acidificação do meio de forma a promover a protonação dos grupos amina tornando a molécula solúvel.⁷⁸ Deste modo, dissolveu-se a quitosana recorrendo a uma solução aquosa de ácido acético (0,01 M), e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, sob agitação, overnight. De seguida, filtrou-se a mistura através de um funil de placa porosa dado que, apesar da quitosana ser para uso laboratorial, continua a apresentar impurezas. Após a filtração, adicionou-se o glicerol como agente plastificante, e aqueceu-se a mistura a 50 °C durante 10 min. De seguida, adicionou-se, lentamente, as porfirinas **36a,b** solubilizadas em 7 mL de EtOH, sob agitação vigorosa. Após a mistura apresentar um aspeto homogéneo, procedeu-se à sua desgaseificação sob vácuo, e a mistura final foi vertida em suportes sólidos de acrílico, colocando em cada molde 31 g da solução (Figura 27). Estes moldes foram guardados numa estufa a 35 °C durante a noite, de forma a ocorrer a evaporação do solvente. Após este período, os filmes foram retirados dos moldes e armazenados numa câmara de humidade controlada com uma solução de nitrato de magnésio (51 % de humidade), onde ficaram durante, pelo menos, 5 dias. Os filmes de quitosana utilizados como controlo, foram sintetizados segundo o mesmo procedimento experimental com exceção da adição dos PSs **36a,b**.



Esquema 7- Representação esquemática da preparação dos híbridos **Q-36a,b** através da imobilização dos PSs **36a,b** em filmes de quitosana.

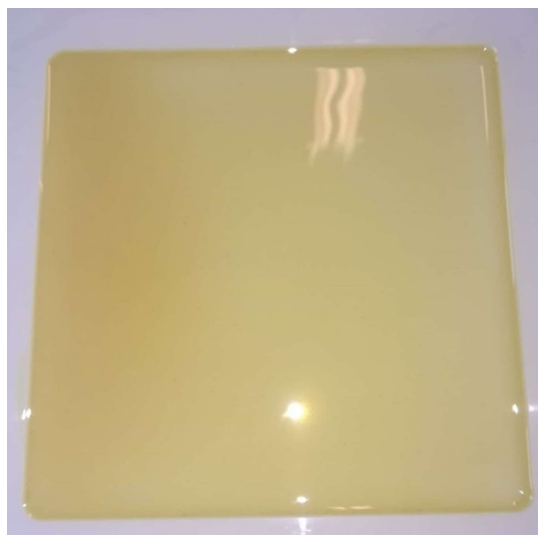


Figura 27- Imagem representativa dos filmes resultantes da imobilização das porfirinas **36a,b** em filmes de quitosana.

A formação dos híbridos **Q-36a,b** foi confirmada pela comparação dos espectros de absorção, no estado sólido, dos filmes de quitosana com e sem a imobilização das porfirinas **36a,b** (Figura 28).

Através da análise do espectro referente ao filme de quitosana sem os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, podemos constatar que este apresenta uma banda de absorção mais intensa a 350 nm. No entanto, ao analisar os espectros referentes aos filmes **Q-36a,b** e à imagem do observado para os filmes de **A-36a,b**, é visível o aparecimento de uma banda de maior intensidade centrada entre os 350 e os 450 nm, designada banda *Soret*, e de 4 bandas Q de menor intensidade entre os 500 e 700 nm, características das *meso*-tetra-arilporfirinas de base livre. Uma vez que o espectro referente ao filme de quitosana apenas absorve na região dos 350 nm e, após a imobilização dos PSs **36a,b**, obtemos espectros típicos deste tipo de porfirinas, podemos afirmar que a imobilização das porfirinas **36a,b** em filmes de quitosana foi realizada com sucesso. A imobilização dos compostos **36a,b** em quitosana, promoveu pequenos desvios hipsocrômicos no aparecimento da banda *Soret* em comparação com os espectros obtidos pelas porfirinas livres, uma vez que esta aparece a 428 e 417 nm no **Q-36a** e **Q-36b**, respetivamente.

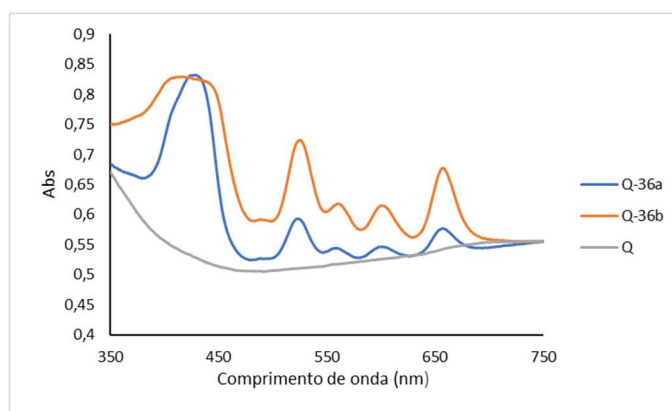


Figura 28- Espectros de absorção no estado sólido do filme de quitosana e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas **36a,b**, **Q-36a** e **Q-36b**, à temperatura ambiente.

2.7- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** em nitreto de carbono grafítico, $CN_{b,m,ex}$ -**36a,b**

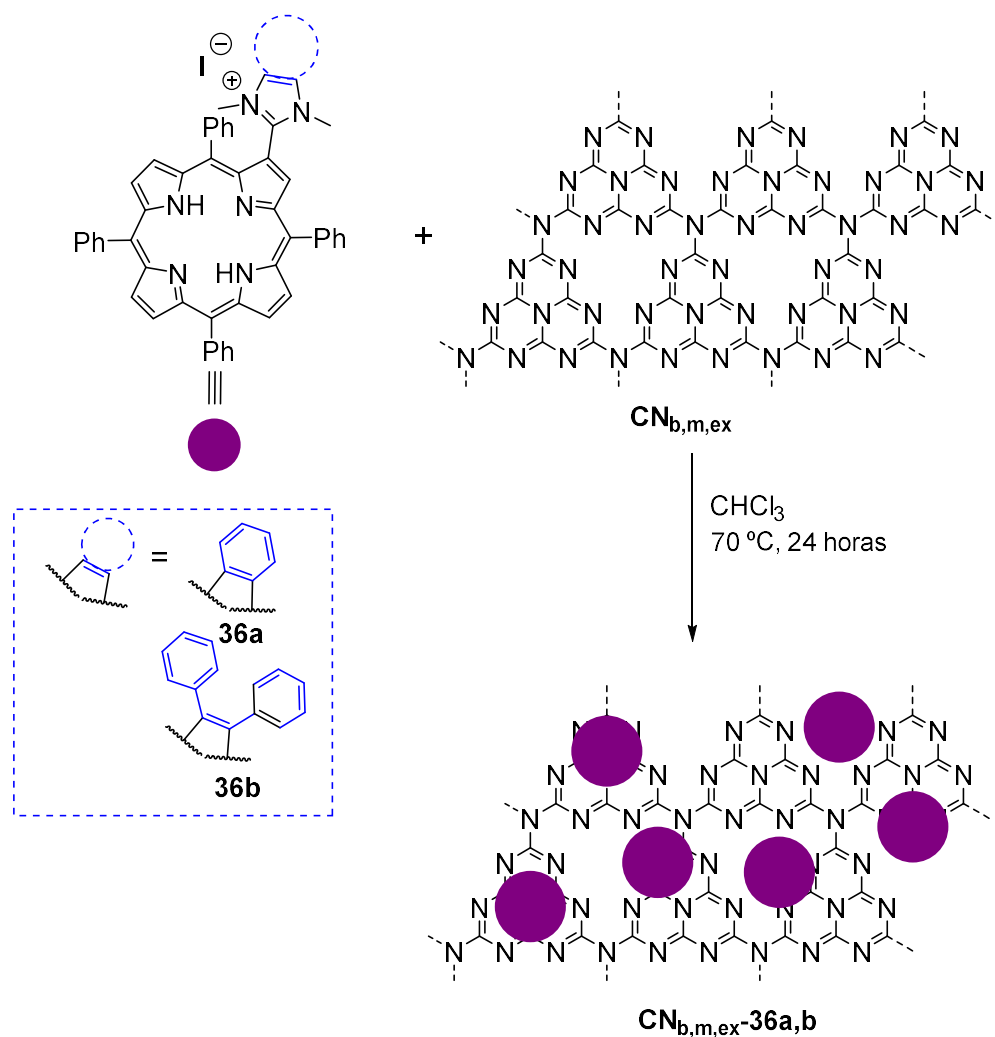
A modificação dos materiais baseados em nitreto de carbono grafítico ($g-C_3N_4$ – daqui em diante designado apenas por CN para facilitar a nomenclatura dos híbridos obtidos) com os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** envolveu a adsorção dos derivados porfirínicos mono-catiônicos na superfície do CN.[‡] Foram utilizados três materiais diferentes CN_b , CN_m e CN_{ex} . A designação CN_b advém de “CN bulk”, sendo que este é o tipo de nitreto de carbono grafítico mais estudado, e cuja síntese está bem otimizada na literatura. Esta envolve o uso de dicianodiamida como precursor e o seu tratamento térmico a elevadas temperaturas no estado sólido. A síntese do CN_m difere do CN_b apenas no precursor usado, dado que em vez de dicianodiamida foi usada melamina, com o intuito de verificar se o uso de um precursor diferente teria influência nas propriedades do material. Por fim, o composto designado por CN_{ex} resulta de um tratamento de exfoliação adicional efetuado ao composto CN_b .⁷¹

A adsorção dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** na superfície dos materiais de nitreto de carbono grafítico ($CN_{b,m,ex}$) foi efetuada através de um método de impregnação envolvendo ligações não-covalentes. Este método implicou adicionar, a uma suspensão de cada um dos compostos $CN_{b,m,ex}$ em clorofórmio, soluções de cada uma das porfirinas mono-catiônicas **36a** e **36b** dissolvidas no mesmo solvente. A suspensão foi agitada a refluxo durante 24 horas, procedendo-se depois à evaporação do solvente, filtração, lavagem e secagem dos híbridos $CN_{b,m,ex}$ -**36a,b** obtidos (Esquema 8). Após a adsorção da porfirina na superfície dos vários compostos de CN observou-se uma alteração de cor de amarelo pálido para uma cor castanha clara.

Devido à deslocalização do sistema de 18 eletrões π presente no macrociclo porfirínico, e no núcleo imidazol, é provável que a interação entre a estrutura do CN e dos derivados porfirínicos catiônicos ocorra através de interações π - π^* *stacking*. Esta

[‡] Os materiais de nitreto de carbono grafítico ($CN_{b,m,ex}$) foram gentilmente cedidos ao abrigo de uma colaboração com o grupo do professor Joaquim Faria do LSRE-LCM da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

estratégia de síntese foi adotada neste trabalho, em vez de outras como por exemplo a utilização de interações covalentes entre o macrociclo porfirínico e o CN, pois pretendia-se que se mantivessem as características únicas de cada molécula, preservando desta forma as propriedades intrínsecas de ambas, além de ser um método de preparação simples e fácil. Desta forma esperava-se obter um efeito simbiótico entre as propriedades do macrociclo porfirínico e do nitreto de carbono grafitico obtendo-se assim fotossensibilizadores mais eficientes em PDI.



Esquema 8- Representação esquemática da imobilização dos PSs **36a,b** em nitreto carbono grafitico, **CN_{b,m,ex}-36a,b**.

A formação dos híbridos **CN_{b,m,ex}-36a,b**, foi confirmada pela comparação dos espectros de absorção no estado sólido dos compostos **CN_{b,m,ex}** antes e depois de serem submetidos ao tratamento para a imobilização das porfirinas **36a,b** (Figura 29). Através da análise dos espectros referentes aos compostos **CN_{b,m,ex}** sem os derivados porfirínicos

é possível observar que todos eles possuem uma banda de absorção com um máximo a, aproximadamente, 415 nm. Esta constatação é demonstrativa de que o CN, só por si, apresenta capacidade de absorção na zona do UV-Vis. Esta é a zona do espectro (400-450 nm) onde surge também a banda *Soret*, característica dos derivados porfirínicos. É possível observar para todos os compostos preparados que, após a imobilização de ambos os derivados porfirínicos **36a,b**, ocorre um alargamento da banda de absorção centrada entre os 350 e os 450 nm, correspondente à absorção da banda *Soret* da porfirina e do CN. A adsorção das porfirinas **36a,b** nos materiais $CN_{b,m,ex}$ promoveu pequenos desvios hipsocrómicos no aparecimento da banda *Soret* em comparação com os espectros obtidos pelas porfirinas livres, uma vez que esta aparece a 435, 430, 430, 424, 430 e 424 nm no CN_b-36a,b , CN_m-36a,b e $CN_{ex}-36a,b$, respetivamente. Estes desvios hipsocrómicos podem ser explicados pela interação do macrociclo porfirínico com a matriz polimérica do CN.

Além das alterações observadas na zona até aos 450 nm, zona típica do aparecimento da banda *Soret*, para todos os híbridos $CN_{b,m,ex}-36a,b$ é possível observar a presença das 4 bandas Q de menor intensidade entre os 500 e 700 nm. Por outro lado, é possível observar que os compostos CN usados como suportes sólidos, não apresentam qualquer banda de absorção entre os 500 e os 700 nm. Este conjunto de dados, permite concluir que a imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiónicos **36a,b** nos vários materiais $CN_{b,m,ex}$ foi realizada com sucesso.

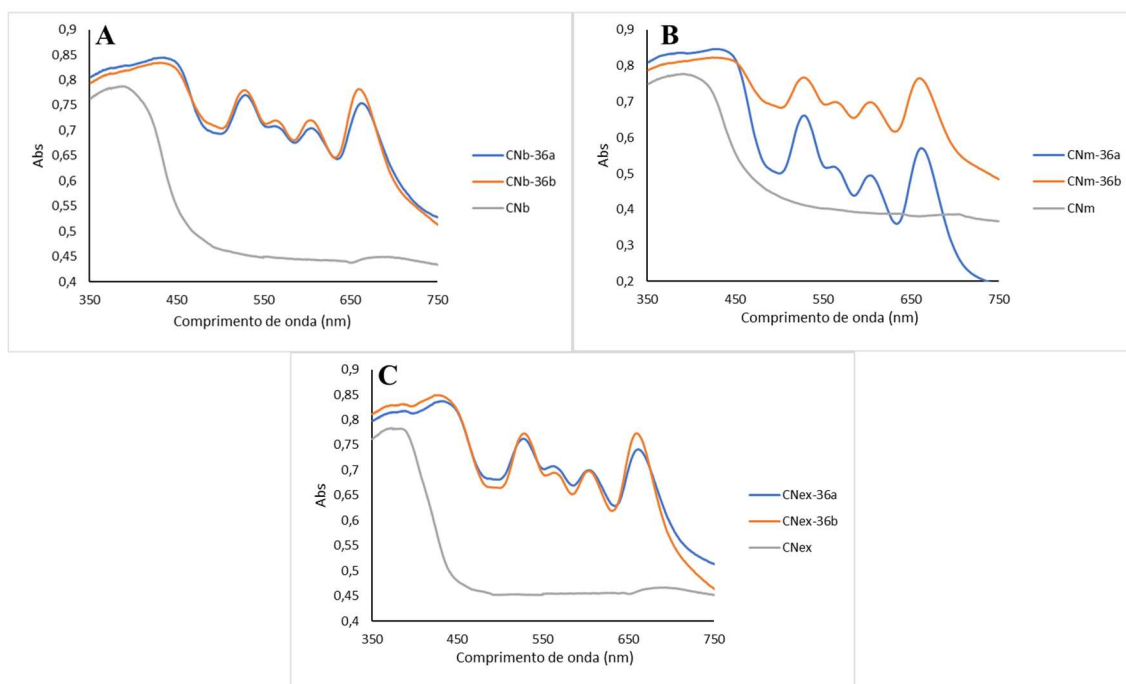


Figura 29- Espectros de absorção no estado sólido dos materiais CN e dos híbridos resultantes da imobilização das porfirinas **36a,b** em CN_b (A), CN_m (B) e CN_{ex} (C), à temperatura ambiente.

2.8- Procedimento experimental

2.8.1- Síntese dos derivados porfirina-imidazol neutros 35a-b

2.8.1.1- Síntese do derivado porfirina-imidazol neutro 35a

A uma solução de **TPP-CHO** (0,05 g, $7,78 \times 10^{-5}$ mol) em 1,2-diclorobenzeno (3 mL) foi adicionado 1,5 equivalentes de *o*-fenilenodiamina (0,013 g, $1,17 \times 10^{-4}$ mol), e 0,6 equivalentes do catalisador γ -ZrP (0,015 g, $4,47 \times 10^{-5}$ mol). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética a refluxo, durante 6 horas. Ao fim deste período a análise por TLC permitiu observar o total consumo da porfirina de partida, e após o término da reação, deixou-se arrefecer a mistura reacional até à temperatura ambiente. De seguida procedeu-se à evaporação do solvente, e o composto foi purificado por coluna cromatográfica usando, primeiramente hexano de forma a eliminar o 1,2-diclorobenzeno, e de seguida uma mistura CH₂Cl₂/MeOH (99:1) como eluente.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃/ CD₃OD): δ 9,20 (1H, s, H-3), 8,89–8,76 (6H, m, H- β), 8,23–8,20 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,07 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-*o*-Ph), 7,81–7,70 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,50–7,40 (2H, m, H-1'' e H-4''), 7,25–7,20 (4H, m, H-*m*-Ph, H-2'' e H-3''), 7,06 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, H-*p*-Ph) ppm.

MS-ESI(+): m/z 731,5 [M+H]⁺.

2.8.1.2-Síntese do derivado porfirina-imidazol neutro 35b

Num balão de fundo redondo, adicionou-se **TPP-CHO** (0,05 g, $7,78 \times 10^{-5}$ mol), 1,5 equivalentes de benzil (0,024 g, $1,14 \times 10^{-4}$ mol), 20 equivalentes de acetato de amónio (0,12 g, $1,56 \times 10^{-3}$ mol), ácido acético (0,4 mL) e tolueno em fio de sódio (2 mL). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética, a 120 °C, durante 3 horas. Após este período, a análise por TLC demonstrou o consumo total da porfirina de partida e, conseqüente formação de um novo composto, deixando-se arrefecer a mistura reacional até à temperatura ambiente. Procedeu-se à neutralização da mistura com bicarbonato de sódio, seguindo-se a extração com CH₂Cl₂ e evaporação do solvente. A mistura reacional foi purificada por coluna cromatográfica usando uma mistura CH₂Cl₂/MeOH (99:1) como eluente.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) = δ 9,26 (1H, s, H-3), 8,86 e 8,84 (2H, sistema AB, *J* = 4,9 Hz, H-β), 8,82 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,80 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-β), 8,78 (1H, d, *J* = 4,9 Hz, H-β), 8,74 (1H, d, *J* = 4,9 Hz, H-β), 8,34 (1H, s, H-10), 8,23–8,20 (6H, m, H-*o*-Ph), 8,16–8,15 (2H, m, H-*o*-Ph), 7,80–7,76 (11H, m, H-*m,p*-Ph), 7,36–7,26 (11H, m, H-*p*-Ph, H-2',6', H-3',5' e H-4'), - 2,62 (2H, s, N-H) ppm.

MS-ESI(+): m/z 833.4 [M+H]⁺.

2.8.2-Síntese dos derivados porfirina-imidazol β-catiónicos 36a,b

Num tubo selado, adicionou-se o derivado porfirínico neutro **35a** (0,035 g, $4,79 \times 10^{-5}$ mol) ou **35b** (0,024 g, $2,88 \times 10^{-5}$ mol) dissolvido em DMF (1,5 mL), e 60 equivalentes de iodeto de metilo. A mistura reacional foi deixada a 40 °C durante 60 horas, sob agitação e, após este período, deixou-se arrefecer o tubo à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se éter dietílico de forma a precipitar o composto **36a** ou **36b**, e o precipitado foi filtrado, sendo que o excesso de iodeto de metilo foi recolhido num copo com dietilamina. Após a filtração, o precipitado foi dissolvido numa mistura de CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1) e o solvente foi evaporado em pressão reduzida. Os compostos **36a,b** foram isolados após cristalização numa mistura de CH₂Cl₂/hexano.

Composto 36a. $^1\text{H RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,50 (1H, s, H-3), 9,08 (1H, d, $J = 5,0$ Hz H- β), 9,03 (1H, d, $J = 5,0$ Hz H- β), 8,93 (1H, d, $J = 5,0$ Hz H- β), 8,77–8,76 (2H, m, H- β), 8,74 (1H, d, $J = 4,9$ Hz H- β), 8,37–8,35 (2H, m, H-*o*-Ph), 8,26–8,24 (2H, m, H-*o*-Ph), 8,23–8,20 (4H, m, H-*o*-Ph), 7,94 (2H, dd, $J = 3,2$ e $6,2$ Hz, H-1'' e H-4''), 7,89–7,83 (9H, m, H-*m,p*-Ph), 7,75 (2H, dd, $J = 3,2$ e $6,2$ Hz, H-2'' e H-3''), 7,28 (2H, t, $J = 7,7$ Hz, H-*m*-Ph), 6,94 (2H, t, $J = 7,7$ Hz, H-*p*-Ph), 3,83 (6H, s, H-1' e H-3'), -2,73 (2H, s, N-H) ppm.

MS-ESI(+): m/z 759.6 [M] $^+$.

Composto 36b. $^1\text{H RMN}$ (500.13 MHz, DMSO- d_6) = δ 9,45 (1H, s, H-3), 9,05 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H- β), 9,01 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,95 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,80 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,76 e 8,73 (2H, sistema AB, $J = 4,8$ Hz, H- β), 8,37–8,34 (4H, m, H-*o*-Ph), 8,25–8,21 (4H, m, H-*o*-Ph), 7,91–7,79 (12H, m, H-*m,p*-Ph), 7,56–7,50 (6H, m, H-2', 6' e H-4'), 7,41–7,39 (4H, m, H-3', 5'), 3,48 (6H, s, -CH $_3$), -2,72 (2H, s, N-H) ppm.

MS-ESI(+): m/z 861.4 [M] $^+$.

2.8.3-Incorporação dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em micelas de PVP, PVP-36a,b

Num copo, dissolveram-se 0,052 g de *N*-vinilpirrolidona no volume mínimo de CHCl $_3$ necessário para dissolver todo o precursor polimérico. Num outro copo, foram dissolvidas 0,0052 g dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** (10% m/m) num volume reduzido do mesmo solvente. As soluções das porfirinas **36a,b** e de *N*-vinilpirrolidona em CHCl $_3$ foram misturadas e agitou-se a solução resultante até à sua completa homogeneização. De seguida, deixou-se evaporar todo o solvente e a formulação foi seca numa estufa a 40 °C durante 48 horas. Após a secagem obteve-se um sólido acastanhado que foi dissolvido em 1,67 mL de água destilada.

2.8.4-Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de amido, A-36a,b

Num kitasato, preparou-se uma dispersão de amido [40% (m/V)] em água destilada, com 30% (m/m) de glicerol. A dispersão foi aquecida a 95 °C e mantida sob agitação magnética durante 30 min. Após este período, adicionou-se lentamente 0,02 g da porfirina **36a,b** (1% m/m) solubilizada em 7 mL de EtOH. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética a 95 °C, até se observar a sua homogeneização, procedendo-se depois à sua desgaseificação recorrendo a uma bomba de vácuo (Vacuum Pump V-300, Buchi). Após a desgaseificação, a dispersão de amido gelatinizada final foi transferida para um suporte sólido de acrílico (12 x 12 cm), colocando em cada um dos moldes 21 g da solução. Os moldes foram deixados na estufa a 25 °C, durante a noite (12 horas). Após este período, os filmes obtidos foram retirados dos moldes e armazenados numa câmara de humidade controlada com uma solução saturada de nitrato de magnésio (51% de humidade) para estabilização da matriz durante, pelo menos, 5 dias. Preparou-se um filme sem a adição do derivado porfirina-imidazol β -catiônico **36a,b** para ser utilizado como controlo.

2.8.5- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos 36a,b em filmes de quitosana, Q-36a,b

Num copo preparou-se uma dispersão de quitosana [15% (m/V)] numa solução de ácido acético 0,1 M. A dispersão foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 16 horas. De seguida, filtrou-se a mistura com o auxílio de um funil de placa porosa para um kitasato, e acrescentou-se glicerol (25% m/m). A mistura foi aquecida a 50 °C, sob agitação magnética, durante 10 min. e, após esse período, adicionou-se, lentamente, 0,075 g da porfirina **36a,b** (1% m/m) solubilizada em 7 mL de EtOH. Após a homogeneização da mistura, procedeu-se à sua desgaseificação recorrendo a uma bomba de vácuo (Vacuum Pump V-300, Buchi), e a dispersão de quitosana gelatinizada final foi transferida para um suporte sólido de acrílico (12 x 12 cm), colocando em cada um dos moldes 31 g da solução. Os moldes foram deixados na estufa

a 35 °C durante a noite (12 horas) e, após este período, os filmes obtidos foram retirados dos moldes e armazenados numa câmara de humidade controlada com uma solução de nitrato de magnésio (51% de humidade) para estabilização da matriz durante, pelo menos, 5 dias. Preparou-se um filme sem a adição do derivado porfirina-imidazol β -catiónico **36a,b** para ser utilizado como controlo.

2.8.6- Imobilização dos derivados porfirina-imidazol β -catiónicos **36a,b em nitreto de carbono grafitico, $CN_{b,m,ex}$ -**36a,b****

Num balão de fundo redondo, com agitador magnético, adicionou-se 0,1 g de CN_b , CN_m ou CN_{ex} , e o sólido foi disperso em $CHCl_3$. À dispersão de cada um dos materiais, adicionou-se o derivado porfirina-imidazol β -catiónico **36a** ou **36b** (0,01 g) dissolvidos em $CHCl_3$, e a mistura foi deixada sob agitação, a 70 °C durante 24 horas. Após este período o derivado porfirínico foi adsorvido na superfície do material e evaporou-se o solvente. Ao balão adicionou-se hexano, filtrou-se o sólido e lavou-se com hexano. O sólido foi seco numa estufa a 40 °C durante 48 horas obtendo-se assim os compostos $CN_{b,m,ex}$ -**36a,b** pretendidos, contendo [10% (m/m)] de **36a,b**.

3-Estudo da eficiência fotodinâmica antimicrobiana dos derivados porfirina-imidazol β -catiónicos, das suas formulações em PVP e dos materiais sólidos preparados

3.1-Preâmbulo

Como já foi referido anteriormente, as porfirinas e seus análogos são uma classe de compostos que têm despertado a atenção de diversos grupos de investigação devido às potencialidades que apresentam em atuarem como PSs em PDT e PDI. Estas são técnicas que envolvem a combinação de um PS, oxigénio molecular e luz. O processo fotodinâmico leva à geração de espécies citotóxicas, designadas por ROS, como oxigénio singlete (1O_2). Existem vários fatores dos quais depende a eficiência do processo fotodinâmico, nomeadamente a capacidade do PS gerar 1O_2 , a sua estabilidade estrutural quando expostos à irradiação e a sua concentração junto das células alvo.

Neste capítulo encontram-se descritos os estudos de geração de $^1\text{O}_2$ e de fotoestabilidade dos PSs **36a,b**, das suas formulações em PVP e dos híbridos resultantes da sua imobilização em diferentes matrizes sólidas, como filmes de amido e quitosana, e carbono nitreto grafitico (CN). Neste capítulo será ainda discutida a avaliação da capacidade dos vários tipos de PSs preparados para serem usados em PDI, nomeadamente na fotoinativação da bactéria de Gram-negativo *E.coli* e na bactéria de Gram-positivo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)]. A escolha destas bactérias recaiu no facto de apresentarem resistência a um vasto leque de antibióticos, sendo responsáveis por um elevado número de infeções com repercussões para o Homem. Apesar da resistência que exibem à ação dos antibióticos, estas bactérias são suscetíveis ao tratamento através da PDI, encontrando-se descritos estudos demonstrativos dessa suscetibilidade.^{27,28,79,80}

3.2-Estudos de fotoestabilidade

3.2.1- Estudos de fotoestabilidade dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** e das suas formulações em PVP

A potencialidade de um composto em atuar como PS em PDI, é fortemente dependente da capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ e na estabilidade que este apresenta quando irradiado, uma vez que uma das principais características desta técnica reside na exposição do PS à luz.⁵ Os espectros de absorção, permitem observar se ocorrem variações significativas na absorvância do composto ao longo do período de irradiação, indicando se ocorreram alterações nas propriedades físico-químicas do composto, alterando o seu perfil de absorção. A fotoestabilidade dos PSs **36a,b** (0,5 μM), **PVP-36a** e **PVP-36b** (5 μM) foi avaliada em PBS, sob uma irradiação com luz branca com uma irradiância de 40 mW/cm^2 . Monitorizou-se o decréscimo da absorvância da banda *Soret* ao longo de 30 min. de irradiação, em intervalos de 5 min., e os resultados encontram-se representados na Figura 30.

Os espectros de absorvância dos PSs **36a,b** (Figura 30A,B) e da formulação **PVP-36a** (Figura 30C,D) mostram que ocorre uma diminuição da absorvância na banda *Soret* de cerca de 13, 14 e 12% respetivamente, ao fim de 30 min. de irradiação. Esta diminuição não é considerada significativa, pelo que se pode afirmar que estes PSs são estáveis quando expostos às condições experimentais de irradiação. No entanto, o

espectro de absorvância do **PVP-36b** observou-se um decréscimo de, aproximadamente, 25%, mostrando que esta formulação sofre fotodegradação nestas condições de irradiação. De qualquer forma, em nenhum dos casos se observa qualquer evidencia da formação de qualquer outro produto estável resultante desta fotodecomposição.

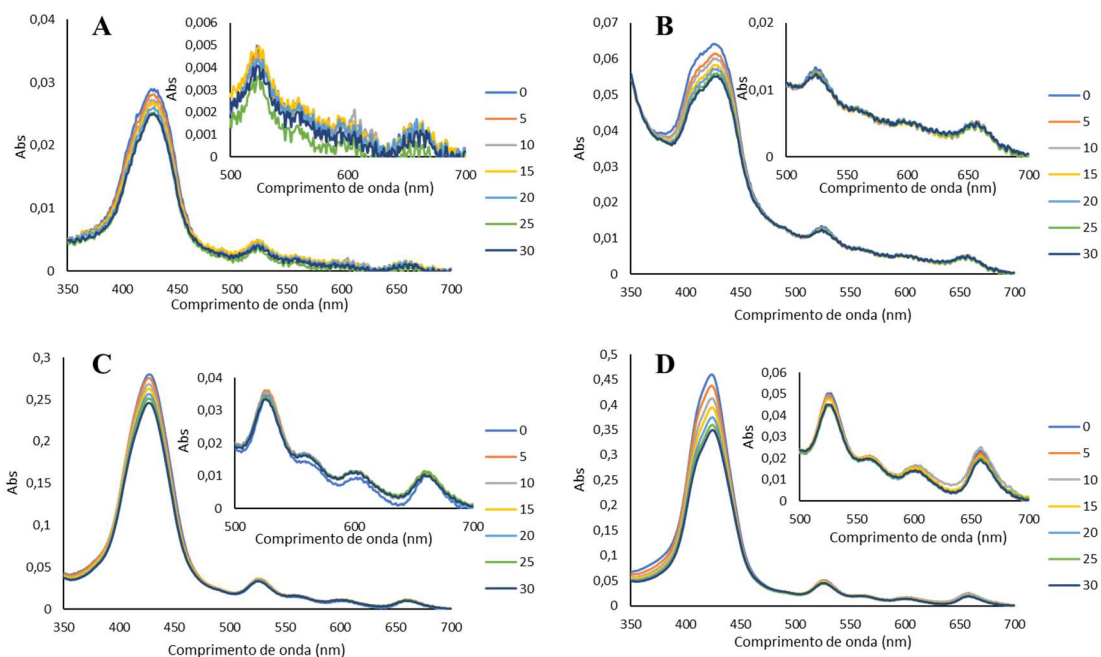


Figura 30- Espetros de absorção, em PBS, dos PSs **36a** (A) e **36b** (B) a 0,5 μM , e das suas formulações em PVP, **PVP-36a** (C) e **PVP-36b** (D) a 5 μM , após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm^2 , à temperatura ambiente.

3.2.2-Estudos de fotoestabilidade dos materiais sólidos preparados

No caso dos materiais de amido, quitosana e de nitreto carbono grafítico, houve a necessidade de se adaptar as condições de estudo, de forma a não promover erros de interpretação nos espectros de absorção. Uma vez que estes PSs originam uma solução heterogénea aquando do contacto com o PBS, não é possível auferir os espectros de absorção da mesma forma que os dos compostos em solução, estudados anteriormente. Desta forma, registaram-se os espectros de absorção no estado sólido destes PSs (25 μM) antes e após 30 min. de irradiação com luz branca e uma irradiância de 40 mW/cm^2 (Figura 31), e analisou-se o decréscimo observado na intensidade da banda *Soret*. Na Figura 28 estão apenas representados os espectros de absorção dos PSs **A-36b**, **Q-36b** e **CN_{ex}-36b**. Os restantes espectros encontram-se representados nos anexos.

Para todos os PSs estudados, verificou-se que não ocorreram variações significativas na intensidade de absorção da banda *Soret* após os 30 min. de irradiação, tendo sido registados decréscimos na ordem dos 5%. É importante realçar que durante o estudo registaram-se inevitáveis perdas de massa, que podem ser traduzidas em algumas variações mais significativas que se possam observar. De um modo geral, todos os PSs avaliados demonstraram ser altamente estáveis sob as condições de irradiação utilizadas.

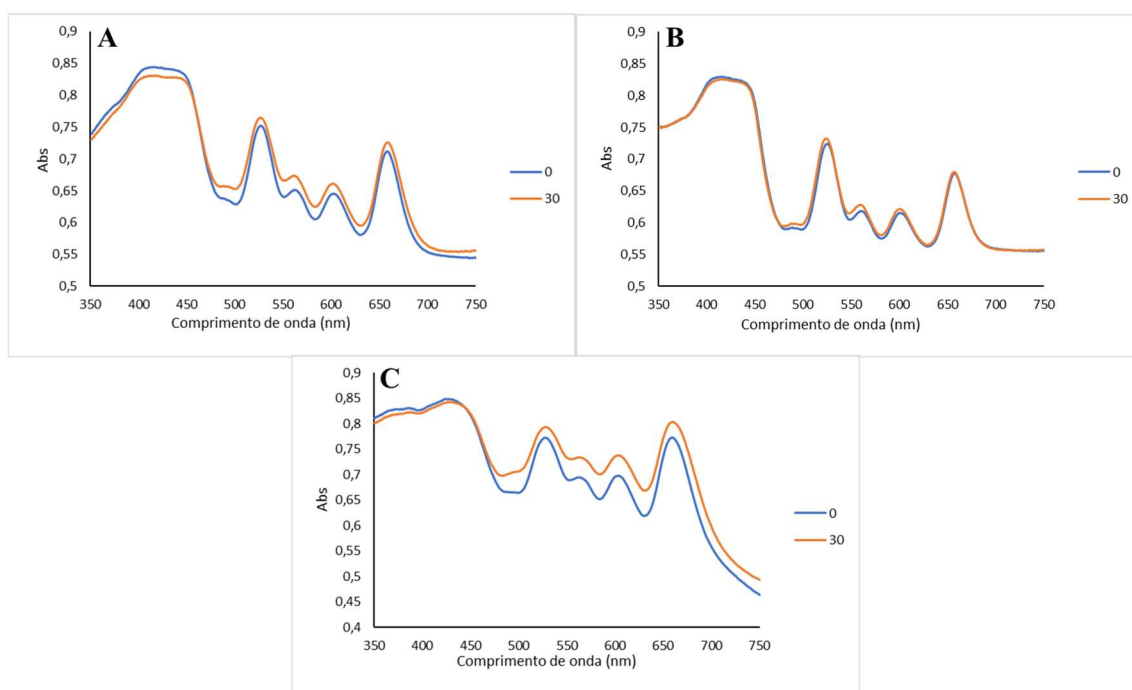
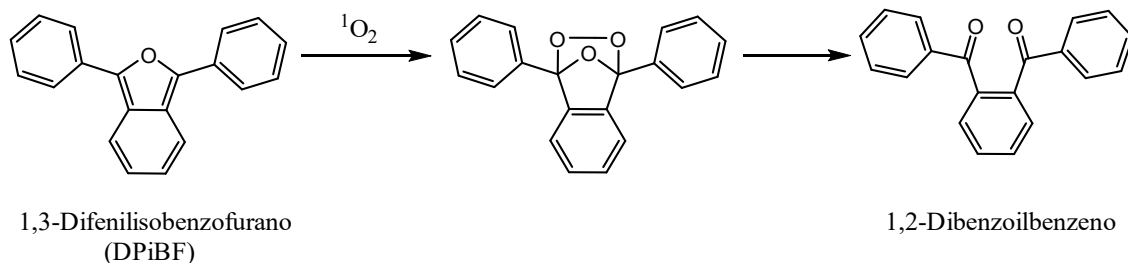


Figura 31- Espectros de absorção, em PBS, dos PSs **A-36b** (A), **Q-36b** (B) e **CN_{ex}-36b** (C) a 25 µM, após 0 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm², à temperatura ambiente.

3.3-Estudo da geração de oxigénio singlete (¹O₂) dos derivados porfirina-imidazol β-catiónicos 36a,b, das suas formulações em PVP e dos materiais sólidos preparados

A eficiência de um PS em PDI, está relacionada com a habilidade do mesmo em gerar ROS, nomeadamente ¹O₂.⁸¹ Com o propósito de avaliar a capacidade dos PSs sintetizados em produzir este tipo de espécie citotóxica, procedeu-se à preparação de diferentes soluções de PSs na presença de DPiBF (50 µM). O DPiBF, que absorve radiação visível a um comprimento de onda máximo de 415 nm, ao reagir com o ¹O₂ gerado sofre reações de cicloadição [4+2], convertendo-se em 1,2-dibenzoilbenzeno, que

é incolor (Esquema 9). O decaimento da absorvância do DFiBF, a 415 nm, permite assim a avaliar a capacidade do PS em gerar $^1\text{O}_2$.⁸²



Esquema 9- Degradação do DFiBF em 1,2-Dibenzoilbenzeno por ação do $^1\text{O}_2$.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 32), é possível verificar que os PSs **36a,b** (0,5 μM) e as formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** (0,5 μM), quando irradiados, são capazes de gerar $^1\text{O}_2$, podendo, potencialmente, atuar como PSs em PDI. O PS **PVP-36a** foi o que apresentou maior capacidade de gerar $^1\text{O}_2$, induzindo um maior decréscimo na absorvância do DFiBF. Apenas o PS **36a** apresenta resultados inferiores aos obtidos pela **TPP**, que é usada como referência devido a sua eficiência em produzir $^1\text{O}_2$.⁸³ Na Figura 32 podemos ainda observar que o **PVP** (usado como controlo) não é capaz de gerar esta espécie citotóxica, apresentando um comportamento semelhante ao apresentado pelo DFiBF.

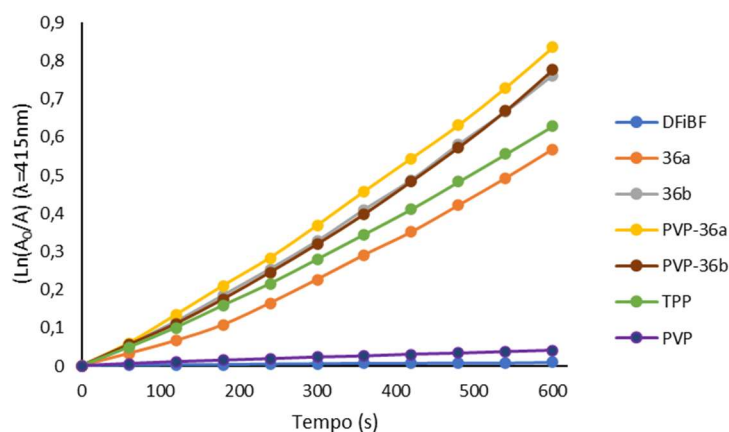


Figura 32- Fotodecomposição do DFiBF (50 μM) através da ação do $^1\text{O}_2$ gerado pelos PSs **36a,b** a 0,5 μM , pelas formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** a 0,5 μM , pela TPP e PVP a 0,5 μM , quando sujeitos a uma irradiação de luz vermelha (654 ± 20 nm) com uma irradiância de 11,0 mW/cm^2 , durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

Foi também avaliada a capacidade dos PSs **A-36a**, **A-36b**, **Q-36a** e **Q-36b** (20 μM) em gerar $^1\text{O}_2$, e os valores obtidos estão representados na Figura 33. Uma vez que estes materiais se encontram no estado sólido, houve a necessidade de aumentar a concentração porfirínica em comparação com o estudo dos PSs em solução (**36a,b** e **PVP-36a,b**). Através da análise da Figura 33, constatamos que, à exceção do PS **Q-36a**, todos foram capazes de produzir $^1\text{O}_2$, sendo que o PS **A-36b** foi aquele que mostrou ser mais eficiente. Podemos observar ainda, que as porfirinas **36a,b** imobilizadas em filmes de amido são mais eficientes na geração desta espécie citotóxica do que os filmes **Q-36a** e **Q-36b**. Também foram estudados filmes de amido e quitosana sem a presença da porfirina (**A** e **Q**, respetivamente) de forma a avaliar a capacidade destes materiais em produzir ROS. Os resultados observados demonstram que estes materiais não geram $^1\text{O}_2$, nas condições experimentais utilizadas.

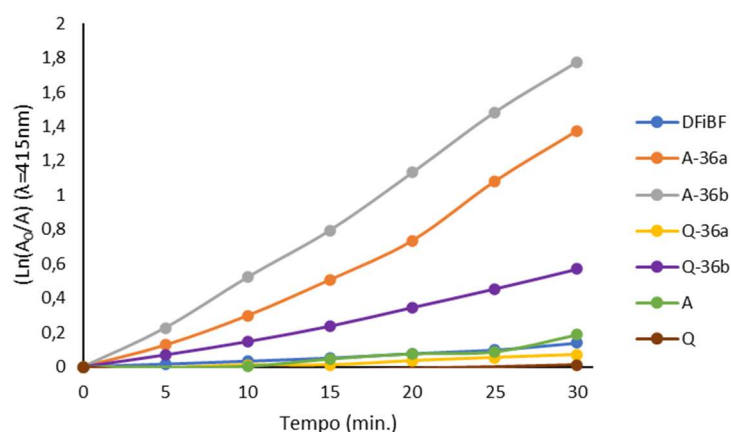


Figura 33- Fotodecomposição do DFIBF (50 μM) através da ação do $^1\text{O}_2$ gerado pelos **A-36a** e **A-36b** a 20 μM , pelos **Q-36a** e **Q-36b** a 20 μM , e pelos (**A**) e (**Q**) sem a incorporação dos PSs **36a,b**, quando sujeitos a uma irradiação de luz vermelha ($654 \pm 20 \text{ nm}$) com uma irradiância de $11,0 \text{ mW/cm}^2$, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Não foi possível avaliar a capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ por parte das porfirinas **36a,b** imobilizadas nos materiais de $\text{CN}_{b,m,ex}$, uma vez que, neste caso as porfirinas apenas se encontram adsorvidas na estrutura dos materiais. Logo quando se preparou a suspensão destes híbridos em DMF, observou-se a solubilização dos derivados porfirínicos **36a,b**, e conseqüente destruição dos híbridos $\text{CN}_{b,m,ex-36a,b}$. Este facto faz com que ocorra um significativo aumento da absorção, inviabilizando o acompanhamento

do decréscimo da absorção do DFiBF ao longo do tempo. Com o objetivo de contornar esta dificuldade experimental, procedeu-se à alteração do solvente para PBS. Contudo, como se trata de uma solução aquosa, esta atua como *quencher* do $^1\text{O}_2$ impedindo a captação do mesmo por parte do DFiBF. No entanto, uma vez que as porfirinas **36a,b** são capazes de gerar $^1\text{O}_2$ (demonstrado na Figura 32) e que, existem diversos relatos na literatura que atestam a capacidade do material $g\text{-C}_3\text{N}_4$ para gerar ROS^{74,75}, é expectável que os PSs $\text{CN}_{b,m,ex}$ -**36a,b** também sejam capazes de gerar $^1\text{O}_2$, ou qualquer outra ROS.

3.4-Estudo da fotoinativação da bactéria *E. coli*

3.4.1- Estudo da fotoinativação da bactéria *E. coli* na presença dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, **36a,b**, e das formulações PVP-**36a,b**

Após a conclusão dos estudos de fotoestabilidade e de geração de $^1\text{O}_2$ dos compostos/materiais sintetizados, procedeu-se à avaliação da potencialidade destes em atuarem como PSs em PDI. Inicialmente, estudou-se a eficiência fotodinâmica dos compostos **36a,b** (20 μM) e das formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** (40 μM) na inativação da bactéria de Gram-negativo, *E. coli* (Figura 34). A maior concentração porfirínica utilizada no estudo das formulações **PVP-36a,b** em comparação com a do estudo dos PSs livres **36a,b**, advém do facto destas porfirinas, por se apresentarem incorporadas num material, estarem menos dispersas na suspensão bacteriana reduzindo a área de absorção da irradiação. Os estudos foram realizados usando uma fonte de luz branca, com irradiância de 80 mW/cm^2 , sob agitação constante durante 120 min. Os resultados obtidos referentes aos PSs **36a,b** encontram-se representados na Figura 34A, onde é possível verificar que ambos os compostos promoveram a inativação da *E. coli* atingindo o limite de deteção do método ao fim dos 120 min. de irradiação. No entanto, os perfis de inativação são diferentes para os dois compostos. O PS **36a** induziu um decréscimo contínuo ao longo do tempo de irradiação, tendo apenas alcançado o limite de deteção do método (correspondendo a um decréscimo de 7,35 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$) ao fim de 120 min. No caso do PS **36b**, observa-se um decréscimo abrupto na sobrevivência desta bactéria, tendo sido atingido o limite de deteção do método (correspondente a um decréscimo de 7,43 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$) logo após os primeiros 30 min. de irradiação. Esta diferença de eficácia, pode

ser justificada pela maior capacidade do PS **36b** gerar $^1\text{O}_2$, quando comparado com o PS **36a**. É possível ainda verificar que não ocorreram variações significativas na viabilidade da bactéria nos controlos realizados CC e CE, mostrando que nem as condições de irradiação nem a presença do PS afetam a viabilidade da bactéria.

Os resultados obtidos na fotoinativação da *E. coli* quando as formulações **PVP-36a,b** foram usadas como PSs (Figura 34B), mostram que o perfil de fotoinativação é muito idêntico entre estes dois PSs. Em ambos os casos, o limite de deteção do método é alcançado após 90 min. de irradiação (correspondendo a uma diminuição de 7,38 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$). O impacto destes compostos na viabilidade da *E. coli*, começa a ser mais significativo ao fim de 60 min. de irradiação, induzindo um decréscimo na atividade celular de 2,24 e 3,43 logs CFU/mL (ANOVA, $p < 0,05$), para o **PVP-36a** e **PVP-36b**, respetivamente. A semelhança no perfil de fotoinativação destas formulações em PVP, pode ser fundamentada pela capacidade similar que estes PSs possuem em produzir $^1\text{O}_2$. À semelhança do observado para os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b**, não se observam alterações significativas na sobrevivência da *E. coli* nos controlos claro e escuro.

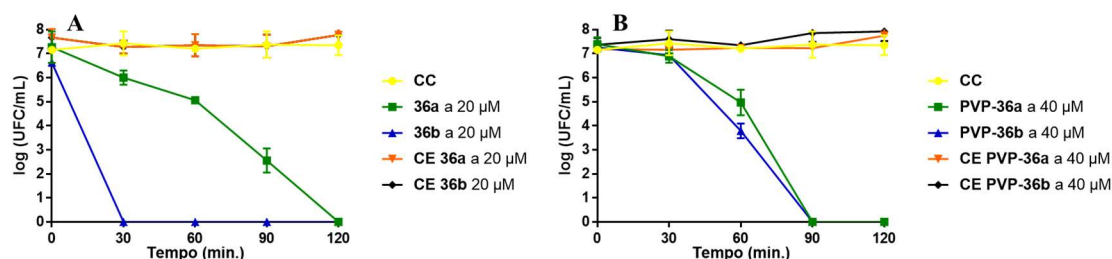


Figura 34- Monitorização da viabilidade da bactéria *E. coli* quando exposta aos PSs **36a,b** a 20 μM (A) e a **PVP-36a** e **PVP-36b** a 40 μM (B), após 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm^2 . CC-controlo claro; CE-controlos escuros.

3.4.2-Estudo da fotoinativação da bactéria *E. coli* na presença dos materiais suportados A-36a e Q-36a

A eficiência dos filmes **A-36a** e **Q-36a** na fotoinativação da *E. coli* foi avaliada nas mesmas condições de irradiação descritas anteriormente, com os PSs a uma concentração de 20 μM . Os resultados obtidos (Figura 35) mostram que nenhum dos

filmes preparados é capaz de fotoinativar esta bactéria de Gram-negativo, mesmo após 120 min. de irradiação. Tendo em conta estes resultados, decidiu-se alterar as condições de estudo, aumentando a concentração da porfirina no material para 50 μM , nas mesmas condições de irradiação. Os resultados obtidos foram muito idênticos aos observados nas condições anteriores, indicando que estes filmes não são eficientes na inativação da *E. coli*. Apesar do resultado obtido para o PS **Q-36a** ser expectável devido à sua fraca eficiência de geração de $^1\text{O}_2$, o resultado obtido para o PS **A-36a** foi surpreendente, uma vez que, o PS no seu estado livre ou incorporado em micelas de PVP, mostrou ser bastante eficaz na fotoinativação da *E. coli*. Estes resultados podem ser explicados pela fraca disponibilidade do PS quando está imobilizado nestes filmes, uma vez que as porfirinas estão imobilizadas num material sólido e as bactérias em solução. O $^1\text{O}_2$ tem um tempo de vida muito reduzido e, portanto, esta espécie tem de ser gerada muito próxima do local de atuação. Para além disso, no caso da fotoinativação de bactérias de Gram-negativo, a interação da carga positiva do PS com a membrana da bactéria é essencial para uma fotoinativação eficiente.^{18,49} Muito provavelmente, estes requisitos não são cumpridos por estes PSs estarem imobilizados nestes filmes.

Tendo em conta que os materiais **CN_{b,m,ex-36a,b}** possuem características semelhantes aos PSs de filmes de amido e quitosana, nomeadamente o facto de o PS estar no estado sólido, optou-se por não avaliar a eficiência destes na fotoinativação da *E. coli*.

Por outro lado, devido à elevada suscetibilidade à PDI das bactérias de Gram-positivo quando comparadas às de Gram-negativo, decidiu-se estender este estudo à bactéria de Gram-positivo MRSA.

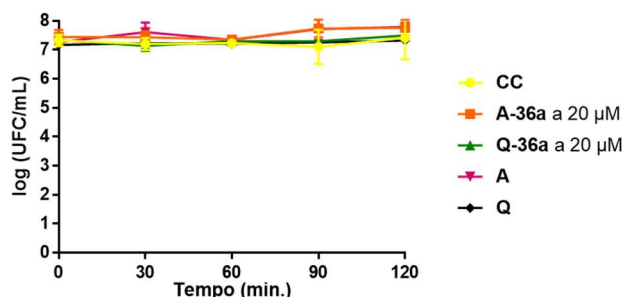


Figura 35- Monitorização da viabilidade da bactéria *E. coli* quando exposta a **A-36a** e **Q-36a** a 20 μM , após 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm^2 . CC-controlro claro; A-filme de amido sem a imobilização do PS **36a**; Q- filme de quitosana sem a imobilização do PS **36a**.

3.5- Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA

3.5.1- Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos derivados porfirina-imidazol β -catiônicos, 36a,b e das formulações PVP-36a,b

Com o intuito de analisar o comportamento dos PSs sintetizados na fotoinativação da bactéria de Gram-positivo MRSA, procedeu-se, inicialmente, ao estudo da eficiência dos PSs **36a,b**, **PVP-36** e **PVP-36b** contra esta estirpe bacteriana, sob as mesmas condições de irradiação dos ensaios prévios durante 90 min. Uma vez que estes PSs demonstraram uma elevada eficiência na fotoinativação da *E. coli*, esperava-se que os mesmos demonstrassem essa mesma eficiência, em concentrações menores, numa bactéria de Gram-positivo.

Procedeu-se então ao estudo dos compostos **36a,b** (0,5 μ M) e **PVP-36a,b** (5 μ M), e os resultados observados encontram-se representados na Figura 36. Estes resultados mostram uma elevada eficiência na fotoinativação da MRSA pelos PSs **36a,b** (Figura 36A) apresentando um perfil de fotoinativação similar, atingindo o limite de deteção do método, ao fim de apenas 20 min. de irradiação (correspondendo a um decréscimo de 6,04 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA $p < 0,05$). Os resultados obtidos com as formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** (Figura 36B), mostram que a formulação **PVP-36a** promoveu um decréscimo de 6,41 logs CFU/mL (ANOVA, $p < 0,05$) na viabilidade da MRSA após 30 min. de irradiação, enquanto que **PVP-36b** necessitou de apenas 10 min. para induzir uma diminuição de 6,42 logs CFU/mL (ANOVA, $p < 0,05$). À semelhança do realizado nos ensaios referentes ao estudo destes PSs na *E. coli*, avaliou-se também o comportamento de CC e CE, que, tal como o previsto, não promoveram alterações significativas na viabilidade da MRSA, indicando que nem as condições de irradiação nem a presença do PS afetam a viabilidade da bactéria.

Os resultados obtidos são comprovam a elevada eficiência destes PSs na fotoinativação da MRSA. Em concentrações mais reduzidas do que aquelas utilizadas no estudo da fotoinativação da *E. coli*, os PSs **36a,b** e as suas formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** promoveram um decréscimo na viabilidade da MRSA até ao limite de deteção do método, com um perfil de inativação mais rápido do que observado para a bactéria *E. coli*. No entanto, ao contrário do observado em relação à bactéria *E. coli*, os PSs **36a,b**

apresentam perfis de fotoinativação bastante idênticos, o que poderá ser justificado pela maior suscetibilidade desta estirpe bacteriana à PDI, necessitando de menos tempo para esse efeito. À semelhança do observado no estudo da *E. coli*, as formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** também se revelaram eficientes na fotoinativação da MRSA, demonstrando que a incorporação dos PSs **36a,b** nas micelas de PVP não afetou a capacidade destes compostos em atuarem como PSs.

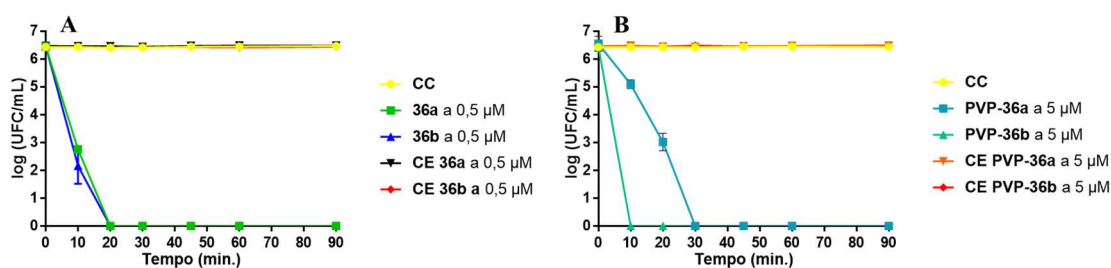


Figura 36- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta aos PSs **36a,b** a 0,5 µM (A) e a **PVP-36a** e **PVP-36b**, a 5 µM (B) após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm². CC-controlo claro; CE-controlos escuros.

3.5.2-Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos materiais suportados A-36a,b e Q-36a,b

Após o estudo da eficiência de fotoinativação da MRSA pelos PSs em solução, procedeu-se ao estudo da eficiência destes PSs imobilizados nos filmes de amido e quitosana. Estes estudos foram realizados na presença dos PSs **A-36a**, **A-36b**, **Q-36a** e **Q-36b**, sob as mesmas condições de irradiação dos ensaios anteriores. Uma vez que suspeitávamos que estes materiais apresentavam uma menor eficácia quando comparados com os PSs em solução (**36a,b** e **PVP-36a,b**), optou-se pela avaliação destes filmes a uma concentração porfirínica superior (25 µM).

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 37 e mostram que estes materiais, apesar de não serem capazes de fotoinativar a MRSA até ao limite de deteção do método, induziram um decréscimo significativo na viabilidade da bactéria, sendo a única exceção o filme **Q-36a**. Os materiais de amido (Figura 37A), apresentam um perfil de fotoinativação muito semelhante, induzindo um decréscimo contínuo na viabilidade da bactéria ao longo do tempo. Ao fim dos 90 min. de irradiação, os filmes **A-36a** e **A-36b** foram capazes de provocar uma diminuição na sobrevivência da MRSA

de 3,5 e 3,76 logs CFU/mL, respetivamente (ANOVA, $p < 0,05$). Ao analisar o impacto dos filmes **Q-36a** e **Q-36b** (Figura 37B), é possível verificar que, tal como esperado, o filme **Q-36a** não promoveu qualquer decréscimo significativo na viabilidade da MRSA dada a ineficiência que este material apresentou na geração de $^1\text{O}_2$. Contrariamente, o filme **Q-36b** promoveu, ao fim de 90 min. de irradiação, um decréscimo de 4,02 logs CFU/mL na viabilidade da MRSA (ANOVA, $p < 0,05$). A eficiência dos filmes **A-36a,b** e **Q-36b** na fotoinativação da MRSA e a ineficiência dos mesmos na fotoinativação da bactéria *E. coli*, é demonstrativa da maior suscetibilidade que as bactérias de Gram-positivo apresentam à PDI, quando comparadas com as bactérias de Gram-negativo. Os controlos [filmes de amido (**A**) e de quitosana (**Q**)] demonstraram um comportamento semelhante ao obtido pelo CC e CE, revelando assim que o material não tem capacidade de fotoinativar esta bactéria.

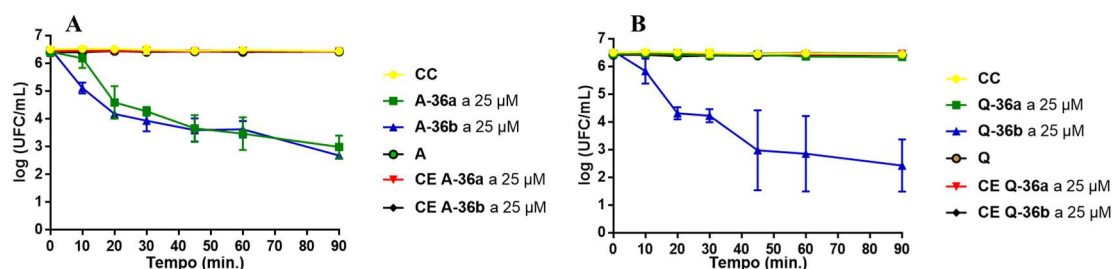


Figura 37- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta a **A-36a** e **A-36b** (A) e **Q-36a** e **Q-36b** (B), a 25 μM após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm^2 . CC-controlo claro; CE-controlos escuros; A-filme de amido sem a imobilização dos PSs **36a,b**; Q- filme de quitosana sem a imobilização do PSs **36a,b**.

3.5.3-Estudo da fotoinativação da bactéria MRSA na presença dos materiais $\text{CN}_{b,m,ex-36a,b}$

Na continuação do estudo dos PSs **36a,b** incorporados em materiais sólidos, avaliou-se a eficiência dos híbridos **porfirina- $\text{CN}_{b,m,ex}$** (25 μM) na fotoinativação da MRSA, sob as mesmas condições de irradiação descritas anteriormente. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 38 e demonstram que todos os materiais CN, na presença das porfirinas **36a,b**, são capazes de induzir variações significativas na sobrevivência da MRSA. Os materiais **CN_b-36a** e **CN_b-36-b** (Figura 38A) apresentam perfis de fotoinativação bastante distintos ao longo do período de irradiação. Embora ambos tenham inativado a MRSA até ao limite de deteção do método (correspondendo a

um decréscimo de 6,34 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$), no caso do material **CN_b-36b** observa-se um decréscimo abrupto na sobrevivência da MRSA, sendo capaz de provocar uma diminuição na viabilidade de 4,22 logs CFU/mL ao fim de apenas 10 min. de irradiação. No entanto, o material **CN_b-36a** apenas atinge um decréscimo semelhante da sobrevivência da MRSA (4,47 logs CFU/mL, ANOVA, $p < 0,05$) ao fim de 60 min. Este comportamento é também observado para os materiais **CN_m-36a** e **CN_m-36-b** (Figura 38B). O material **CN_m-36b** demonstrou uma elevada eficiência na inativação da MRSA, atingindo o limite de detecção do método logo após 30 min. de irradiação (correspondendo a um decréscimo de 6,34 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$). Já o **CN_m-36a** apenas consegue atingi-lo ao fim de 90 min. (correspondendo a um decréscimo de 6,34 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$), observando-se uma fotoinativação lenta e constante ao longo do período de irradiação. O perfil de fotoinativação voltou a ser semelhante no estudo dos materiais **CN_{ex}-36a** e **CN_{ex}-36-b** (Figura 38C). O material **CN_{ex}-36b** induziu um decréscimo abrupto na viabilidade desta bactéria, sendo capaz de provocar uma diminuição de 2,23 logs CFU/mL (ANOVA, $p < 0,05$) logo após os primeiros 10 min. de irradiação, alcançando o limite de detecção do método ao fim de 30 min. (correspondendo a um decréscimo de 6,36 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$). O material **CN_{ex}-36a**, à semelhança do observado anteriormente, apenas induziu uma redução de 2,86 logs CFU/mL na viabilidade da estirpe bacteriana (ANOVA, $p < 0,05$) ao fim de 60 min., atingindo o limite de detecção do método ao fim de 90 min. (correspondendo a um decréscimo de 6,36 logs CFU/mL na viabilidade, ANOVA, $p < 0,05$).

Podemos concluir que estes materiais (**CN_{b,m,ex}**) apresentam perfis de fotoinativação muito semelhantes, dependendo apenas do comportamento da porfirina para diferenciar a eficiência no tratamento. Todos os materiais **CN_{b,m,ex}** dopados com o PS **36b** revelaram-se muito idênticos entre si, e extremamente mais eficazes do que aqueles dopados com o PS **36a**. Durante os ensaios, foram também avaliadas as eficiências dos materiais sem a presença das porfirinas (**CN_{b,m,ex}**) que, mais uma vez, revelam valores similares aos registados pelos CC e CE.

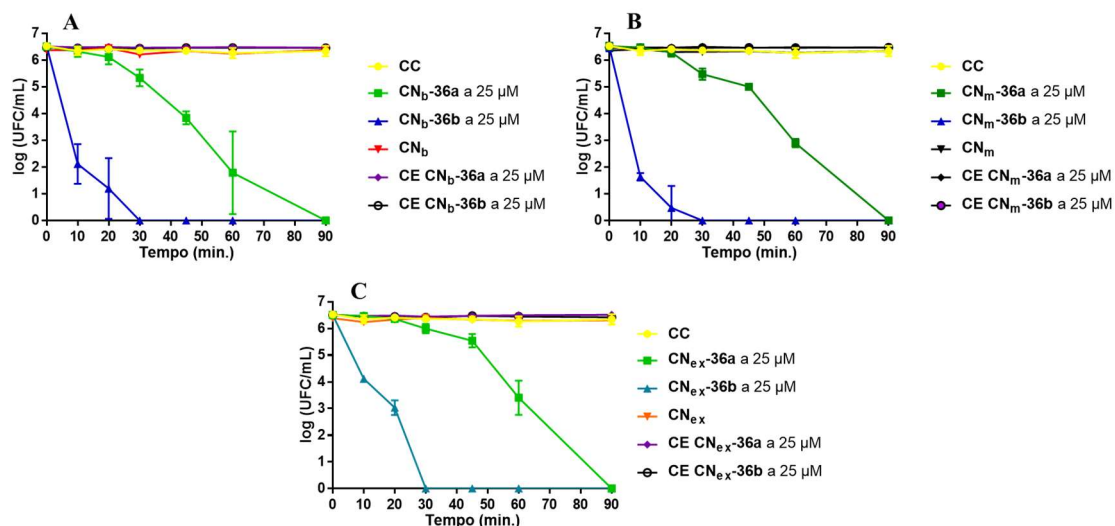


Figura 38- Monitorização da viabilidade da bactéria MRSA quando exposta a CN_b-36a e CN_b-36b (A), CN_m-36a e CN_m-36b (B) e CN_{ex}-36a e CN_{ex}-36b (C), a 25 µM após 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 80 mW/cm². CC-controlo claro; CE-controlos escuros; CN_{b,m,ex}- materiais CN sem a imobilização dos PSs 36a,b.

3.6-Procedimento experimental

3.6.1- Estudos de fotoestabilidade

3.6.1.1- Estudos de fotoestabilidade dos derivados porfirina-imidazol β-catiónicos 36a,b e das formulações em PVP

Prepararam-se soluções dos PSs 36a,b (0,5 µM) e das formulações PVP-36a e PVP-36b (5 µM), em PBS, que foram posteriormente guardadas no escuro, à temperatura ambiente. Estas soluções foram expostas a uma irradiação de luz branca (400–750 nm) fornecida por um sistema de diodo emissor de luz (LED) (ELMARK - VEGA20, 20 W, 1400 lm) com irradiância de 40 mW/cm², medida através de um medidor de energia Coherent FieldMaxII-Top combinado com um sensor de energia Coherent PowerSens PS19Q, durante 30 min. Os espectros de absorção das soluções, foram registados após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. de irradiação e foram obtidos através de um espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu, utilizando células de quartzo de percurso ótico de 1 cm.

3.6.1.2- Estudo de fotoestabilidade dos materiais sólidos

Uma vez que os PSs **A-36a,b**, **Q-36a,b** e **CN_{b,m,ex}-36a,b** se encontram no estado sólido, a sua fotoestabilidade foi estimada por espectroscopia de reflectância difusa num espectrofotómetro UV/Vis GBC Cintra 303. Todas as medições foram efetuadas utilizando os seguintes parâmetros de aquisição: esfera integradora (reflectância difusa); modo de absorvância; largura de banda - 5 nm; velocidade de varredura - 100 nm/min.; intervalo de varredura - 750 a 350 nm e intervalo de registo de dados - 0,5 nm. Começou-se por registar os espetros dos diferentes materiais antes da irradiação. Após esta leitura, prepararam-se suspensões dos vários híbridos, adicionando o volume de PBS necessário de forma a obter concentrações de 25 µM. Seguidamente, procedeu-se à irradiação destes, sob as mesmas condições anteriormente descritas para os PSs em solução, durante 30 min. e, de seguida, procedeu-se à filtração dos mesmos. Estes foram guardados numa estufa a 40 °C durante 24 horas e, após este período, registaram-se novamente os espetros.

3.6.2-Estudo da geração de ¹O₂

Prepararam-se soluções stock dos derivados **36a,b** a 1,17 e 1,04 µM respetivamente, das formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** a 3,63 e 3,19 µM respetivamente, e do difenilisobenzofurano (DPiBF) a 12,2 µM. Para avaliar a capacidade de gerar ¹O₂ por parte destes PSs, prepararam-se, em células de vidro, 3 mL de soluções contendo 50 µM de DF_iBF e 0,5 µM de cada um dos derivados porfirínicos **36a,b** e das suas formulações em PVP, em DMF. As cuvetes de UV-Vis foram irradiadas com luz vermelha (654 ± 20 nm) e com uma potência de 11,0 mW/cm². Durante a irradiação, as soluções foram mantidas em agitação magnética, à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 415 nm, em intervalos de 1 minuto durante 10 min. A percentagem de redução deste valor é proporcional à produção de ¹O₂ pelo PS, e foi calculada por comparação entre a absorvância inicial da solução e a absorvância registada ao fim de cada minuto de irradiação. Como controlos do método, foram usadas soluções em DMF

de DFiBF (50 μM) e de TPP (0,5 μM), preparados do mesmo modo que os derivados porfirina-imidazol mono catiónicos, e sujeitos às mesmas condições de irradiação.

Os materiais **A-36a**, **A-36b**, **Q-36a** e **Q-36b**, como se encontram no estado sólido, resultando numa solução heterogénea quando em contacto com o solvente, foram estudados, sob as mesmas condições de irradiação, durante um intervalo de tempo superior e em concentrações mais elevadas. Para este efeito, adicionou-se às diferentes células os respetivos filmes (20 μM) e DPiBF (50 μM), em DMF (3 mL). As células foram então irradiadas, sob agitação magnética à temperatura ambiente, e a leitura da absorção foi realizada em intervalos de 5 min, durante 30 min. De realçar que após o período de agitação e antes da leitura, os filmes eram retirados da solução de forma a não interferirem na leitura das absorvâncias do decaimento do DFiBF.

3.6.3-Fotossensibilizadores

Soluções stock dos PS **36a,b** (500 μM) foram preparadas em DMSO e guardadas no escuro. Antes de cada ensaio, as soluções eram sonicadas, à temperatura ambiente, durante 15 min. As formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** a 3,63 e 3,19 μM respetivamente, foram preparadas e guardadas no escuro, sendo adicionado um determinado volume à suspensão bacteriana, consoante a concentração a ser estudada. Os materiais **A-36a,b**, **Q-36a,b** e **CN_{b,m,ex}-36a,b** eram pesados antes de cada ensaio, conforme a concentração pretendida.

3.6.4- Fonte de luz

A eficiência de todos os PSs sintetizados, foi avaliada pela exposição da suspensão bacteriana, na presença do respetivo PS, a uma irradiação de luz branca (400–750 nm) fornecida por um sistema de diodo emissor de luz (LED) (ELMARK - VEGA20, 20 W, 1400 lm) com uma irradiância de 80 mW/cm^2 , determinada por um medidor de energia Coherent FieldMaxII-Top combinado com um sensor de energia Coherent PowerSens PS19Q.

3.6.5- Caracterização das espécies microbianas e das condições de cultura

Neste estudo, foram utilizadas uma bactéria de Gram-positivo, e uma bactéria de Gram-negativo. A bactéria de Gram-positivo selecionada foi a *Staphylococcus aureus* DSM 25693, uma estirpe resistente à meticilina (MRSA) que produz as enterotoxinas estafilocócicas S, E, A, C, H, G e I. Esta foi previamente isolada de uma amostra biológica do trato respiratório inferior de um indivíduo hospitalizado.⁸⁴ A estirpe bacteriana de Gram-negativo escolhida foi a *E. coli* ATCC®25922™ (American Type Culture Collection, VA, EUA). Ambas as culturas bacterianas foram mantidas em meio de cultura agarizado Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) a 4 °C e, antes de cada ensaio, uma colônia isolada era transferida, assepticamente, para uma solução contendo 30 mL de meio de cultura líquido Tryptic Soy Broth (TSB) e colocada a 37 °C, durante 18 horas sob agitação (120 rpm), de forma a atingir a fase estacionária de aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). De seguida, uma alíquota (300 µL) da solução anteriormente cultivada era transferida para 30 mL de TSB, e incubada a 37 °C, durante 18 horas, sob agitação (120 rpm).

3.6.6- Procedimento geral para os ensaios de PDI

As culturas bacterianas, cultivadas na noite anterior, eram diluídas num determinado volume de PBS de forma a permitir a obtenção de, aproximadamente, 0,08 D.O. a 600 nm, o que corresponde a uma densidade celular de 10⁷ CFU/mL. A suspensão bacteriana diluída era igualmente distribuída em microplacas de 6 poços (9 mL por poço), sendo adicionada à suspensão o respetivo PS a estudar. Foi avaliada a eficiência dos PSs **36a,b** (20 µM), as formulações **PVP 36a** e **PVP-36b** (40 µM), e ainda os materiais sólidos **A-36a** e **Q-36a** (20 µM) na fotoativação da bactéria *E. coli*, sendo que para a MRSA testaram-se os PSs **36a,b** (0,5 µM), as formulações **PVP-36a** e **PVP-36b** (5 µM) e ainda os materiais **A-36a,b**, **Q-36a,b** e **CN_{b,m,ex}-36a,b** (25 µM). Após a adição do PS, procedia-se à incubação da placa no escuro, durante 15 min., à temperatura ambiente e sob agitação, com o intuito de promover a ligação do PS às células bacterianas. Durante os ensaios, eram realizados controlos, nomeadamente controlos claros (CC), que continham apenas

a suspensão bacteriana exposta à irradiação para avaliar o efeito da luz na viabilidade da estirpe, controlos escuros (CE), onde era adicionado o PS, à mesma concentração de estudo, mas protegido da luz com uma folha de alumínio, de forma a avaliar a citotoxicidade do mesmo no escuro, e ainda controlos do material (amido, quitosana e CN_{b,m,ex}) sem a imobilização das porfirina **36a,b**, com o propósito de avaliar a toxicidade do próprio. Posteriormente à incubação no escuro, as amostras, os controlos do material e os CC eram irradiados por uma luz branca com irradiância de 80 mW/cm², sob agitação. Os tempos de irradiação foram ajustados à estirpe em estudo, sendo que para a bactéria *E. coli* o tempo total de irradiação foi 120 min., retirando-se alíquotas de 30 em 30 min., enquanto que para a bactéria MRSA apenas se irradiava durante 90 min., sendo que eram recolhidas alíquotas das soluções nos tempos 0, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 min. Após os períodos de irradiação, alíquotas de 100 µL de amostra e controlos eram diluídas em PBS (10⁻¹ até 10⁻⁵). De seguida, três gotas de 10 µL de cada diluição eram semeadas em TSA, através do método da gota. Após a secagem das gotas, as placas de Petri eram invertidas e incubadas a 37 °C, durante 18 a 24h, e as colónias eram contadas, na diluição mais adequada. Os resultados obtidos são a média de três estudos independentes com três réplicas.

3.6.7-Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao software GraphPad Prism 7. As distribuições normais foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade da variância foi averiguada com o teste de Brown Forsythe. ANOVA e testes de comparação múltipla de Dunnet foram aplicados para avaliar a significância das diferenças entre as condições testadas. Foram considerados significativos valores $p < 0,05$.

3.7-Conclusões e perspetivas futuras

A PDI tem demonstrado potencialidade para ser uma alternativa ao uso de antibióticos. Entre os PSs já estudados, os derivados tetrapirrólicos, como as porfirinas e seus análogos, estão entre os que mais se têm destacado nesta área. Um dos fatores que

contribui, significativamente, para a boa performance que esta família de compostos orgânicos apresenta em PDI, é a sua elevada capacidade para gerar espécies citotóxicas, nomeadamente oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), e a sua elevada estabilidade quando expostas à irradiação com luz. Estas propriedades dos macrociclos porfirínicos têm despertado o interesse de diversos grupos científicos com o objetivo de preparar novos PSs com propriedades estruturais, fotofísicas e fotoquímicas adequadas para a utilização em processos fotodinâmicos. Os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b** foram eficientemente preparados e obtidos em excelentes rendimentos, através da alquilação dos derivados neutros **35a,b**. Os compostos **36a,b** foram caracterizados por ^1H RMN e MS-ESI, e espectroscopia de absorção UV-Vis permitindo a confirmação das estruturas. A incorporação/imobilização destes PSs nos materiais sólidos selecionados (PVP, amido, quitosana e CN) foi realizada com sucesso, tendo sido obtidos materiais potencialmente eficientes em PDI. Seria pertinente no futuro, realizar uma caracterização mais pormenorizada dos filmes de amido e quitosana, nomeadamente ensaios de solubilidade, humidade e propriedades mecânicas.

A incorporação/imobilização de PSs em materiais, acarreta diversas vantagens, entre as quais se destacam a possibilidade de reutilização dos PSs, e a não utilização de solventes orgânicos. Este conjunto de características permite a extensão da PDI para diversos contextos, como por exemplo a fotoinativação de microrganismos em sangue, água ou superfícies.

Os derivados porfirina-imidazol β -catiônicos **36a,b**, as suas formulações em PVP, e os materiais amido, quitosana e nitreto carbono grafítico demonstraram, no geral, elevadas potencialidades em aturem como PSs em PDI, nomeadamente pela capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ e estabilidade quando expostos à irradiação. Futuramente, seria pertinente estudar a potencialidade dos diferentes materiais em diversos contextos. Devido ao facto das formulações em PVP evitarem a agregação dos PSs **36a,b** em meio aquoso, seria possível o estudo da inativação de microrganismos no plasma. Os filmes de amido e quitosana imobilizados com as porfirinas **36a,b**, apresentam características que poderiam permitir o tratamento de infeções bacterianas superficiais na pele. Os materiais **CN_{b,m,ex-36a,b}** poderiam apresentar eficácia em ambos os contextos tendo que se averiguar, primeiramente, a toxicidade que poderiam apresentar para as células humanas e para os componentes do sangue.

4-Bibliografia

1. Reyaert, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* **4**, 482–501 (2018).
2. Woodford, N. & Ellington, M. J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 5–18 (2007).
3. Ehrlich, G. D. & Arciola, C. R. From Koch's Postulates to Biofilm Theory. The Lesson of Bill Costerton. *Int. J. Artif. Organs* **35**, 695–699 (2012).
4. Taylor, P. W., Stapleton, P. D. & Luzio, J. P. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov. Today* **7**, 1086–1091 (2002).
5. Hamblin, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **33**, 67–73 (2016).
6. Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Sokolovski, S. G., Goltsov, A., Gekaluyk, A. S., Saranceva, E. I., Bragina, O. A., Tuchin, V. V. & Rafailov, E. U. Laser-induced generation of singlet oxygen and its role in the cerebrovascular physiology. *Prog. Quantum Electron.* **55**, 112–128 (2017).
7. Yang, B., Chen, Y. & Shi, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* **119**, 4881–4985 (2019).
8. Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A. & Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Crit. Rev. Microbiol.* **44**, 571–589 (2018).
9. Sadasivam, M., Avci, P., Gupta, G. K., Lakshmanan, S., Chandran, R., Huang, Y., Kumar, R. & Hamblin, M. R. Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. *Eur. J. Nanomedicine* **5**, (2013).
10. Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C. & Neves, M. G. P. M. S. Chapter 5. Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. in *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (eds. Hamblin, M. R. & Jori, G.) 83–160 (Royal Society of Chemistry, 2011).

11. Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **17**, 245–254 (2004).
12. Almeida, A., Faustino, M. A. & Tomé, J. P. Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. *Future Med. Chem.* **7**, 1221–1224 (2015).
13. Hamblin, M. R. & Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **3**, 436–450 (2004).
14. Schäfer, M., Schmitz, C. & Horneck, G. High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 249–253 (1998).
15. Nitzan, Y. & Ashkenazi, H. Photoinactivation of *Deinococcus radiodurans*: An Unusual Gram-Positive Microorganism. *Photochem. Photobiol.* **69**, 505–510 (1999).
16. Q. Mesquita, M., J. Dias, C., P. M. S. Neves, M., Almeida, A. & F. Faustino, M. Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules* **23**, 2424 (2018).
17. Pereira, M. A., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â. & Almeida, A. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **13**, 680 (2014).
18. Hurst, A. N., Scarbrough, B., Saleh, R., Hovey, J., Ari, F., Goyal, S., Chi, R. J., Troutman, J. M. & Vivero-Escoto, J. L. Influence of Cationic meso-Substituted Porphyrins on the Antimicrobial Photodynamic Efficacy and Cell Membrane Interaction in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
19. Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2329–2335 (2005).
20. Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G. & Roncucci, G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **38**, 468–481 (2006).

21. Kudinova, N. V. & Berezov, T. T. Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **4**, 95–103 (2010).
22. Kashef, N., Huang, Y.-Y. & Hamblin, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics* **6**, 853–879 (2017).
23. Martinez De Pinillos Bayona, A., 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 (2017).
24. Tian, J. & Zhang, W. Synthesis, self-assembly and applications of functional polymers based on porphyrins. *Prog. Polym. Sci.* **95**, 65–117 (2019).
25. Da Silva, E. S., Moura, N. M. M., Neves, G. P. M. S., Coutinho, A., Prieto, M., Silva, C. G. & Faria, L. F. Novel hybrids of graphitic carbon nitride sensitized with free-base meso-tetrakis(carboxyphenyl) porphyrins for efficient visible light photocatalytic hydrogen production. *Appl. Catal. B Environ.* **221**, 56–69 (2018).
26. Imran, M., Ramzan, M., Qureshi, A., Khan, M. & Tariq, M. Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. *Biosensors* **8**, 95 (2018).
27. Moura, N. M. M., Esteves, M., Vieira, C., Rocha, G. M. S. R. O., Faustino, M. A. F., Almeida, A., Cavaleiro, J. A. S., Lodeiro, C. & Neves, M. G. P. M. S. Novel β -functionalized mono-charged porphyrinic derivatives: Synthesis and photoinactivation of *Escherichia coli*. *Dyes Pigments* **160**, 361–371 (2019).
28. Moreira, X., Santos, P., Faustino, M. A. F., Raposo, M. M. M., Costa, S. P. G., Moura, N. M. M., Gomes, A. T. P. C., Almeida, A. & Neves, M. G. P. M. S. An insight into the synthesis of cationic porphyrin-imidazole derivatives and their photodynamic inactivation efficiency against *Escherichia coli*. *Dyes Pigments* **178**, 108330 (2020).
29. Alves, E., Costa, L., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â. & Almeida, A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **9**, 70 (2009).

30. Amos-Tautua, B., Songca, S. & Oluwafemi, O. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules* **24**, 2456 (2019).
31. Souza, D. P. V., Gomes, M. A. G. B., Goncalves, P. S., Santos, R. P., Maria, E. J. & Matos, C. R. R. Synthesis and Biological Activity of Porphyrins. *Mini-Rev. Org. Chem.* **10**, 97–102 (2013).
32. Bonkovsky, H. L., Guo, J., Hou, W., Li, T., Narang, T. & Thapar, M. Porphyrin and Heme Metabolism and the Porphyrrias. in *Comprehensive Physiology* (ed. Terjung, R.) c120006 (John Wiley & Sons, Inc., 2013).
33. Cook, L. P., Brewer, G. & Wong-Ng, W. Structural Aspects of Porphyrins for Functional Materials Applications. *Crystals* **7**, 223 (2017).
34. Moss, G. P. Nomenclature of tetrapyrroles (Recommendations 1986). *Pure Appl. Chem.* **59**, 779–832 (1987).
35. Vicente, M. G. & Smith, K. Porphyrins and Derivatives Synthetic Strategies and Reactivity Profiles. *Curr. Org. Chem.* **4**, 139–174 (2000).
36. Smith, R. A. The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds (Milgrom, Lionel R.). *J. Chem. Educ.* **75**, 420 (1998).
37. Smith, K. M. *Porphyrins and metalloporphyrins: a new edition based on the original volume by J. E. Falk.* (Elsevier Scientific Pub. Co, 1975).
38. Vicente, M. da G. H. & Smith, K. M. Syntheses and Functionalizations of Porphyrin Macrocycles. *Curr. Org. Synth.* **11**, 3–28 (2014).
39. Rothmund, P. & Menotti, A. R. Porphyrin Studies. IV. ¹ The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 267–270 (1941).
40. Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J. & Korsakoff, L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **32**, 476–476 (1967).
41. Barnett, G. H., Hudson, M. F. & Smith, K. M. Concerning meso-tetraphenylporphyrin purification. *J. Chem. Soc. Perkin I* 1401–1403 (1975).

42. Lindsey, J. S., Schreiman, I. C., Hsu, H. C., Kearney, P. C. & Marguerettaz, A. M. Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *J. Org. Chem.* **52**, 827–836 (1987).
43. Gonsalves, A. M. d'A R., Varejão, J. M. T. B. & Pereira, M. M. Some new aspects related to the synthesis of *meso*-substituted porphyrins. *J. Heterocycl. Chem.* **28**, 635–640 (1991).
44. Nascimento, B. F. O., Pineiro, M., Gonsalves, A. M. d'A R., Silva, M. R., Beja, A. M. & Paixão, J. A. Microwave-assisted synthesis of porphyrins and metalloporphyrins: a rapid and efficient synthetic method. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **11**, 77–84 (2007).
45. Henriques, C. A., Pinto, S. M. A., Aquino, G. L. B., Pineiro, M., Calvete, M. J. F. & Pereira, M. M. Ecofriendly Porphyrin Synthesis by using Water under Microwave Irradiation. *ChemSusChem* **7**, 2821–2824 (2014).
46. Taslı, H., Akbıyık, A., Topaloğlu, N., Alptüzün, V. & Parlar, S. Photodynamic antimicrobial activity of new porphyrin derivatives against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol.* **56**, 828–837 (2018).
47. Banfi, S., Caruso, E., Buccafurni, L., Battini, V., Zazzaro, S., Barbieri, P. & Orlandi, V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* **85**, 28–38 (2006).
48. Sousa, V., Gomes, A. T. P. C., Freitas, A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S. & Almeida, A. Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* in Blood Plasma and Whole Blood. *Antibiotics* **8**, 221 (2019).
49. Simões, C., Gomes, M. C., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Almeida, A. & Faustino, M. A. F. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic *meso*-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects. *Catal. Today* **266**, 197–204 (2016).
50. Caminos, D. A., Spesia, M. B. & Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel *meso*-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-

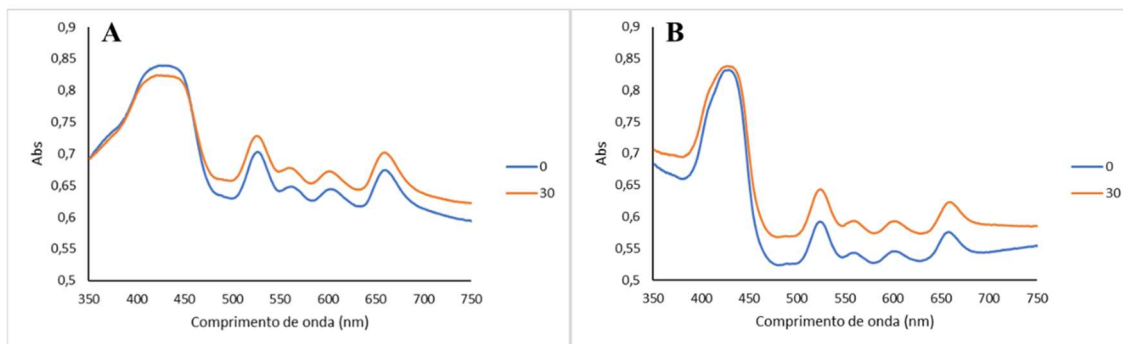
- trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem Photobiol Sci* **5**, 56–65 (2006).
51. Moura, N. M. M., Ramos, C. I. V., Linhares, I., Santos, S. M., Faustino, M. A. F., Almeida, A., Cavaleiro, J. A. S., Amado, F. M. L., Lodeiro, C. & Neves, M. G. P. M. S. Synthesis, characterization and biological evaluation of cationic porphyrin–terpyridine derivatives. *RSC Adv.* **6**, 110674–110685 (2016).
 52. Alves, E., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cunha, Â., Nadais, H. & Almeida, A. Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **22**, 34–57 (2015).
 53. Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermaawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hakim, Y. M. & Al-Sagheer, A. A. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **164**, 2726–2744 (2020).
 54. Yilmaz Atay, H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Funct. Chitosan* 457–489 (2020).
 55. Lim, S.-H. & Hudson, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr. Res.* **339**, 313–319 (2004).
 56. Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 51–63 (2010).
 57. Goy, R. C., Britto, D. de & Assis, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* **19**, 241–247 (2009).
 58. Castro, K. A. D. F., Moura, N. M. M., Figueira, F., Ferreira, R. I., Simões, M. M. Q., Cavaleiro, J. A. S., Faustino, M. A. F., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., Tomé, J. P. C., Nakagaki, S., Almeida, A. & Neves, M. G. P. M. S. New Materials Based on Cationic Porphyrins Conjugated to Chitosan or Titanium Dioxide: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2522 (2019).
 59. Castro, K. A. D. F., Moura, N. M. M., Fernandes, A., Faustino, M. A. F., Simões, M. M. Q., Cavaleiro, J. A. S., Nakagaki, S., Almeida, A., Cunha, Â., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S.

- R., Pinto, R. J. B. & Neves, M. G. P. M. S. Control of *Listeria innocua* biofilms by biocompatible photodynamic antifouling chitosan based materials. *Dyes Pigments* **137**, 265–276 (2017).
60. Buchovec, I., Lukseviciute, V., Marsalka, A., Reklaitis, I. & Luksiene, Z. Effective photosensitization-based inactivation of Gram (–) food pathogens and molds using the chlorophyllin–chitosan complex: towards photoactive edible coatings to preserve strawberries. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 506–516 (2016).
61. Thakur, R., Pristijono, P., Scarlett, C. J., Bowyer, M., Singh, S. P. & Vuong, Q. V. Starch-based films: Major factors affecting their properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **132**, 1079–1089 (2019).
62. Liu, Z. 19 - Edible films and coatings from starches. in *Innovations in Food Packaging* (ed. Han, J. H.) 318–337 (Academic Press, 2005).
63. Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Ostovarazar, P., Maharramov, A. & Ramazanov, M. A. Synthesis and characterization of modified starch hydrogels for photodynamic treatment of cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 544–549 (2012).
64. Jang, W.-D., Nakagishi, Y., Nishiyama, N., Kawauchi, S., Morimoto, Y., Kikuchi, M. & Kataoka, K. Polyion complex micelles for photodynamic therapy: Incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *J. Controlled Release* **113**, 73–79 (2006).
65. Tsai, T., Yang, Y.-T., Wang, T.-H., Chien, H.-F. & Chen, C.-T. Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg. Med.* **41**, 316–322 (2009).
66. Koczur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L. & Skrabalak, S. E. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Trans.* **44**, 17883–17905 (2015).
67. Kurakula, M. & Rao, G. S. N. K. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **60**, 102046 (2020).

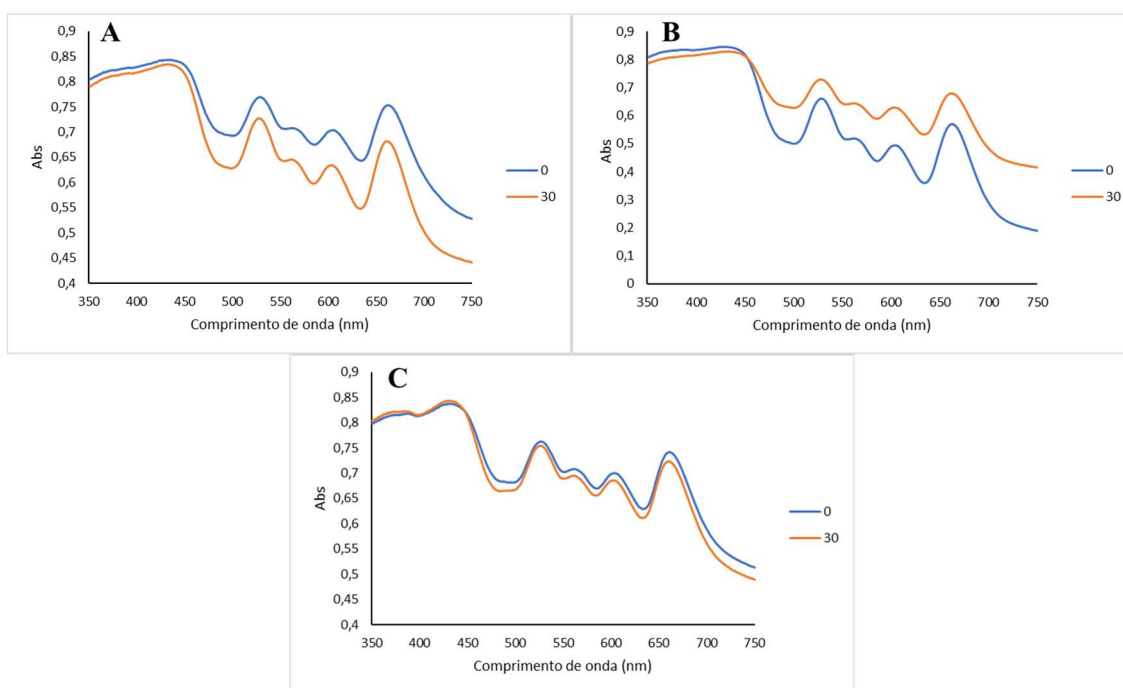
68. Gomes, A. T. P. C., Fernandes, R., Ribeiro, C. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., da Silva, F. C., Ferreira, V. F. & Cavaleiro, J. A. S. Synthesis, Characterization and Photodynamic Activity against Bladder Cancer Cells of Novel Triazole-Porphyrin Derivatives. *Molecules* **25**, 1607 (2020).
69. Pehlivan, E. G., Ek, Y., Topkaya, D., Tazebay, U. H. & Dumoulin, F. Effect of PVP formulation on the *in vitro* photodynamic efficiency of a photosensitizing phthalocyanine. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **23**, 1587–1591 (2019).
70. Nair, B. Final Report On the Safety Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP). *Int. J. Toxicol.* **17**, 95–130 (1998).
71. Wang, A., Wang, C., Fu, L., Wong-Ng, W. & Lan, Y. Recent Advances of Graphitic Carbon Nitride-Based Structures and Applications in Catalyst, Sensing, Imaging, and LEDs. *Nano-Micro Lett.* **9**, 47 (2017).
72. Wang, J. & Yang, M. Two-Dimensional Nanomaterials in Cancer Theranostics. in *Theranostic Bionanomaterials* 263–288 (Elsevier, 2019).
73. Zhang, J., Wang, A., Zhao, W., Li, C., Chen, X., Wang, Y., Zhu, W. & Zhong, Q. Influence of metal-porphyrins on the photocatalysis of graphitic carbon nitride. *Dyes Pigments* **153**, 241–247 (2018).
74. Lin, L.-S., Cong, Z.-X., Li, J., Ke, K.-M., Guo, S.-S., Yang, H.-H & Chen, G.-N. Graphitic-phase C₃N₄ nanosheets as efficient photosensitizers and pH-responsive drug nanocarriers for cancer imaging and therapy. *J. Mater. Chem. B* **2**, 1031 (2014).
75. Ju, E., Dong, K., Chen, Z., Liu, Z., Liu, C., Huang, Y., Wang, Z., Pu, F., Ren, J. & Q. X. Copper(II)-Graphitic Carbon Nitride Triggered Synergy: Improved ROS Generation and Reduced Glutathione Levels for Enhanced Photodynamic Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 11467–11471 (2016).
76. Bellina, F., Cauteruccio, S. & Rossi, R. Synthesis and biological activity of vicinal diaryl-substituted 1H-imidazoles. *Tetrahedron* **63**, 4571–4624 (2007).

77. Batista, R. M. F., Costa, S. P. G., Belsley, M., Lodeiro, C. & Raposo, M. M. M. Synthesis and characterization of novel (oligo)thienyl-imidazo-phenanthrolines as versatile π -conjugated systems for several optical applications. *Tetrahedron* **64**, 9230–9238 (2008).
78. Singla, A. K. & Chawla, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1047–1067 (2001).
79. Vieira, C., Santos, A., Mesquita, M. Q., Gomes, A. T. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, A. F. & Almeida, A. Advances in aPDT based on the combination of a porphyrinic formulation with potassium iodide: Effectiveness on bacteria and fungi planktonic/biofilm forms and viruses. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **23**, 534–545 (2019).
80. Reynoso, E., Quiroga, E. D., Agazzi, M. L., Ballatore, M. B., Bertolotti, S. G. & Durantini, E. N. Photodynamic inactivation of microorganisms sensitized by cationic BODIPY derivatives potentiated by potassium iodide. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 1524–1536 (2017).
81. Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G. & Cadet, J. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. *Chem. Rev.* **119**, 2043–2086 (2019).
82. Spiller, W., Kliesch, H., Wöhrle, D., Hackbarth, S., Roder, B. & Schnurpfeil, G. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **02**, 145–158 (1998).
83. Zenkevich, E., Sagun, E., Knyukshto, V., Shulga, A., Mironov, A., Efremova, O., Bonnett, R., Songca, S. P. & Kassem, M. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B* **33**, 171–180 (1996).
84. Braz, M., Salvador, D., Gomes, A. T. P. C., Mesquita, M. Q., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S. & Almeida, A. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on skin using a porphyrinic formulation. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **30**, 101754 (2020).

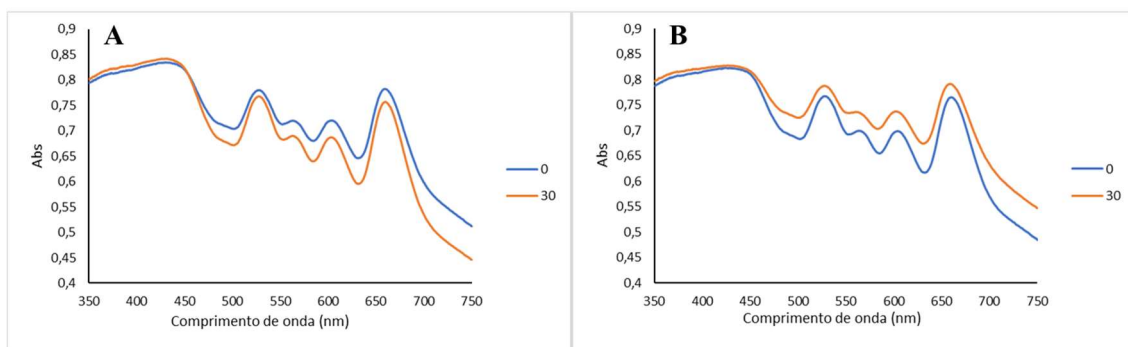
5-Anexos



Anexo 1- Espectros de absorção, em PBS, dos filmes **A-36a** (A) e **Q-36a** (B), a 25 μM , após 0 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm^2 , à temperatura ambiente.



Anexo 2- Espectros de absorção, em PBS, dos materiais **CN_b-36a** (A), **CN_m-36a** (B) e **CN_{ex}-36a** (D) a 25 μM , após 0 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm^2 , à temperatura ambiente.



Anexo 3- Espectros de absorção, em PBS, dos materiais CN_b-36b (A) e CN_m-36b (B) a 25 μ M, após 0 e 30 minutos de irradiação com luz branca, com irradiância de 40 mW/cm², à temperatura ambiente.