

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“COMPLEXO DE RU(II)-PERILENO DIIMIDA PARA
ATIVÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETO: AGENTE
TERANÓSTICO EM MELANOMA”**

Isabele Aparecida Soares de Campos*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientadora: Prof. Dra. Rose Maria Carlos

*** bolsista Fapesp (2018-03424-0; 2021/10586-9)**

São Carlos - SP
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de
Programa de Pós-Graduação

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Isabele Aparecida Soares de Campos, realizada em 13/09/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Prof. Dr. Leonardo de Boni (IFSC/USP)

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa (EMBRAPA)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosângela e Vinício.

*Educar é crescer. E crescer é viver. Educação é, assim, vida no
sentido mais autêntico da palavra.*

Anísio Teixeira

Era follia, follia certo; ma dolce.

Luigi Pirandello em *Mal giocondo*, 1889.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, amor e incentivo incondicionais e por permanecerem ao meu lado em todas as minhas decisões.

Ao meu companheiro Felipe pela compreensão e incentivo em todos os momentos.

À Prof. Dra. Rose Maria Carlos, minha orientadora desde o mestrado, por todo conhecimento e confiança concebidos durante toda a minha trajetória na pós-graduação e pelas aulas inspiradoras de fotoquímica.

Aos meus colegas do LaFIB pela amizade e pelas discussões científicas construtivas sempre acompanhadas de bolo e café. Em especial, gostaria de agradecer ao Dr. Rafael Marchi por todo apoio e amizade durante esses anos na pós-graduação.

À Prof. Dra. Paola Ceroni e ao Dr. Andrea Fermi por me receberem no seu grupo de pesquisa, por todo o conhecimento compartilhado e suporte durante meu doutorado sanduíche na Università di Bologna - Itália. Em especial, gostaria de agradecer à Sultan e à Dra. Elena pela amizade e aperitivos que tornaram esse período mais leve e divertido. *Teşekkürler, grazie mille!*

À Dra. Babara Ventura do National Research Council (CNR) of Italy pela colaboração e auxílio nos experimentos de absorção transiente.

Ao Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento do IFSC-USP pelas valiosas contribuições na minha jornada acadêmica e neste trabalho, auxiliando prontamente nos experimentos de EPR e nas discussões científicas.

Ao Dr. Vinicius T. Santana pela colaboração de longa data com os experimentos de EPR, pela amizade e pela paciência durante nossas longas maratonas de experimentos no seu laboratório no Central European Institute of Technology - República Tcheca.

Ao Prof. Dr. Wallance M. Pazin da UNESP pela colaboração de longa data, auxiliando prontamente no desenvolvimento e nas discussões dos experimentos fotofísicos e com os modelos de membranas fosfolipídicas.

À Prof. Dra. Márcia R. Cominetti do Departamento de Gerontologia-UFSCar pela colaboração, confiança e por disponibilizar seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos antitumorais. Em especial, gostaria de agradecer à Dra. Angelina e à Mari por todos os ensinamentos, suporte e paciência durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa e à Dra. Rafaela Silveira da EMBRAPA pela colaboração, confiança e pelo auxílio no desenvolvimento e na caracterização das nanofibras poliméricas.

À Prof. Dra. Heloisa S. S. de Araújo do Departamento de Ciências Fisiológicas-UFSCar e ao seu grupo de pesquisa pela colaboração, confiança e por disponibilizar seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos antibacterianos.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio e ao seu grupo de pesquisa pela colaboração e auxílio nos experimentos de RMN. Ao Dr. Carlos A. F. Moraes pela colaboração e auxílio nos experimentos de espectrometria de massas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da UFSCar que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas, processos nº 2018/03424-0 e 2021/10586-9.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES (código de financiamento 001) pelo apoio financeiro.

Por fim, gostaria de agradecer a UFSCar por ter sido minha segunda casa desde 2015. Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
A ₀₋₀	Absorbância das vibrações moleculares 0-0
A ₀₋₁	Absorbância das vibrações moleculares 0-1
CFU/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
CI	Conversão interna
CMT	Complexos de metais de transição
CS	Estados excitado de separação de cargas
CT	Estado excitado de transferência de carga
D	Unidade doadora de elétrons
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMA	9,10-Dimetilantraceno
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina <i>N</i> -óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês, <i>electron paramagnetic resonance</i>)
EROs	Espécies reativas do oxigênio
E ₊	Estado éxciton de maior energia
E ₋	Estado éxciton de menor energia
Faloidina	<i>Alexa 488 Fluor® Phalloidin</i>
FLIM	Microscopia por tempo de vida de fluorescência
fs	femtosegundo
FsT	Fotossensibilizador tripleto
GUVS	Vesículas unilamelares gigantes
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio

IC ₅₀	Concentração necessária para que ocorra 50% da inibição celular
ISC	Cruzamento intersistemas (do inglês, <i>intersystem crossing</i>)
MDA-MB-435	Linhagem celular tumoral de melanoma humano
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLCT	Estado excitado de transferência de carga do metal para o ligante (do inglês, <i>metal-to-ligand charge-transfer</i>)
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
ns	nanossegundos
NIR	Região do infravermelho-próximo
PAN	Poliacrilonitrila
PAN/RuPDI-Py	Nanofibras de PAN funcionalizadas no <i>core</i> com a díade RuPDI-Py
PAN/Ruphen	Nanofibras de PAN funcionalizadas no <i>core</i> com o complexo [Ru(phen) ₃] ²⁺
PBS	Tampão fosfato
PDI	Perileno diimida
PDI-Py	Ligante perileno diimida com os substituintes pirrolidina nas posições 1,7-bay e 1,10-fenantrolina nas posições imida, <i>N</i> -1,10-fenantrolina-1,7-dipirrolinidilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida
{PDI-Py}	Componente associada ao cromóforo PDI-Py
¹ *PDI-Py	Estado excitado singlete do PDI-Py
³ *PDI-Py	Estado excitado tripleto do PDI-Py
PDI-Py ^{•-}	Ânion radical do ligante PDI-Py

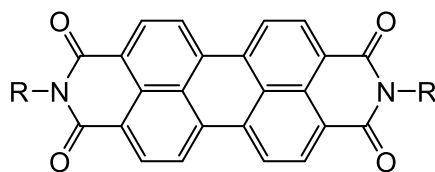
PI	Índice de fotocitotoxicidade (do inglês, <i>phototoxicity index</i>)
phen	1,10-fenatrolina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina
pPDIp	Ligante perileno diimida com o substituinte 1,10-fenantrolina nas posições imida
PVA	Álcool polivinílico
Py	Pirrolidina
R	Unidade receptora de elétrons
RP-ISC	Processo de cruzamento intersistema de pares de radicais (do inglês, <i>radical-pair intersystem crossing</i>)
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	Complexo referência Diclorotris(1,10-fenantrolina)rutênio(II)
$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$	Díade referência utilizando o ligante perileno diimida pPDIp sem o substituinte no centro do anel
RuPDI-Py	Díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PDI-Py})]^{2+}$
$\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$	Componente associada ao cromóforo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$
$\{\text{Ru}^{3+}-(\text{PDI-Py}^{\bullet-})\}$	Estado de separação de cargas da díade RuPDI-Py
SCE	Eletrodo saturado de calomelano
SeAr	Reação de substituição eletrofílica em compostos aromáticos
SOCT-ISC	Processo de cruzamento intersistema de transferência de carga spin-órbita (<i>spin-orbit charge transfer intersystem crossing</i>)
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>

S_0	Estado eletrônico fundamental
S_1	Estado eletrônico excitado singlete de menor energia
S_2	Estado eletrônico excitado singlete no segundo nível de energia
TA	Absorção transiente
TEA	Trietilamina
TE _n	Transferência de energia fotoinduzida
TEMPO	4-hidroxi-TEMPO
aTFD	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TFD	Terapia fotodinâmica
TMP-OH	2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol
T_n	Estado excitado tripleto
OH^\bullet	Radical hidroxila
O_2^\bullet	Radical superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$^1\text{*MLCT}$	Estado excitado singlete de transferência de carga do metal para o ligante
$^3\text{*MLCT}$	Estado excitado tripleto de transferência de carga do metal para o ligante
ΔA	Diferença entre o espectro de absorção da amostra excitada e o espectro de absorção da amostra no estado fundamental obtidas pela técnica de absorção transição
λ_{EX}	Comprimento de onda de excitação
λ_{EM}	Comprimento de onda de emissão
ε	Absortividade molar ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
Φ_{ph}	Rendimento quântico de fosforescência
Φ_{fl}	Rendimento quântico de fluorescência

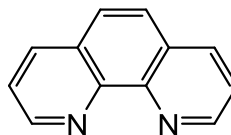
Φ_T	Rendimento quântico de formação do estado excitado tripleto
ϕ_Δ	Rendimento quântico de oxigênio singleto
τ_{EM}	Tempo de vida de emissão

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DE COMPOSTOS

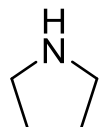
Perileno diimida



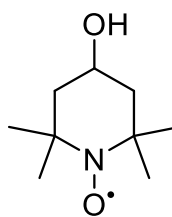
1,10-fenantrolina



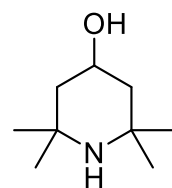
Pirrolidina



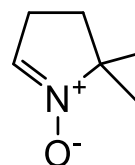
TEMPO



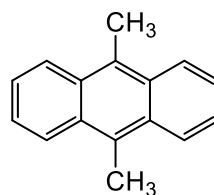
TMP-OH



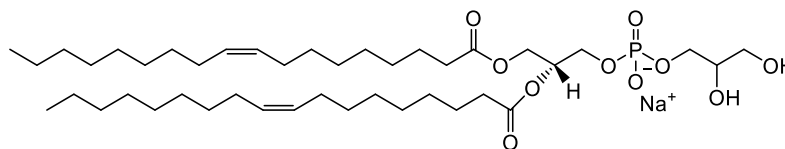
DMPO



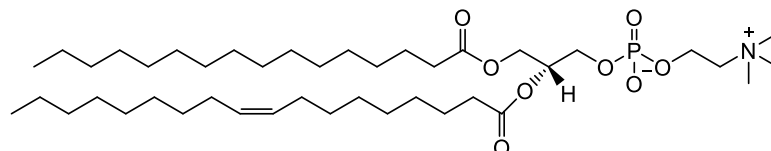
DMA



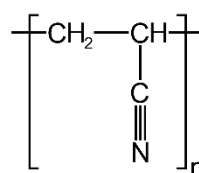
DOPG



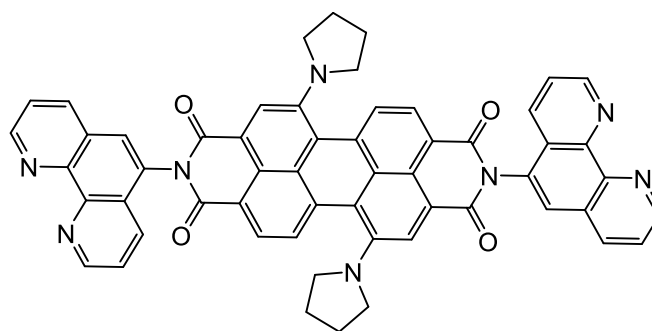
POPC



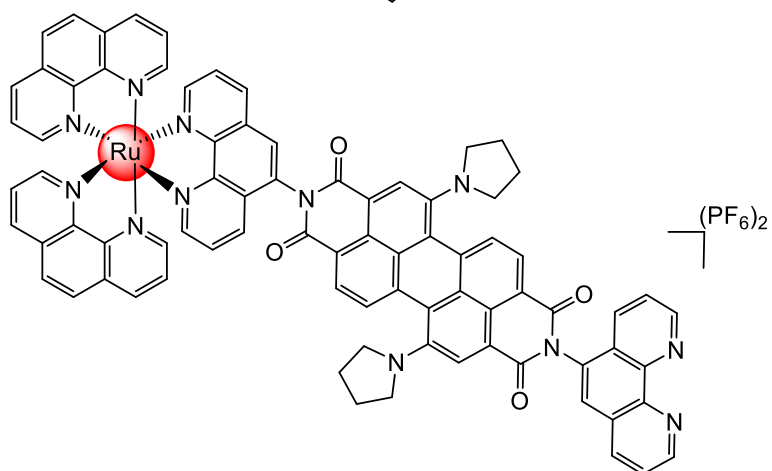
PAN



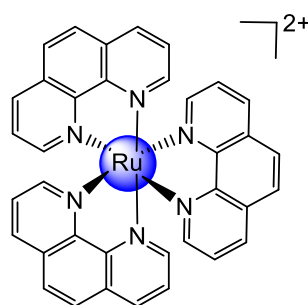
PDI-Py



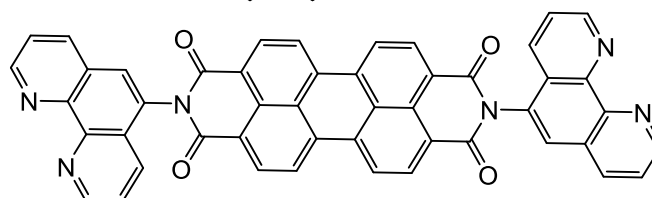
RuPDI-Py



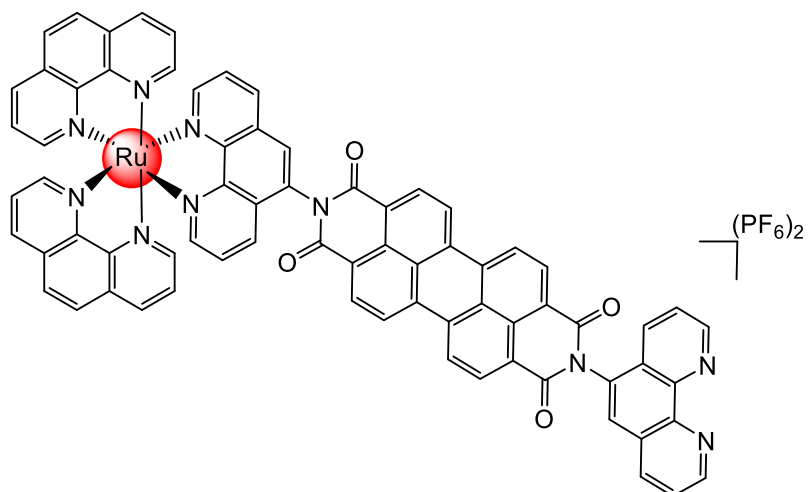
[Ru(phen)₃]²⁺



pPDIp



[Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺



LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Propriedades ópticas de derivados do PDI funcionalizados.	4
TABELA 4.1 – Deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C do ligante PDI-Py em DMSO- d_6	74
TABELA 4.2 – Deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO- d_6	78
TABELA 4.3 – Deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C da díade RuPDI-Py em DMSO- d_6	83
TABELA 4.4 – Propriedades eletroquímicas da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em benzonitrila e em acetonitrila (MeCN). Os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) foram determinados a partir dos experimentos de CV. ^a	89
TABELA 4.5 – Energias dos orbitais HOMO e LUMO estimados por voltametria cíclica.	92
TABELA 4.6 – Propriedades fotofísicas do ligante PDI-Py, da díade RuPDI-Py e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$).	94
TABELA 4.7 – Propriedades fotofísicas do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py em solventes orgânicos.	113
TABELA 4.8 – Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) em DMSO sob irradiação com luz de 450 nm.	133
TABELA 4.9 – Valores de IC_{50} e do índice de fotocitotoxicidade (PI) dos compostos RuPDI-Py, $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e azul de metileno em relação as células tumorais da linhagem MDA-MB-435, determinados no escuro e após ao tratamento com luz de 450 nm durante 5 e 10 minutos de irradiação.	147
TABELA 4.10 – Diâmetro médio das nanofibras de PAN e de PAN-RuPDI-Py calculados a partir das imagens de MEV ($n = 100$).	160

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 – Rota sintética para o ligante PDI-Py	66
ESQUEMA 4.2 – Estruturas de ressonância do perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico dianidrido (1) demonstrando a deslocalização de carga provocada pelo grupo anidrido que favorece a substituição regioespecífica nas posições bay 1 e 7.....	67
ESQUEMA 4.3 – Mecanismo de reação de bromação proposto para a síntese do 1,7-dibromoperileno dianidrido (2).....	67
ESQUEMA 4.4 – Mecanismo de reação de imidização proposto para a síntese do 1,7-dibromoperileno diimida (3).....	68
ESQUEMA 4.5 – Mecanismo da reação de substituição nucleofílica aromática proposto para a síntese do 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4).	70
ESQUEMA 4.6 – Rota sintética da díade RuPDI-Py.....	81
ESQUEMA 4.7 – Esquema simplificado do processo de absorção transiente e do perfil do espectro de absorção transiente.	100
ESQUEMA 4.8 – Diagrama qualitativo de níveis de energia da díade RuPDI-Py em DMSO. As linhas azuis indicam a excitação em 450 nm e as linhas verdes indicam a excitação em 720 nm. As anergias dos estados excitados foram estimadas de acordo com as os resultados obtidos dos experimentos eletroquímicos e espectroscópicos.	109
ESQUEMA 4.9 – Reação de fotobranqueamento do DMA com o $^1\text{O}_2$. ¹⁶²	130
ESQUEMA 4.10 – Reação entre a armadilha de spin 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) e o $^1\text{O}_2$ para gerar o aduto 4-hidroxi-2,2,6,6-tetramethylpiperidine <i>N</i> -oxil (TEMPO). ¹⁶⁵	134
ESQUEMA 4.11 – Estruturas moleculares dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-rac-glicerol) (DOPG).	138
ESQUEMA 4.12 – Aplicação tópica das nanofibras poliméricas fotoativas funcionalizadas com a díade RuPDI-Py para o tratamento de câncer de pele melanoma.	157

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 – Estrutura química do PDI com a numeração das posições funcionalizáveis no sistema aromático e espectros de absorção (cinza) e de fluorescência (vermelho) típicos do PDI em solventes orgânicos. 2
- FIGURA 1.2 – Diagrama esquemático dos orbitais moleculares de fronteira dos estados fundamental e excitados com os respectivos spins dos elétrons e diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo de formação do estado excitado tripleto os processos de desativação dos estados excitados. 6
- FIGURA 1.3 – Esquemas representando as mudanças nos potenciais de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE) de uma molécula após a fotoexcitação. 9
- FIGURA 1.4 – Diagrama esquemático dos orbitais moleculares de fronteira para o processo transferência de elétrons (TE) fotoinduzido em díades doadoras-receptoras de elétrons. 10
- FIGURA 1.5 – Diagrama de Jablonski mostrando os possíveis mecanismos de formação do estado tripleto em díades doadoras-receptoras. 11
- FIGURA 1.6 - Díades doadoras-receptoras de elétrons de derivados do PDI que participam dos processos de transferência de cargas fotoinduzidos do tipo RP-ISC⁵⁰ (1h) e SOCT-ISC⁵⁵ (1i). 13
- FIGURA 1.7 – Mecanismos de transferência de energia Förster e Dexter. 14
- FIGURA 1.8 – Transferência de energia tripleto-tripletto intramolecular em díades doadoras-receptoras. 16
- FIGURA 1.9. Estrutura molecular da díade DPyPBI[Ru(TPP)(CO)]₂ (1j) que participa de reações de transferência de energia e de elétrons fotoinduzidas. Figura adaptada da referência Prodi et al. (2005).⁶⁰ 18
- FIGURA 1.10 – (A) Estrutura molecular e (B) diagrama qualitativo dos processos fotofísicos do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ com os possíveis mecanismos de desativação do estado excitado em água, incluindo (1) fosforescência, (2) reação de transferência de energia tripleto-tripletto e formação de ¹O₂ e (3) reação de

transferência de elétrons. (C) Representação dos orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica MLCT.	21
FIGURA 1.11 – Díades híbrido orgânica-inorgânica de complexos de metais de transição com ligantes derivatizados do PDI que populam o estado excitado 3PDI de longa duração. ^{68,72}	23
FIGURA 1.12 – Estrutura molecular e diagrama qualitativo dos processos fotofísicos da díade $[Ru(phen)_2(pPDIp)]^{2+}$	24
FIGURA 1.13 – Diagrama qualitativo dos orbitais moleculares com os respectivos níveis de energia e configurações eletrônicas do oxigênio molecular no estado fundamental e nos estados excitados $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g$	26
FIGURA 1.14 – Derivados do PDI que geram 1O_2 , com os respectivos rendimentos quânticos de formação de 1O_2 (Φ_Δ) em diferentes solventes.	28
FIGURA 1.15 – Complexos de metais de transição com ligantes derivados do PDI que geram 1O_2 , com os respectivos Φ_Δ em diferentes solventes.	29
FIGURA 1.16 – Diagrama qualitativo do mecanismo fotofísico com representando as reações de um fotossensibilizador que ocorrem na terapia fotodinâmica.....	31
FIGURA 1.17 – Estruturas química dos fotossensibilizadores orgânicos aprovados clinicamente para o tratamento de câncer.....	32
FIGURA 1.18 – Fotossensibilizadores de complexos de metais de transição que foram aprovados clinicamente ou estão em fase de ensaios clínicos para o tratamento de câncer através da TFD.....	33
FIGURA 1.19 - Diagrama de energia qualitativo dos processos fotofísicos do fotossensibilizador TLD-1433. Figura adaptada da referência Monro et al. (2019). ¹⁰²	34
FIGURA 1.20 - Estruturas moleculares do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py.	38

FIGURA 3.1 – Sistema de LED de 450 nm utilizado nos ensaios de terapia fotodinâmica antitumoral e para o cálculo de rendimento quântico de oxigênio singleto	56
FIGURA 4.1 – Espectro de ^1H -RMN- (CDCl_3 , 400 MHz) do precursor 1,7-dibromoperileno diimida (3) com as atribuições dos sinais de prótons.....	69
FIGURA 4.2 – Espectro de ^1H -RMN- (CDCl_3 , 400 MHz) do precursor 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4) com as atribuições dos sinais de prótons.....	71
FIGURA 4.3 – Espectro de ^1H -RMN- (CDCl_3 , 400 MHz) do precursor 1,7-dipirrolidinil perileno dianidrido (5) com as atribuições dos sinais de prótons..	72
FIGURA 4.4 – Ligante PDI-Py (A) sólido e em (B) solução de DMSO.....	73
FIGURA 4.5 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do ligante PDI-Py em metanol.	73
FIGURA 4.6 – Espectro de ^1H -RMN do ligante PDI-Py em DMSO-d_6 (600 MHz) com as atribuições dos sinais dos prótons.....	75
FIGURA 4.7 – Região aromática do espectro de RMN ^1H - ^1H COSY do ligante PDI-Py (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^1H	76
FIGURA 4.8 – Região aromática do espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC do ligante PDI-Py (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C	77
FIGURA 4.9 – Região aromática do espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC do ligante PDI-Py (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C	77
FIGURA 4.10 – Espectro de ^1H -RMN (região aromática) do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO-d_6 (600 MHz) com as atribuições dos sinais dos prótons.	79
FIGURA 4.11 – Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (região aromática) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^1H	79

FIGURA 4.12 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (região aromática) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C	80
FIGURA 4.13 – Díade RuPDI-Py (A) sólido e em (B) solução de DMSO.....	81
FIGURA 4.14 – Espectro de massas (MALDI-TOF) da díade RuPDI-Py (em acetonitrila) e a distribuição isotópica do rutênio referente ao pico do íon molecular m/z 673,1649.	82
FIGURA 4.15 – Espectro de ^1H -RMN da díade RuPDI-Py em DMSO- d_6 (600 MHz) com as respectivas atribuições dos sinais dos prótons.	84
FIGURA 4.16 – Comparação entre espectros de ^1H -RMN (região aromática) da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO- d_6 (600 MHz).	86
FIGURA 4.17 – Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^1H	87
FIGURA 4.18 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C	88
FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C	88
FIGURA 4.20 – Voltamogramas cíclicos (esquerda) e voltamogramas de pulso diferencial (direita) da díade RuPDI-Py e do ligante PDI-Py em (A) benzonitrila e em (B) acetonitrila. Velocidade de varredura: 2 V/s, o Ferroceno foi utilizado como padrão interno para correção do eletrodo de referência.	90
FIGURA 4.21 – Espectros de absorção UV-Vis do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py em solução de MeCN/TBAPF $_6$ obtidos durante os experimentos de espectroeletrólise.	93

FIGURA 4.22 – Espectros de absorção (esquerda) e de emissão (direita) do (A) ligante PDI-Py, do (B) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e da (C) díade RuPDI-Py em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$).	95
FIGURA 4.23 – Comparação entre os espectros de emissão (linha sólida preta), excitação (colorido) e absorção (linha tracejada) do (A) ligante PDI-Py, da (B) díade RuPDI-Py e do (C) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$).	97
FIGURA 4.24 – Perfis dos decaimentos dos tempos de vida de emissão dos compostos (A) PDI-Py e (B) RuPDI-Py com $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 640/780 \text{ nm}$ e do (C) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ com $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 405/600 \text{ nm}$, em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$).	97
FIGURA 4.25 – Comparação das intensidades de emissão do ligante PDI-Py (verde) e da díade RuPDI-Py (vermelho) em DMSO utilizando soluções com absorbância igual a 0,1 nos comprimentos de onda de excitação (A) $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}} = 720 \text{ nm}$ (soluções aeradas).	99
FIGURA 4.26 – Espectros de absorção transiente de fs do ligante PDI-Py em DMSO com λ_{EX} de (A) 720 nm e (B) 450 nm e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.	102
FIGURA 4.27 – Espectros de absorção transiente do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO obtidos na escala de tempo de (A) femtossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e de (B) nanosegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 355 \text{ nm}$, com as cinéticas de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.	104
FIGURA 4.28 – Espectro de absorção transiente de fs da díade RuPDI-Py em DMSO com λ_{EX} de 720 nm e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.	105
FIGURA 4.29 – Espectro de absorção transiente de fs da díade RuPDI-Py em DMSO com λ_{EX} de 450 nm com os tempos de atraso indicados nos perfis de absorção e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.	106

FIGURA 4.30 – (A) Espectro de absorção transiente de ns da díade RuPDI-Py em DMSO (solução desaerada) com λ_{EX} de 355 nm. (B) Espectros obtidos a partir da análise global do decaimento e a (C) cinética de decaimento associada à análise global com os ajustes associados aos dados..... 108

FIGURA 4.31 – Comparação entre os espectros de (A) absorção e de (B e C) emissão das soluções do ligante livre PDI-Py (verde), do complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$ (azul), da díade RuPDI-Py (vermelho) e da mistura PDI-Py/ $[Ru(phen)_3]^{2+}$ (rosa) ($c = 10 \mu M$, solução aerada)..... 111

FIGURA 4.32 – Estabilidade química do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py avaliada através dos espectros de absorção em solução de DMSO ($c = 20 \mu M$, solução aerada). 112

FIGURA 4.33 – Estabilidade fotoquímica do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py avaliada através dos espectros de absorção em solução de DMSO ($c = 10 \mu M$, solução aerada), sob irradiação com luz de 450 nm e de 720 nm (tempo total de irradiação = 1 h). 112

FIGURA 4.34 – Espectros de absorção e de emissão e perfis do decaimento dos tempos de vida de emissão do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py em solventes orgânicos com diferentes polaridades em temperatura ambiente (soluções aeradas) e em matriz rígida de butironitrila a 77 K ($c = 10 \mu M$). Os espectros de emissão foram medidos usando $\lambda_{EX} = 650$ nm e 450 nm para o ligante e para díade, respectivamente. Os tempos de vida de emissão foram medidos utilizando $\lambda_{EX} = 640$ nm e $\lambda_{EM} = 780$ nm. 114

FIGURA 4.35 – Propriedades espectroscópicas da díade RuPDI-Py em água (solução desaerada, $c = 20 \mu M$). (A) espectro de absorção, (B) espectro de emissão em diferentes comprimentos de onda de excitação, (C) espectros de emissão (verde) e de excitação (linha sólida em preto) da díade em comparação com o espectro de absorção do $[Ru(phen)_3]^{2+}$ em água (linha tracejada), (D) espectros de emissão (azul) e de excitação (linha sólida em preto) da díade em comparação com o espectro de absorção do ligante PDI-Py em DMSO (linha tracejada)... 116

FIGURA 4.36 – Espectros de (A) absorção e de (B) emissão (azul, $\lambda_{EX} = 450$ nm) e excitação (preto, $\lambda_{EM} = 600$ nm) do complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$ em água ($c = 10$ μ M, solução desaerada).....	117
FIGURA 4.37 – Diagrama de energia qualitativo dos níveis de energia dos agregados do tipo H e J. Figura adaptada da referência Bayda et al. (2017). ¹⁵²	118
FIGURA 4.38 – Perfis dos decaimentos dos tempos de vida de emissão da díade RuPDI-Py em água ($c = 20$ μ M, solução desaerada) com (A) $\lambda_{EX} = 640$ nm e $\lambda_{EM} = 745$ nm, (B) $\lambda_{EX} = 640$ nm e $\lambda_{EM} = 780$ nm e (C) $\lambda_{EX} = 405$ nm e $\lambda_{EM} = 600$ nm.	120
FIGURA 4.39 – Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm) da díade RuPDI-Py na mistura de solventes DMSO/H ₂ O (v/v) ($c = 25$ μ M, solução aerada).	121
FIGURA 4.40 – Influência da temperatura (10-90 °C) nas propriedades fotofísicas da díade RuPDI-Py em água ($c = 10$ μ M, solução desaerada). Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm).	122
FIGURA 4.41 – Influência da temperatura (10-90 °C) nos tempos de vida de emissão da díade RuPDI-Py em água ($c = 10$ μ M, solução desaerada). Perfis dos decaimentos dos estados (A) ^{3*} MLCT ($\lambda_{EX} = 405$ nm e $\lambda_{EM} = 610$ nm) e (B) ^{1*} PDI-Py ($\lambda_{EX} = 640$ nm e $\lambda_{EM} = 780$ nm). (C) Valores dos tempos de vida de emissão dos estados ^{3*} MLCT (● azul) e ^{1*} PDI-Py (● vermelho) em função da temperatura.	123
FIGURA 4.42 – Influência da temperatura (10-90 °C) nas propriedades fotofísicas da referência $[Ru(phen)_3]^{2+}$ em água ($c = 10$ μ M, solução desaerada). Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm). (C). Perfis dos decaimentos e (D) valores dos tempos de vida de emissão do estado ^{3*} MLCT ($\lambda_{EX} = 405$ nm e $\lambda_{EM} = 610$ nm).	124

FIGURA 4.43 – Influência da concentração (0,3-20 μM) nos espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$), da díade RuPDI-Py em água (solução aerada).	125
FIGURA 4.44 – Desvio da lei de Lambert-Beer: influência da mudança de temperatura e de concentração na banda de absorção em 712 nm da díade RuPDI-Py em água.	125
FIGURA 4.45 – Espectro de absorção transiente de ns da díade RuPDI-Py em água (solução desaerada) com λ_{EX} de 355 nm e a cinética de decaimento dos sinais de TA com os ajustes associado aos dados.....	126
FIGURA 4.46 – (A) Estabilidade química da díade RuPDI-Py em água avaliada após 24 h em solução. (B) Estabilidade fotoquímica da díade RuPDI-Py em água sob irradiação com luz de 450 nm e de 720 nm (tempo total de irradiação = 2 h), $c = 20 \mu\text{M}$, solução aerada).	128
FIGURA 4.47 – Espectros de absorção do DMA em DMSO medidos durante a irradiação com luz de 450 nm na presença dos compostos (A) riboflavina, (B) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, (C) RuPDI-Py e (D) PDI-Py. (E) Solução contendo somente o DMA irradiado utilizada como controle.	130
FIGURA 4.48 – Espectros de absorção do DMA em DMSO medidos durante a irradiação com luz de 720 nm na presença dos compostos (A) RuPDI-Py e (B) PDI-Py. (C) Solução contendo somente o DMA irradiado utilizada como controle.	131
FIGURA 4.49 – Consumo da banda de absorção do DMA demonstrado através da correlação A_0/A vs tempo de irradiação, onde A_0 corresponde a absorbância do DMA em 380 nm no tempo = 0 e A corresponde a absorbância em diferentes tempos de irradiação. Irradiação com luz de (A) 450 nm e de (B) 720 nm. As inclinações das retas foram calculadas a partir do ajuste linear.....	132
FIGURA 4.50 – Espectros de EPR da mistura TMP-OH (48 mM) e RuPDI-Py (150 μM) (vermelho) em água irradiada com luz de (A) 450 nm e de (B) 650 nm	

durante 30 minutos. Uma solução contendo somente o TMP-OH irradiado foi utilizada como controle (preto).	134
FIGURA 4.51 – Quantificação de $^1\text{O}_2$ por espectroscopia de EPR com armadilha de spin TMP-OH. (A) Curva de calibração obtida a partir dos espectros de EPR simulados do padrão TEMPO em tampão PBS (pH 7,4). (B) Espectro de EPR da mistura RuPDI-Py (150 μM) e TMP-OH (48 mM) irradiada com luz de 450 nm medidos em diferentes intervalos de tempo. (C) Concentração de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade RuPDI-Py sob irradiação com luz de 450 nm.	136
FIGURA 4.52 – Espectros de EPR da mistura DMPO (0,03 mol.L ⁻¹) e RuPDI-Py (100 μM) em água no escuro e irradiada com luz de 450 nm durante 15 minutos.	137
FIGURA 4.53 – Imagens de microscopia óptica de contraste de fase das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) durante 20 minutos no escuro.....	139
FIGURA 4.54 – Imagens de microscopia de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) durante 20 minutos no escuro.....	139
FIGURA 4.55 – Imagens de microscopia de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) monitoradas durante a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 17 min). As setas indicam a formação dos poros.....	140
FIGURA 4.56 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) controle (sem a díade) e incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 15 min).....	141
FIGURA 4.57 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (2,4 e 10 μM), monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 20 min).....	142

FIGURA 4.58 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC controle e incubadas com a díade RuPDI-Py (100 μ M) monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 15 min).	143
FIGURA 4.59 – Atividade antibacteriana da díade RuPDI-Py em relação a <i>E. Coli</i> (DH5 α) avaliada após 24 h ao tratamento no escuro e sob irradiação com luz de 450 nm (5 min). Os valores são a média \pm SD de n = 3 experimentos independentes.	145
FIGURA 4.60 – Imagens das colônias de <i>E. Coli</i> incubadas com a díade RuPDI-Py (0,5 - 50 μ M) obtidas 24 h após ao tratamento no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min).	145
FIGURA 4.61 – Viabilidade celular das células tumorais da linhagem MDA-MB-435 após ao tratamento com os compostos (A) RuPDI-Py, (B) [Ru(phen) ₃] ²⁺ e (C) azul de metileno, determinada no escuro e após ao tratamento com luz de 450 nm durante 5 e 10 minutos de irradiação.	148
FIGURA 4.62 – (A) Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μ M) durante 4 h no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 350/450 nm) e Alexa 488 Fluor® Faloidina (Fluorescência = $\lambda_{EX/EM}$ 470/560 nm; FLIM = $\lambda_{EX/EM}$ 470/490 nm). Células sem a díade RuPDI-Py e mantidas sob as mesmas condições foram utilizadas como controle. (B) Tempos de vida de emissão das imagens obtidas por microscopia FLIM.	152
FIGURA 4.63 - Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μ M) durante 4 h e tratadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{EX/EM}$ 350/450 nm) e Alexa 488 Fluor® Faloidina (fluorescência = $\lambda_{EX/EM}$ 470/560 nm) e a luminescência da díade RuPDI-Py (FLIM = $\lambda_{EX/EM}$ 640/690 nm).	153

FIGURA 4.64 – Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 µM) durante 4 h e tratadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando o marcador DAPI ($\lambda_{EX/EM}$ 350/450 nm) e a luminescência da díade RuPDI-Py (fluorescência = $\lambda_{EX/EM}$ 470/560 nm; FLIM = $\lambda_{EX/EM}$ 640/690 nm).	153
FIGURA 4.65 – (A) Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 µM) durante 4 h no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 350/450 nm) e SOSG (Fluorescência = $\lambda_{EX/EM}$ 470/560 nm; FLIM = $\lambda_{EX/EM}$ 470/490). Células sem a díade RuPDI-Py e mantidas sob as mesmas condições foram utilizadas como controle. (B) Tempos de vida de emissão das imagens obtidas por microscopia FLIM.	155
FIGURA 4.66 – Representação esquemática do processo de eletrofiação das nanofibras poliméricas. Figura adaptada da referência Mercante et al. (2017). ²⁰⁴	158
FIGURA 4.67 – Imagens das nanofibras poliméricas PAN e PAN/RuPDI-Py obtidas por eletrofiação.	159
FIGURA 4.68 – Imagens de MEV e diâmetro médio das nanofibras de PAN e de PAN/RuPDI-Py (10-250 µM).	161
FIGURA 4.69 – Comparação entre os espectros de (A) emissão e de (B) excitação com λ_{EX} = 450 nm e λ_{EM} = 600 nm, respectivamente, da nanofibras de PAN/Ruphen (100 mM) e do complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$ no estado sólido. (C) Imagens da nanofibra de PAN/Ruphen no escuro e da luminescência observada com a irradiação com luz azul de 450 nm.	162
FIGURA 4.70 – Cinética de liberação das nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com a díade RuPDI-Py nas concentrações de (A) 10 µM, (B) 50 µM e (C) 100 µM, incubadas no escuro em solução tampão PBS (pH 7,4) e	

monitorada por espectroscopia de UV-Vis e de luminescência ($\lambda_{EX} = 450 \text{ nm}$) (tempo total de incubação = 4 h).....	164
FIGURA 4.71 – Cinética de liberação das nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com a díade RuPDI-Py nas concentrações de (A) 10 μM , (B) 50 μM e (C) 100 μM , incubadas em solução tampão PBS (pH 7,4) e irradiadas com luz azul de 450 nm durante 30 min, monitorada por espectroscopia de luminescência ($\lambda_{EX} = 450 \text{ nm}$).....	165
FIGURA 4.72 – (A) Espectros de EPR da mistura TMP-OH (48 mM) e nanofibras de PAN, PAN/RuPDI-Py (50 μM) e PAN/RuPDI-Py (100 μM) irradiadas com luz de 450 nm durante 30 min. Uma solução contendo somente o TMP-OH irradiado foi utilizada como controle.(B) Comparação entre as áreas dos sinais de EPR calculadas a partir do sinal em 3375 Gauss.	166
FIGURA 4.73 – Espectros de absorção do DMA na mistura de PBS/EtOH 1/1 (v/v), (A) controle (somente o DMA irradiado) e na presença das nanofibras de (B) PAN e de (C) PAN/RuPDI-Py (250 μM), irradiada com luz azul de 450 nm durante 30 min. (D) Consumo da banda de absorção do DMA demonstrado através da correlação A_0/A vs tempo de irradiação, onde A_0 corresponde a absorbância do DMA em 421 nm no tempo = 0 e A corresponde a absorbância em diferentes tempos de irradiação.....	167

RESUMO

COMPLEXO DE RU(II)-PERILENO DIIMIDA PARA ATIVAÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETO: AGENTE TERANÓSTICO EM MELANOMA. Neste trabalho foram desenvolvidos o novo ligante de perileno diimida funcionalizado nas posições 1,7-bay com duas moléculas de pirrolidina e nas posições imida com 5,10-amino-fenantrolina (PDI-Py) e a nova díade de doadora-receptora de elétrons denominada $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PDI-Py})]^{2+}$ (RuPDI-Py), onde phen = 1,10-fenantrolina, para potenciais aplicações em fotomedicina combinando absorção e emissão na região do infravermelho-próximo com a capacidade de gerar oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). As propriedades eletroquímicas, fotofísicas e fotoquímicas do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py foram investigadas por meio de técnicas espectroscópicas de estado estacionário e resolvidas no tempo em solventes orgânicos e em água. A adição do substituinte pirrolidina induziu ao deslocamento da absorção (720 nm) e da fluorescência (767 nm, $\tau_{\text{EM}} = 1,75$ ns) para a região do infravermelho-próximo no ligante PDI-Py. Em DMSO, a díade RuPDI-Py preservou a absorção e fluorescência cromóforo PDI-Py na região no infravermelho-próximo, enquanto na região entre 350-550 nm houve a sobreposição das bandas de absorção referentes às transições eletrônicas $^1\text{MLCT}$ e $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_2$ dos cromóforos $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e PDI-Py, respectivamente, e a fosforescência $^3\text{MLCT}$ foi completamente suprimida. Os estudos de absorção transiente demonstraram que a excitação da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ na díade resultou em uma rápida transferência de elétrons (60 ps) entre os cromóforos constituintes, gerando o estado excitado intermediário de separação de cargas (CS) $\{\text{Ru}^{3+}-(\text{PDI-Py}^{\bullet-})\}$ (4 μs) que levou à população do estado excitado tripleto $^3\text{PDI-Py}$ de longa-duração (36 μs) capaz de sensibilizar a formação do $^1\text{O}_2$ ($\phi_{\Delta} = 0,40$). Em água, a díade RuPDI-Py se auto-montou em agregados moleculares do tipo J, exibindo a fluorescência do $^1\text{PDI-Py}$ em 840 nm ($\tau_{\text{EM}} = 1,55$ ns) e, adicionalmente, a fosforescência da $^3\text{MLCT}$ em 620 nm ($\tau_{\text{EM}} = 1,3$ μs). Além

disso, a excitação da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ levou à formação do $^3\text{PDI-Py}$ (15 μs) e à geração de $^1\text{O}_2$. A dependência das propriedades fotofísicas da díade RuPDI-Py em função do comprimento de onda da luz de excitação permitiu a modulação das suas aplicações biológicas. Utilizando luz visível de 450 nm, a díade gerou a espécie citotóxica $^1\text{O}_2$ que induziu à 100% de inibição do crescimento de colônias de *E. Coli* em concentrações da díade acima de 2,5 μM após ao tratamento com a luz. Estudos *in vitro* com células de melanoma humano da linhagem celular MDA-MB-435 demonstraram a fotocitotoxicidade da díade com o IC_{50} de 2,30 μM ($\text{PI} > 108$), indicando a potencial aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana e antitumoral. Em contrapartida, utilizando luz acima de 650 nm, somente a fluorescência da díade na região do infravermelho-próximo foi observada, o que permitiu monitorar sua localização celular preferencialmente no citoplasma das células MDA-MB-435 como também monitorar os danos fotoinduzidos pelo tratamento com luz de 450 nm nas células e em modelos miméticos de membranas fosfolipídicas, demonstrando a potencial aplicação da díade como biomarcador luminescente. Por fim, nanofibras poliméricas de poliácridonitrila (PAN) funcionalizadas com a díade RuPDI-Py foram preparadas através do método de eletrofiação e apresentou características ideais para atuar como um promissor material foto-ativo capaz de gerar $^1\text{O}_2$ sob irradiação com luz visível para futuras aplicações como um adesivo no tratamento tópico de câncer de pele melanoma.

Palavras-chave: Perileno diimida, complexos de Rutênio (II), transferência de elétrons fotoinduzida, oxigênio singleto, terapia fotodinâmica, câncer de pele melanoma, nanofibras poliméricas, eletrofiação.

ABSTRACT

RU(II)-PERYLENE DIIMIDE COMPLEX FOR SINGLET OXYGEN ACTIVATION: THERANOSTIC AGENT FOR MELANOMA. In this study, a new perylene diimide ligand functionalized at the 1,7-bay positions with two pyrrolidine molecules and at the imide positions with 5,10-amino-phenanthroline (PDI-Py) and a new electron donor-acceptor dyad $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PDI-Py})]^{2+}$ (RuPDI-Py), where phen = 1,10-phenanthroline, was developed for potential applications in photomedicine by combining absorption and emission in the near-infrared region with the ability to generate singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). The electrochemical, photophysical, and photochemical properties of the PDI-Py ligand and the RuPDI-Py dyad were investigated using steady-state and time-resolved spectroscopic techniques in organic solvents and water. The pyrrolidine substituent induced a shift in the absorption (720 nm) and fluorescence (767 nm, $\tau_{\text{EM}} = 1.75$ ns) to the near-infrared region of the PDI-Py ligand. In DMSO, the RuPDI-Py dyad preserved the absorption and fluorescence of the PDI-Py chromophore in the near-infrared region, whereas in the region between 350-550 nm there was an overlap of the absorption bands related to the $^1\text{MLCT}$ and $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_2$ electronic transitions of the chromophores $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ and PDI-Py, respectively, and the phosphorescence $^3\text{MLCT}$ was completely quenched. Transient absorption studies demonstrated that the excitation of the $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ moiety in the dyad resulted in rapid photoinduced electron transfer (60 ps) between the constituent chromophores, generating the charge-separated intermediate $\{\text{Ru}^{3+}-(\text{PDI-Py}^{\bullet-})\}$ (4 μs) that decays to generate the long-lived triplet state $^3\text{PDI-Py}$ (36 μs), which can sensitize the formation of $^1\text{O}_2$ ($\phi_{\Delta} = 0.40$). In water, the RuPDI-Py dyad self-assembled into J-type molecular aggregates, which exhibited $^1\text{PDI-Py}$ fluorescence at 840 nm ($\tau_{\text{EM}} = 1.55$ ns) and $^3\text{MLCT}$ phosphorescence at 620 nm ($\tau_{\text{EM}} = 1.3$ μs). Furthermore, excitation of the $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ moiety resulted in the formation of $^3\text{PDI-Py}$ (15 μs) and the

generation of $^1\text{O}_2$. The dependence of the photophysical properties of the RuPDI-Py dyad on the wavelength of the excitation light allowed modulation of its biological applications. Using 450 nm visible light, the dyad generated the cytotoxic species $^1\text{O}_2$, which induced 100% inhibition of E. Coli colony growth at dyad concentrations above 2.5 μM after light treatment. *In vitro* studies with human melanoma cells of the MDA-MB-435 cell line demonstrated the photocytotoxicity of the dyad with an IC_{50} of 2.30 μM ($\text{PI} > 108$), indicating its potential application as a photosensitizer for antimicrobial and antitumor photodynamic therapy. In contrast, using light above 650 nm, only the fluorescence of the dyad in the near-infrared region was observed, which allowed monitoring of its cellular location preferentially in the cytoplasm of MDA-MB-435 cells, as well as monitoring the photoinduced damage by treatment with 450 nm light in cells and in mimetic models of phospholipid membranes, demonstrating the potential application of the dyad as a luminescent biomarker. Finally, polymeric polyacrylonitrile (PAN) nanofibers functionalized with the RuPDI-Py dyad were prepared using the electrospinning method and presented ideal characteristics to act as promising photoactive materials capable of generating $^1\text{O}_2$ under irradiation with visible light for future applications in wound healing in the topical treatment of melanoma skin cancer.

Keywords: Perylene diimide, Ruthenium (II) complexes, photoinduced electron transfer, singlet oxygen, photodynamic therapy, melanoma skin cancer, polymeric nanofibers, electrospinning.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
1.1 - Perileno diimida.....	1
1.2 – Formação de estados excitados tripleto	6
1.2.1 – Cruzamento intersistema mediado por processos de transferência de elétrons fotoinduzidos	9
1.2.2 – População do estado excitado tripleto através de processos de transferência de energia tripleto	14
1.3 – Complexos de Ru(II) com estados tripletos de longa duração - díades híbrido orgânica-inorgânica.....	18
1.4 – Estados excitados tripletos: geração de oxigênio singlete e aplicações em terapia fotodinâmica	25
1.4.1 – Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).....	25
1.4.2 – Terapia Fotodinâmica.....	29
2 - Objetivos.....	39
2.1 – Geral.....	39
2.2 – Específicos	39
3 - Materiais e métodos.....	41
3.1 – Reagentes	41
3.2 – Sínteses.....	42
3.2.1 - Síntese do precursor 1,7-dibromoperileno-3,4,9,10- tetracarboxílico dianidrido (2)	42
3.2.2. Síntese do precursor <i>N,N'</i> -Dicicloexil-1,7- dibromoperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (3)	43

3.2.3 - Síntese do precursor <i>N,N'</i> -Dicicloexil-1,7-dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (4).....	43
3.2.4 - Síntese do precursor 1,7-Dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico dianidrido (5).....	44
3.2.5 - Síntese do ligante <i>N</i> -1,10-fenantrolina-1,7-dipirrolinidilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (PDI-Py).....	44
3.2.6 - Síntese do complexo precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂] ..	45
3.2.7 - Síntese da díade [Ru(phen) ₂ (PDI-Py)](PF ₆) ₂ (RuPDI-Py).....	45
3.3 – Equipamentos e metodologias	46
3.3.1 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	46
3.3.2 – Espectrometria de Massas UHPLC-QToF-MS/MS...	46
3.3.3 – Espectroscopia de UV-vis.....	47
3.3.4 – Propriedades Eletroquímicas	47
3.3.5 – Espectroscopia de Luminescência do estado estacionário	48
3.3.6 – Tempo de vida de emissão	49
3.3.7 - Espectroscopia de absorção transiente de femtossegundos.....	49
3.3.8 - Espectroscopia de absorção transiente de nanossegundos	50
3.3.9 – Determinação das espécies reativas de oxigênio geradas em solução	51

3.3.10 – Modelos de membrana fosfolipídicas.....	54
3.3.11 – Fontes de Luz.....	55
3.3.12 - Terapia Fotodinâmica Antibacteriana.....	56
3.3.13 – Terapia Fotodinâmica antitumoral.....	57
3.3.14 – Preparação das nanofibras poliméricas utilizando a técnica de eletrofiação	61
4 - Resultados e discussão	65
4.1 – Síntese e caracterização	65
4.1.1 – Ligante PDI-Py	65
4.1.2 – Complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	78
4.1.3 – Díade RuPDI-Py	80
4.2 – Propriedades eletroquímicas	89
4.2.1 – Espectroeletróquímica	92
4.3 - Propriedades fotofísicas em DMSO	94
4.3.1 – Espectroscopia de UV-Vis e de Luminescência	94
4.3.2 - Espectroscopia de absorção transiente (TA)	99
4.3.3 – Interação não-covalente entre o ligante PDI-Py e o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	110
4.3.4 – Estabilidade química e fotoquímica em DMSO.....	111
4.4 – Solvatocromismo	113
4.5 - Propriedades fotofísicas em água	115
4.5.1 – Espectroscopia de UV-Vis e de Luminescência	115
4.5.2 – Estabilidade dos agregados em solução.....	121
4.5.3 – Espectroscopia de absorção transiente	126

4.5.4 – Estabilidade química e fotoquímica da díade RuPDI-Py em água.....	127
4.6 - Determinação das espécies reativas de oxigênio geradas em solução.....	129
4.6.1 - Determinação de oxigênio singlete por espectroscopia de UV-Vis.....	129
4.6.2 - Determinação de oxigênio singlete por EPR	133
4.6.3 - Determinação das demais EROs por EPR.....	136
4.7 - Modelos de membrana fosfolipídicas.....	137
4.8 - Terapia Fotodinâmica Antibacteriana.....	144
4.9 - Terapia Fotodinâmica antitumoral.....	146
4.9.1 – Ensaio de viabilidade celular	146
4.9.2 – Microscopia de fluorescência e FLIM.....	150
4.10 – Desenvolvimento de nanofibras poliméricas fotoativas para o tratamento tópico de câncer de pele melanoma	156
4.10.1 - Preparação das nanofibras poliméricas por eletrofição.....	157
4.10.2 – Caracterização morfológica das nanofibras poliméricas.....	160
4.9.3 – Propriedades luminescentes das nanofibras poliméricas	162
4.10.5 - Geração de oxigênio singlete pelas nanofibras poliméricas.....	165
5 - Conclusões.....	169
<u>6</u> - Referências	171

1 – Introdução

1.1 – Perileno diimida

Os derivados do perileno-3,4:9,10-diimida ácido tetracarboxílico (comumente chamado de perileno diimida, PDI) representam uma classe de cromóforos orgânicos que vêm sendo amplamente estudados desde o início do século XX.¹ A estrutura molecular do PDI (FIGURA 1.1) é caracterizada por um sistema aromático rígido e planar o qual confere uma série de propriedades químicas, ópticas e eletrônicas interessantes para essa classe de compostos. Os derivados do PDI são caracterizados por uma ampla absorção com estrutura vibrônica e com altos coeficientes de absorvidade molar (30.000 - 40.000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) na região visível do espectro, altos rendimentos quânticos de fluorescência ($\Phi_{fl} > 0.9$) com tempo de vida de fluorescência de aproximadamente 4 ns. Além disso, esses compostos exibem alta estabilidade química e fotoquímica e um elevado caráter receptor de elétrons.²

Devido às suas propriedades atraentes os derivados do PDI têm sido utilizados em diversas aplicações como pigmento industrial³, dispositivos fotovoltaicos^{4,5}, diodo orgânico emissor de luz (OLED)^{6,7}, sensores fluorescentes^{8,9}, materiais para detecção e degradação de poluentes¹⁰, fotocatalisadores¹¹, sondas fluorescentes para bioimagens¹², entre outras.

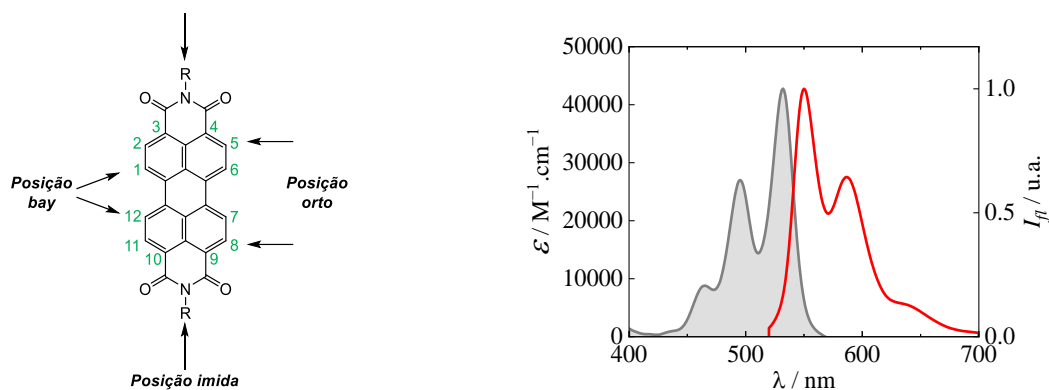


FIGURA 1.1 – Estrutura química do PDI com a numeração das posições funcionalizáveis no sistema aromático e espectros de absorção (cinza) e de fluorescência (vermelho) típicos do PDI em solventes orgânicos.

A razão para a adequação dos PDIs para uma ampla e diversificada gama de aplicações também está correlacionada com a possibilidade de ajustar suas propriedades ópticas e eletrônicas através das modificações químicas na estrutura molecular. Como representado na FIGURA 1.1 o núcleo do perileno possui dez posições funcionalizáveis: as posições 2,5,8,12 denominadas como posições orto, as posições 1,6,7,12 conhecidas como *bay* e as posições imida.⁵ Na TABELA 1.1 estão representados alguns exemplos de derivados do PDI funcionalizados com diferentes substituintes nas posições bay, imida e orto e como esses substituintes afetam as propriedades ópticas dessa classe de compostos.

Os substituintes nas posições imida geralmente são utilizados para melhorar a solubilidade e as propriedades de agregação do PDI, visto que esses compostos tendem a formar agregados devido às interações de empilhamento π - π . Por exemplo, a adição de substituintes alquila (1a) ou arila (1b) resultam em derivados do PDI solúveis na maioria dos solventes orgânicos, como diclorometano, clorofórmio, THF e acetona. Esses grupos volumosos são

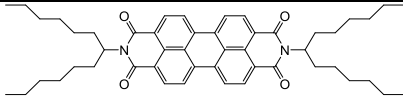
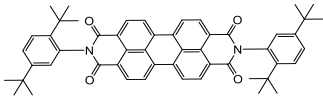
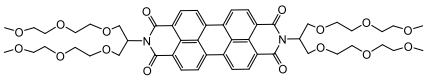

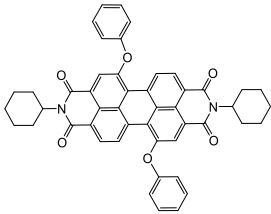
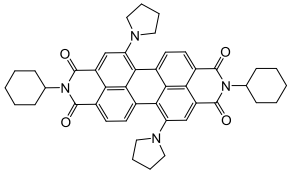
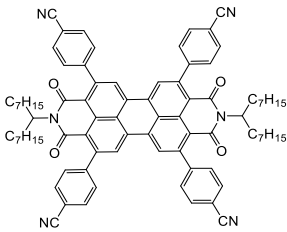
projetados para fora do plano do cromóforo e, devido ao impedimento estérico, dificultam o empilhamento π - π entre as moléculas de PDI.^{2,5}

Os substituintes imida também podem aumentar a solubilidade dos PDIs em solução aquosa. Por exemplo, a funcionalização com substituintes hidrofílicos como os dendrons de poliglicerol^{13,14} (1c) e ciclodextrina¹⁵ aumentam a solubilidade devido a presença de grupos polares, como éter e hidroxila, que podem formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água e levar a solubilidade em água. Além disso, como esses substituintes são volumosos resulta em um impedimento estérico eficaz e, conseqüentemente, diminui o empilhamento π - π . Substituintes catiônicos como os sais de amônio (1d) também melhoram a solubilidade em água, de forma que as interações repulsivas entre as cargas eletrostáticas diminuem a tendência de agregação do PDI.^{16,17}

No entanto, os substituintes na posição imida não alteram significativamente as propriedades ópticas e eletrônicas como absorção, fluorescência e as energias dos orbitais HOMO/LUMO. De acordo com a literatura isso ocorre devido ao fato de que os átomos do nitrogênio imida estão localizados em planos nodais nos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, o que resulta em um acoplamento eletrônico fraco entre esses substituintes e o núcleo do perileno.^{2,3,18,19}

Em contraste com os substituintes imida, os substituintes na posição bay afetam significativamente os potenciais redox, as propriedades ópticas e aumentam a solubilidade desses compostos ao induzir uma torção no núcleo do perileno.¹⁹ De acordo com a literatura², os substituintes π -doadores desestabilizam a energia do HOMO enquanto os substituintes π -receptores estabilizam a energia do LUMO, resultando em desvios batocrômicos (para a região do vermelho) dos espectros de absorção e de emissão em ambos os casos.

TABELA 1.1 – Propriedades ópticas de derivados do PDI funcionalizados.

Composto (solvente)	$\lambda_{\text{abs-max}}$ (nm)	ϵ_{max} (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{em-max}}$ (nm)	Φ_{fl}	τ_{fl} (ns)	Ref.
 1a (CH ₂ Cl ₂)	524	88000	534	0,99	4,0	20
 1b (CHCl ₃)	527	96000	536	0,99	3,7	21
 1c (H ₂ O)	529	53000	535	0,04		14
 1d (PBS)	500		550	0,26		17
 1e (CHCl ₃)	549	55000	578	0,99	4,5	1
 1f (CH ₂ Cl ₂)	700	39000	736	0,25		22
 1g (CH ₂ Cl ₂)	528	62900	542	0,69		23

De acordo com Würthner¹ a substituição com o grupo fenóxi π -doador nas posições 1 e 7 (1e) resultou no deslocamento batocrômico dos espectros de absorção e de emissão em 20 e 40 nm, respectivamente, em comparação com o PDI análogo sem substituintes bay. No entanto, apesar do deslocamento, as propriedades características dos PDIs como a estrutura vibrônica dos espectros, o alto rendimento quântico de fluorescência e a alta estabilidade fotoquímica foram preservadas.

Mudanças espectrais mais pronunciadas ocorrem com a substituição com grupos π -doadores nas posições bay. Por exemplo, a adição de duas moléculas de pirrolidina (Py) (1f) resultou em um deslocamento dos espectros de absorção e de emissão de aproximadamente 160 nm em comparação ao PDI não-substituído.^{1,2,22} A pirrolidina é um substituinte altamente doador de elétrons e, quando é adicionada ao núcleo altamente receptor de elétrons do PDI, o par de elétrons não-ligantes da pirrolidina passa a fazer parte da conjugação do PDI. Cálculos computacionais dos orbitais moleculares demonstram que o HOMO desses derivados está localizado principalmente no substituinte doador, o que resulta em um aumento da energia do HOMO, enquanto o LUMO é semelhante aos de PDIs sem substituintes na posição bay.^{19,24,25} Consequentemente, a transição eletrônica de menor energia $S_0 \rightarrow S_1$ adquire um caráter de transferência de carga (CT) do doador Py para o receptor PDI. Características semelhantes são observadas para outros substituintes π -doadores como a piperidina²⁶ e a morfolina.²⁷

O caráter doador ou receptor de elétrons dos substituintes nas posições orto (1g) pode alterar as propriedades eletrônicas do PDI e influenciar na energia do LUMO, sem alterar as propriedades ópticas e a planaridade do anel.^{5,23} Modificações químicas no núcleo do PDI também podem torná-los eficientes fotossensibilizadores tripleto (FsT). Os FsT são compostos que

apresentam forte absorção na região espectral do UV-visível, eficiente cruzamento intersistema (ISC) e estados excitados tripleto de longa duração.²⁸

1.2 – Formação de estados excitados tripleto

O estado excitado tripleto (T_n) é um estado eletrônico no qual dois elétrons desemparelhados com spins paralelos estão localizados em orbitais moleculares diferentes, como mostrado na FIGURA 1.2.

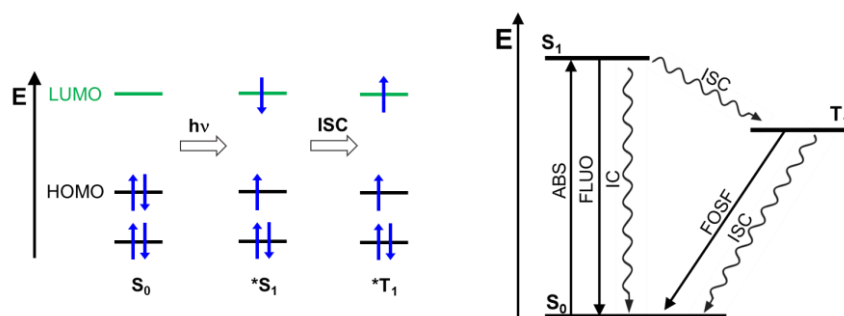


FIGURA 1.2 – Diagrama esquemático dos orbitais moleculares de fronteira dos estados fundamental e excitados com os respectivos spins dos elétrons e diagrama de Jablonski mostrando o mecanismo de formação do estado excitado tripleto os processos de desativação dos estados excitados.

As multiplicidades dos níveis de energia são definidas como $2S+1$, onde S é o momento angular do spin. Um estado eletrônico tripleto ocorre nos casos em que os spins de dois elétrons desemparelhados, com spin $m_s = +1/2$ se alinham em fase para gerar $S = 1$. O termo “tripleto” significa que existem três configurações eletrônicas possíveis para o estado tripleto com diferentes orientações dos spins ao longo de um determinado eixo: $M_S = +1$ ($\uparrow\uparrow$), -1 ($\downarrow\downarrow$) e 0 ($\uparrow\downarrow$). A maioria das moléculas no estado fundamental são encontradas no estado

singleto porque todos os seus elétrons estão emparelhados, no entanto existem exceções e algumas moléculas são encontradas com estados fundamentais tripleto estáveis, como por exemplo o oxigênio molecular (O_2).²⁹

Geralmente os estados eletrônicos excitados tripletos são formados a partir da fotoexcitação de moléculas. O diagrama de Jablonski na FIGURA 1.2 ilustra os estados eletrônicos moleculares relevantes e alguns possíveis processos de desativação dos estados excitados. Em uma molécula com estado fundamental singleto (S_0) a absorção de luz leva a população de estados excitados singletos (S_1). A inversão dos spins do elétron só é possível se houver algum grau de acoplamento spin-órbita (no qual o momento magnético orbital interage com os momentos magnéticos de spin). Quando essa interação ocorre, o processo de ISC é favorecido, o qual é definido como uma transição não-radiativa entre dois estados eletrônicos de diferentes multiplicidades onde ocorre a inversão do spin ($S_1 \rightarrow T$), resultando na população do estado tripleto.²⁹⁻³²

O acoplamento spin-órbita é diretamente proporcional ao número atômico (Z). Geralmente em moléculas orgânicas que possuem apenas átomos leves na estrutura molecular como C, N e O, a interação spin-órbita é fraca e o processo de ISC é lento. Por outro lado, moléculas com átomos que possuem alto Z (“átomos-pesados”) como por exemplo aquelas que contêm iodo, bromo ou átomos de metais de transição, a mistura dos graus de liberdade orbital e de spin é favorecida, resultado no forte acoplamento spin-órbita.^{29,33}

A energia do primeiro estado excitado tripleto (T_1) é geralmente menor do que a do primeiro estado excitado singleto (S_1) devido ao fato de que a repulsão entre dois elétrons desemparelhados no estado tripleto é menor do que no estado singleto, portanto, a repulsão coulômbica é menos intensa e a energia do estado tripleto é menor.

Os estados excitados tripleto são caracterizados por longos tempos de vida porque o processo de desativação é proibido por spin. O estado tripleto

pode ser desativado para o estado fundamental através do processo radiativo emitindo fosforescência ou por processos não radiativos, como a conversão interna (CI). Além disso, algumas moléculas podem participar de reações de transferência de elétrons e/ou de energia a partir dos estados tripleto.^{30,34}

Moléculas com estados excitado tripleto de longa-duração são amplamente usadas como intermediários em processos fotoquímicos e fotofísicos, permitindo aplicações em diversas áreas como fotocatalise, terapia fotodinâmica, dispositivos eletrônicos para conversão de energia solar, conversão ascendente de fótons (aniquilação tripleto-tripletto), polimerização foto iniciada, entre outros.^{35,36}

Além do efeito do átomo pesado, algumas outras estratégias vêm sendo utilizadas para aumentar a eficiência do processo de ISC e acessar o estado excitado tripleto através de processos de transferência de elétrons e/ou de energia fotoinduzidos. Esses processos serão discutidos detalhadamente nos próximos tópicos.

O processo de ISC não é favorecido em derivados do PDI e, conseqüentemente, o rendimento quântico de formação de tripleto desses compostos é baixo ($\Phi_T < 0,001$). Isso ocorre devido ao baixo acoplamento spin-órbita característico de moléculas orgânicas associado aos elevados rendimentos quânticos de fluorescência de derivados do PDI com valores próximos a unidade ($\Phi_{fl} > 0.9$), isto é, aproximadamente 90% dos fótons absorvidos retornam para o estado fundamental emitindo fluorescência, além da grande diferença de energia entre os estados excitados singlete e tripleto.^{37,38} A adição de substituintes nas posições bay e imida do PDI pode aumentar a eficiência do ISC através de processos de transferência de cargas fotoinduzidos³⁹⁻⁴¹ ou pelo efeito do átomo pesado incorporando metais de transição, como Pt(II) e Ir (III), que induzem um forte acoplamento spin-órbita.^{42,43}

1.2.1 – Cruzamento intersistema mediado por processos de transferência de elétrons fotoinduzidos

Moléculas no estado excitado são melhores agentes oxidantes e redutores do que as espécies do estado fundamental. Como representado na FIGURA 1.3, a absorção de luz promove um elétron do orbital HOMO para o LUMO. O elétron que foi promovido para o estado eletrônico de maior energia é mais facilmente removido, o que significa que o estado excitado tem um potencial de ionização menor do que o estado fundamental. Ao mesmo tempo, a promoção de um elétron deixa uma lacuna no orbital podendo aceitar um elétron, o que significa que o estado excitado tem uma afinidade eletrônica maior do que o estado fundamental.

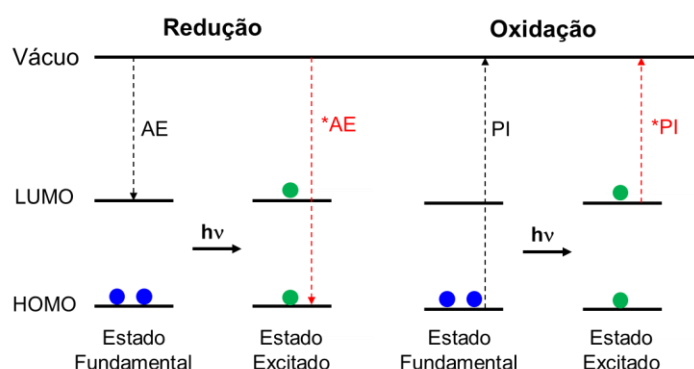


FIGURA 1.3 – Esquemas representando as mudanças nos potenciais de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE) de uma molécula após a fotoexcitação.

Os processos de transferência de elétrons fotoinduzidos (TE) ocorrem em sistemas compostos por uma unidade doadora de elétrons (D) e uma unidade receptora de elétrons (R). No processo de TE intramolecular, D e R coexistem na mesma molécula, geralmente chamadas de díades doadora-

receptora de elétrons, enquanto no processo de TE intermolecular D e R correspondem a moléculas diferentes. Após a absorção de luz, a TE leva à formação de um estado excitado de separação de cargas (CS) que consiste no cátion radical do doador ($D^{\bullet+}$) e no ânion radical do receptor ($R^{\bullet-}$), como representado na FIGURA 1.4.

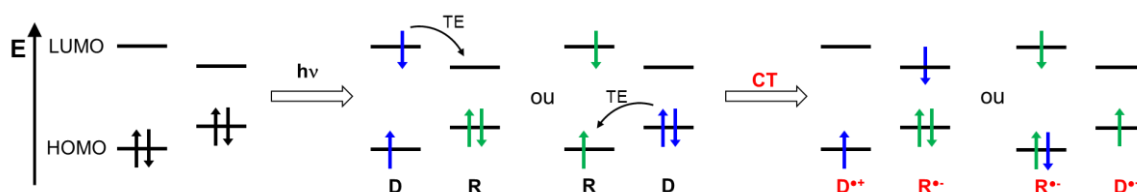


FIGURA 1.4 – Diagrama esquemático dos orbitais moleculares de fronteira para o processo transferência de elétrons (TE) fotoinduzido em díades doadoras-receptoras de elétrons.

A TE é modulada pelas propriedades eletroquímicas e dos estados excitados das unidades receptoras e doadoras. Para uma reação de TE do estado excitado do doador ($*D$) para o receptor (R), a variação da energia livre de Gibbs é dada pela Equação 1.1.

$${}^*\Delta G^0 = [E^0(D^+/D) - E^0(R/R^-) - E_{00}(D^*/D)] \quad (1.1)$$

Onde, $E^0(D^+/D)$ corresponde ao potencial de oxidação do doador, $E^0(R/R^-)$ é o potencial de redução do receptor e $E_{00}(D^*/D)$ é diferença entre os níveis vibracionais zero-zero dos estados excitado e fundamental do doador.

Os processos de TE inter e/ou intramoleculares competem com os demais processos de desativação dos estados excitados e, no geral, resultam na

redução dos tempos de vida e dos rendimentos quânticos de emissão. Os íons radicais gerados a partir da TE geralmente são espécies transientes e são detectados por técnicas espectroscópicas resolvidas no tempo, como as espectroscopias de absorção transiente e de Raman.⁴⁴

Os estados CT podem passar pelo processo não-radiativo de recombinação de cargas resultando na formação do estado excitado tripleto.⁴⁵ A formação de tripleto a partir dos estados CT geralmente ocorre através do processo de cruzamento intersistema de pares de radicais (*radical-pair intersystem crossing*, RP-ISC) ou através do processo de cruzamento intersistema de transferência de carga spin-órbita (*spin-orbit charge transfer intersystem crossing*, SOCT-ISC),^{46,47} representados na FIGURA 1.5.

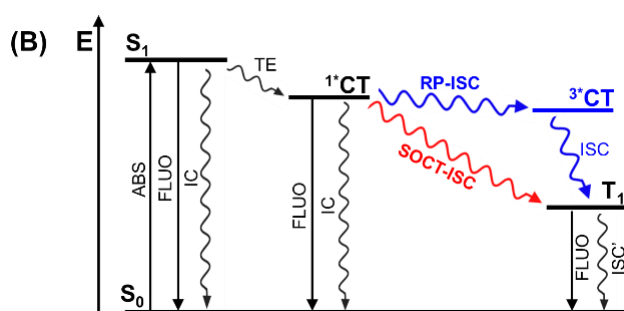


FIGURA 1.5 – Diagrama de Jablonski mostrando os possíveis mecanismos de formação do estado tripleto em díades doadoras-receptoras.

O mecanismo de RP-ISC geralmente ocorre em díades com fraco acoplamento eletrônico entre as unidades doadoras e receptoras devido à longas distâncias de separação (por exemplo, $>15 \text{ \AA}$).⁴⁵ Esse mecanismo envolve a formação de um estado intermediário de transferência de carga tripleto (3^*CT) resultante da interação hiperfina entre o spin do elétron e o spin nuclear magnético dos estados 1^*CT e 3^*CT que favorece o ISC. O ISC é seguido por uma rápida

recombinação de carga que induz a formação do estado excitado tripleto de menor energia da unidade doadora ou receptora.^{45,48}

O processo de RP-ISC ocorre em centros de reação fotossintética naturais^{31,49} e tem sido observado em diversas díades de derivados do PDI. Por exemplo, Dance e colaboradores prepararam uma díade composta por um sistema doador-ponte-receptor (D-P-A), onde D = fenotiazina, P = p-fenileno e A = perileno-3,4:9,10-bis(dicarboxiimida) (1h, FIGURA 1.6), na qual acima de 150 K a transferência de elétrons gerou o par de íons de radicais (PTZ⁺ –Ph_n –PDI^{•-}) e, em seguida, a recombinação de carga gerou o estado excitado tripleto (PTZ–Ph_n–^{3*}PDI).⁵⁰

O mecanismo de SOCT-ISC geralmente é favorecido em díades com forte acoplamento eletrônico nas quais o doador e o receptor estão diretamente ligados por meio de uma única ligação C–C e em díades que apresentam geometria ortogonal (orientação perpendicular) entre as unidades doadoras-receptoras. Este mecanismo geralmente envolve o processo de transferência de elétrons entre orbitais de diferentes simetrias, como por exemplo a transferência de elétrons de um orbital n não-ligante localizado no doador para um orbital π^* do receptor, a qual resulta em grandes mudanças no momento angular orbital e induzem à um rápido ISC diretamente do estado ^{1*}CT para o estado T₁.^{45,51}

O processo de SOCT-ISC foi observado em diversas díades de derivados do PDI.^{37,52–54} Por exemplo, em dímeros do PDI ligados covalentemente por uma molécula de xanteno (Xan) (1i, FIGURA 1.6) a fotoexcitação produziu o estado de separação de cargas Xan^{•+}–PDI^{•-}. A orientação ortogonal entre os orbitais da Xan e do PDI favoreceram o ISC através do processo SOCT-ISC e a recombinação de carga resultou na população do estado ^{3*}PDI com tempos de vida de 133 e 239 μ s em CH₂Cl₂ e em tolueno, respectivamente.⁵⁵

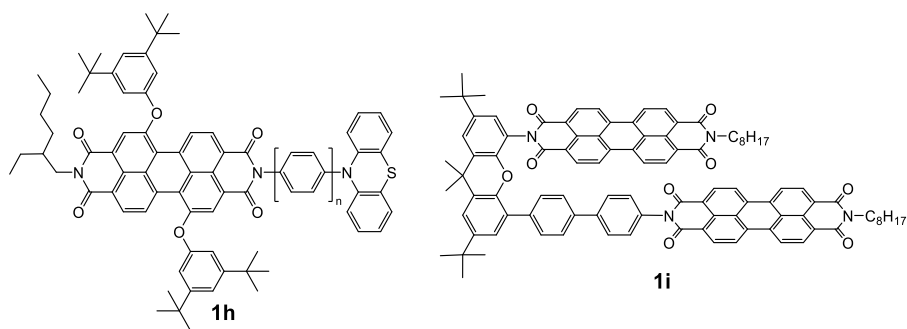


FIGURA 1.6 - Díades doadoras-receptoras de elétrons de derivados do PDI que participam dos processos de transferência de cargas fotoinduzidos do tipo RP-ISC⁵⁰ (1h) e SOCT-ISC⁵⁵ (1i).

A diferença entre os mecanismos RP-ISC e SOCT-ISC é muito sutil e difícil de determinar. O SOCT-ISC mostra uma forte dependência da distância e da orientação ao contrário do RP-ISC, que não depende da distância e é uma interação localizada entre o spin do elétron e os spins nucleares próximos. Além disso, RP-ISC é geralmente mais lento ($k_{ISC} \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$) em relação ao SOCT-ISC ($k_{ISC} \sim 10^{11} \text{ s}^{-1}$).^{47,51,56}

As díades doadoras-receptoras são sistemas moleculares sinteticamente exigentes, uma vez que a eficiência dos processos de ISC mediados por CT dependem de fatores como a distância e o acoplamento eletrônico entre as unidades doadores e receptoras. Além disso, as estruturas moleculares rígidas dos PDIs podem causar problemas de baixa solubilidade em água, limitado as aplicações biológicas. Portanto, é altamente desejável desenvolver uma estrutura molecular simples para díades doadoras-receptoras de elétrons para obter um ISC eficiente.

1.2.2 – População do estado excitado tripleto através de processos de transferência de energia tripleto

Os processos de transferência de energia fotoinduzidos (TE_n) ocorrem do estado excitado do doador para o receptor no estado fundamental através de dois possíveis mecanismos: TE_n por ressonância de Förster ou Dexter. A diferença entre os dois mecanismos está ilustrada na FIGURA 1.7.

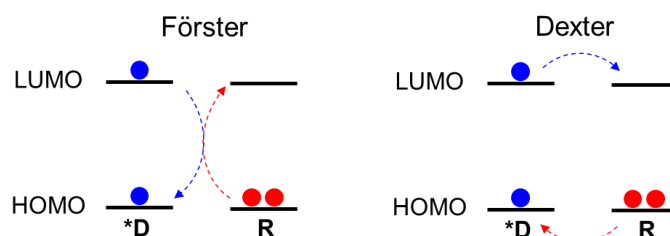


FIGURA 1.7 – Mecanismos de transferência de energia Förster e Dexter.

No mecanismo de Förster (também chamado de mecanismo Coulombico ou FRET) o doador excitado (*D) transfere energia para o grupo receptor (R) por meio de um processo não radiativo. Esse mecanismo ocorre através da interação ressonante entre os momentos de dipolo do doador no estado excitado e do receptor no estado fundamental, fazendo com que o *D retorne para o estado fundamental e, simultaneamente, um elétron do R seja promovido para o estado excitado.⁵⁷ Este processo não requer contato físico entre D e R e pode ocorrer em longas distâncias, no entanto é necessário que haja alta interação dipolo-dipolo e a eficiência deste processo é governada principalmente pela sobreposição entre os espectros de emissão do D e de absorção do R.⁵⁷ A constante de velocidade do mecanismo de Förster (k_{en}^F) pode ser definida pela Equação 1.2:

$$k_{en}^F = \frac{R_0^6}{r_{DR}^6 \tau} \quad (1.2)$$

Onde τ é o tempo de vida do doador na ausência do receptor, r_{DB} é a distância (em Å) entre o doador e o receptor e R_0 é a distância em que a TEn ocorre com 50% de eficiência, denominada como raio de Förster.³¹

O mecanismo de Förster é observado na natureza em complexos antena presentes nas plantas e em outros organismos fotossintéticos, formados por moléculas de pigmento que captam a energia da luz solar e a transfere até chegar ao centro de reação.^{29,31}

No mecanismo de Dexter ocorre uma troca simultânea de dois elétrons, ou seja, *D transfere um elétron para o orbital LUMO do R, enquanto recebe simultaneamente um elétron do R no seu orbital HOMO. Dessa forma, a energia e a multiplicação de spin do estado excitado são transferidas e o estado excitado do receptor é formado ao mesmo tempo que o estado fundamental do doador é regenerado. Este mecanismo de troca de dois elétrons requer que a energia dos orbitais envolvidos no processo sejam próximas para que a sobreposição orbital entre D e R seja eficiente. Além disso é necessário que D e R estejam próximos e por isso é considerado um mecanismo colisional.

A constante de velocidade do mecanismo de Dexter (k_{en}^D) pode ser definida pela Equação 1.3:

$$k_{en}^D = A \exp [-\beta(r_{DR} - r_0)] \quad (1.3)$$

Onde β é o fator de atenuação para a troca de elétrons e depende da distância entre o doador e receptor.

O mecanismo de Dexter obedece a regra de seleção de conservação do spin e um exemplo típico desse mecanismo é a formação de oxigênio singlete através da reação de transferência de energia tripleto-tripeto,^{29,31} que será discutida detalhadamente nos próximos tópicos.

Os processos de TEn intramoleculares podem ocorrer em díades doadoras-receptoras compostas por dois cromóforos ligados covalentemente e os estados excitados tripleto podem ser populados através do processo de transferência de energia tripleto-tripeto. Esses sistemas são compostos por um cromóforo doador que é um fotossensibilizador tripleto e por um cromóforo receptor de energia tripleto. Como representado na FIGURA 1.8, o doador tripleto absorve a energia de excitação para gerar seu estado excitado singlete que subsequentemente é convertido para o estado tripleto através do ISC. Em sequência, ocorre um rápido processo de transferência de energia tripleto-tripeto intramolecular gerando estado excitado tripleto do receptor.

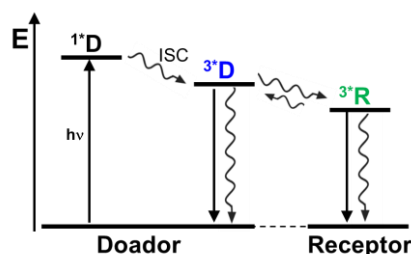


FIGURA 1.8 – Transferência de energia tripleto-tripeto intramolecular em díades doadoras-receptoras.

Para que essas díades participem das reações de transferência de energia intramolecular elas devem ser projetadas para que o acoplamento entre os cromóforos no estado fundamental seja fraco. Dessa forma, os cromóforos preservam suas propriedades eletrônicas e fotofísicas intrínsecas como moléculas

independentes, como os respectivos níveis de energia dos estados fundamental e excitado, eficiências do ISC, etc. Se o estado excitado tripleto do cromóforo receptor possuir energia muito próxima ao estado tripleto do doador, devido ao equilíbrio entre os estados excitados, pode ocorrer uma transferência de energia tripleto intramolecular reversível entre os dois cromóforos e prolongar o tempo de vida do estado tripleto do doador. Esse processo é denominado como efeito reservatório de energia. No entanto, se o intervalo de energia entre esses estados for maior, a constante de transferência de energia de retorno do receptor para o doador é desfavorecida e, conseqüentemente, a população do estado excitado tripleto do receptor é favorecida em relação ao estado tripleto do doador.⁵⁸

Os complexos de metais de transição são amplamente empregados como fotossensibilizadores devido às suas altas eficiências de ISC. Os hidrocarbonetos aromáticos que possuem alto rendimento quântico de fluorescência, como os derivados do pireno e do PDI, são candidatos promissores a receptores pois a grande separação de energia dos estados singleto-tripletto permite que os níveis relevantes do estado tripleto do fotossensibilizador sejam colocados entre eles.⁵⁹

Por exemplo, Würthner e colaboradores prepararam um sistema supramolecular onde um cromóforo de PDI com substituintes piridina nas posições imida se ligou axialmente a dois fragmentos de porfirina de Ru(II). Neste sistema, denominado DPyPBI[Ru(TPP)(CO)]₂ (1j, FIGURA 1.9), o comportamento fotofísico muda drasticamente com o comprimento de onda de excitação, dependendo se as unidades DPyPBI ou Ru(TPP)(CO) são excitadas. Após a excitação do DPyPBI, a intensa fluorescência típica desta unidade é completamente suprimida e os resultados de espectroscopia resolvida no tempo revelam a ocorrência de transferência de elétrons fotoinduzida da unidade Ru(II)-porfirina para o cromóforo PDI ($\tau = 5,6$ ps) seguida pela recombinação de cargas ($\tau = 270$ ps). Por outro lado, após a excitação da unidade Ru(TPP)(CO), o ISC

ultrarrápido ($\tau < 1$ ps) é seguido pela transferência de energia tripleto do Ru(II)-porfirina para a unidade PDI ($\tau = 720$ ps). A energia do estado tripleto $^3\text{DPyPBI}$ é menor que a energia do estado tripleto da componente Ru(II)-porfirina e a fosforescência do estado $^3\text{Ru(II)}$ é totalmente suprimida pela transferência de energia $\text{PDI}(S_0)/^*\text{Ru}(T_1) \rightarrow \text{PDI}(T_1)/^*\text{Ru}(S_0)$. Por fim, o estado $^3\text{DPyPBI}$ decai para o estado fundamental em uma escala de tempo mais longa de $\tau = 9,8 \mu\text{s}$.⁶⁰ Outros exemplos de transferência de energia tripleto-tripletto intramolecular podem ser encontrados nesta revisão.⁶¹

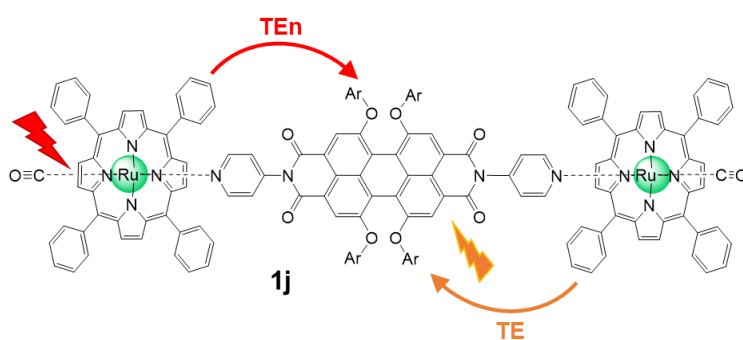


FIGURA 1.9. Estrutura molecular da díade $\text{DPyPBI}[\text{Ru}(\text{TPP})(\text{CO})]_2$ (1j) que participa de reações de transferência de energia e de elétrons fotoinduzidas. Figura adaptada da referência Prodi et al. (2005).⁶⁰

1.3 – Complexos de Ru(II) com estados tripletos de longa duração - díades híbrido orgânica-inorgânica

Os complexos polipiridínicos de Ru(II) estão entre os compostos inorgânicos mais investigados. Eles têm sido usados em diversas aplicações tecnológicas e biomédicas, como conversão de energia solar, fotocatalise, terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer, biomarcadores luminescentes, entre outras.^{62,63}

Os complexos polipiridínicos de Ru(II) exibem uma combinação única das propriedades químicas, estruturais, fotoquímicas, fotofísicas e eletroquímicas. Para uma melhor compreensão o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (1k, FIGURA 1.10), onde phen = 1,10-fenantrolina, pode ser utilizado como um exemplo para demonstrar detalhadamente essas propriedades. Este complexo é solúvel em uma variedade de solventes orgânicos e em água, o íon Ru^{2+} apresenta a configuração eletrônica d^6 baixo spin e a total ocupação de seus orbitais $d(t_{2g})$ os torna cineticamente estáveis e termodinamicamente inertes. Além disso, o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresenta uma intensa absorção na região do visível com máximo em 450 nm ($\epsilon \sim 18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em água) decorrente da transição eletrônica de transferência de carga do metal para o ligante ($^1\text{MLCT}$, $\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{L}, \pi^*$). Seu estado excitado de menor energia, $^3\text{MLCT}$, é populado com elevada eficiência devido ao processo de ISC altamente favorecido em decorrência do forte acoplamento spin-órbita. O estado $^3\text{MLCT}$ apresenta intensa fosforescência com máximo em ~ 600 nm ($\Phi_{\text{ph}} = 0,058$) a qual é caracterizada por um longo tempo de vida de emissão de $1\mu\text{s}$ em água.⁶⁴

O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ também possui um rico comportamento eletroquímico em solução, caracterizado por um processo de oxidação centrado no metal ($E_{1/2} = +1,26 \text{ V vs NHE}$ em água) e por processos de redução centrados no ligante phen ($E_{1/2} = -1,36 \text{ V vs NHE}$). Além disso, o $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em seu estado excitado $^3\text{MLCT}$ é um bom redutor e um bom oxidante, com os potenciais redox do estado excitado de $^*E_{\text{ox}} = -0,92 \text{ V}$ e $^*E_{\text{red}} = +0,82 \text{ V vs NHE}$ em água.³¹

A FIGURA 1.10 apresenta um diagrama simplificado dos orbitais moleculares de fronteira do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e dos seus respectivos processos de desativação do estado excitado. O íon metálico Ru^{2+} possui seis elétrons emparelhados em seus orbitais $d(t_{2g})$ (HOMO) e o ligante polipiridínico 1,10-fenantrolina possui os orbitais π^* de menor energia (LUMO) vazios, tornando-os orbitais receptores de elétrons. Após a absorção de um fóton, ocorre

a transferência de elétrons de um orbital $d\pi$ do metal para o orbital π^* do ligante. Este processo de transferência eletrônica converte gera o estado excitado eletrônico intermediário de separação de cargas $\{[\text{Ru(III)}(\text{phen})_2(\text{phen}^{\bullet-})]\}$, o qual após um rápido ISC, gera o estado $^3\text{MLCT}$. A partir do estado $^3\text{MLCT}$ há três possíveis caminhos para retornar para o estado fundamental: (1) emitir fosforescência ($\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$, $\tau_{\text{ph}} = 1,0 \text{ }\mu\text{s}$ e $\Phi_{\text{ph}} = 0,058$ em água³¹), (2) participar de reações de transferência de energia tripleto-tripletto com o O_2 e gerar $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} = 0,39$ em D_2O ⁶⁵), ou (3) participar de reações de transferência de elétrons atuando como um agente oxidante ou redutor.

Uma característica principal dos complexos polipiridínicos de Ru(II) é que suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas podem ser ajustadas alterando os ligantes.⁶⁶ A incorporação de cromóforos orgânicos em estruturas de complexos de metais de transição (CMT) para formar díades híbrido orgânica-inorgânica é uma estratégia eficaz para melhorar as propriedades e influenciar na dinâmica dos estados excitados, como por exemplo aumentar a capacidade de absorção de luz visível e prolongar o tempo de vida do estado excitado tripleto.³⁴ Geralmente esses cromóforos orgânicos são sistemas π -conjugados extensos e com altos coeficientes de absorvidade molar. A conjugação resulta na redução da energia das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e dos respectivos estados excitados desses ligantes.⁶⁷

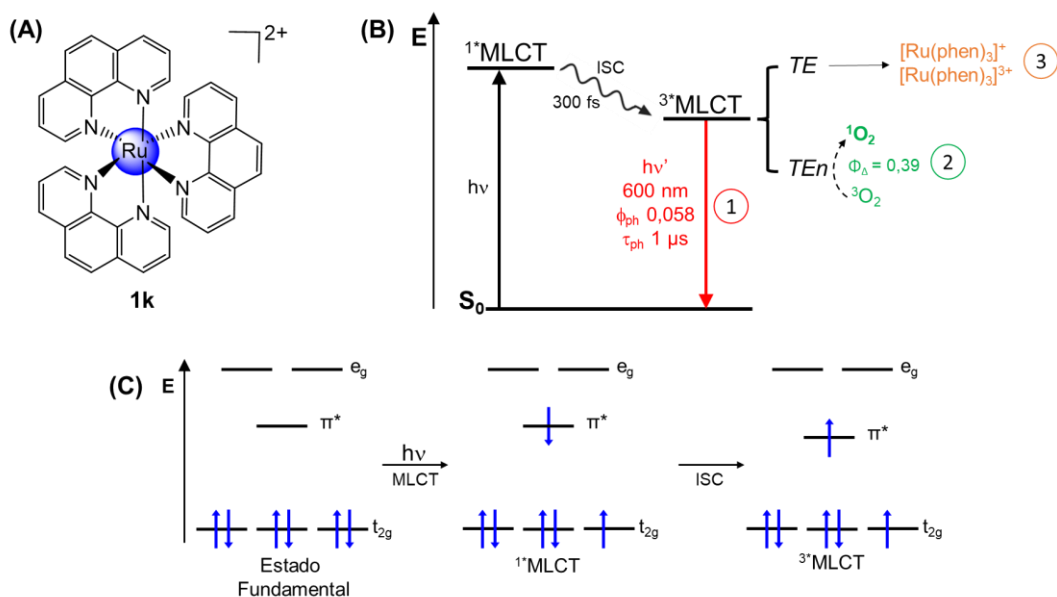


FIGURA 1.10 – (A) Estrutura molecular e (B) diagrama qualitativo dos processos fotofísicos do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ com os possíveis mecanismos de desativação do estado excitado em água, incluindo (1) fosforescência, (2) reação de transferência de energia tripleto-triplete e formação de $^1\text{O}_2$ e (3) reação de transferência de elétrons. (C) Representação dos orbitais moleculares envolvidos na transição eletrônica MLCT.

Os estados eletrônicos excitados de menor energia em CMT com cromóforos orgânicos aromáticos deixam de ser localizados nos estados MLCT do metal e tornam-se localizados nos estados $\pi \rightarrow \pi^*$ do ligante aromático, ou seja, a transição eletrônica de menor energia muda de $S_0 \rightarrow ^1\text{MLCT}$ para $S_0 \rightarrow ^1(\pi-\pi^*)$.³⁴ Como a transição $S_0 \rightarrow ^1(\pi-\pi^*)$ é altamente permitida elas possuem altos valores de ϵ devido a boa sobreposição dos orbitais moleculares. Além disso, nesses CMT o processo de ISC entre os estados $^1(\pi-\pi^*) \rightarrow ^3(\pi-\pi^*)$ é eficiente devido ao acoplamento spin-órbita induzido pelo átomo de metal de transição em conjunto com a pequena diferença de energia entre os orbitais S_1 e T_1 $\pi-\pi^*$. Os estados tripleto $^3(\pi-\pi^*)$ são caracterizados por tempos de vida mais longos em comparação com os estados $^3\text{MLCT}$. Dessa forma, essa classe de CMT apresenta

maior capacidade de absorção da luz visível e estados excitados tripleto de longa duração em relação aos CMT convencionais, aumentando assim as oportunidades para aplicações dos complexos como FsT.³⁴

Um exemplo de uma díade híbrida orgânica-inorgânica foi relatado por Dubey et al.⁶⁸ Eles adicionaram ao complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ um derivado do PDI substituído com dppz e com 4-terc-butilfenoxi nas posições 1,7-bay. A combinação resultou na díade $\text{PDI}-[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (11, FIGURA 1.11) com maior janela de absorção no visível, exibindo bandas de absorção de 300 a 600 nm e com maiores valores de ϵ ($50.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ em 550 nm) em comparação com o complexo referência $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (absorção entre 350 e 550 nm, $\epsilon \sim 21.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ em 450 nm). Além disso, o complexo $\text{PDI}-[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ mostrou a extensão do tempo de vida da fosforescência de 850 ns ($^3\text{MCLT}$) para $62 \mu\text{s}$ (^3PDI).

Diversos CMT com ligantes derivados do PDI apresentam estados excitados de separação de cargas (CS) intermediários.^{60,69-71} A aromaticidade dos PDIs confere alta afinidade eletrônica a essas moléculas tornando-os bons sistemas receptores de elétrons. Por outro lado, o centro metálico rico em elétrons atua como um eficiente doador de elétrons. Geralmente, esses estados de separação de cargas são caracterizados pelo par radical com o metal oxidado ($\text{M}^{n\bullet+}$) e o PDI reduzido ($\text{PDI}^{\bullet-}$).

Por exemplo, no complexo $\text{PDI}-[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tBuCN})_2\text{Cl}_2]$ (1m, FIGURA 1.11), após a excitação eletrônica da componente PDI, ocorreu uma rápida transferência de elétrons da componente Ru(II) para o ^1PDI ($\tau_{\text{ET}} < 150 \text{ fs}$), gerando o estado intermediário de CS $\{\text{Ru}(\text{III})-\text{PDI}^{\bullet-}\}$, seguido pela recombinação de cargas ($\tau_{\text{CR}} = 63 \text{ os}$) que após 63 ns resultou na população do estado ^3PDI caracterizado por um tempo de vida de $39 \mu\text{s}$.⁷²

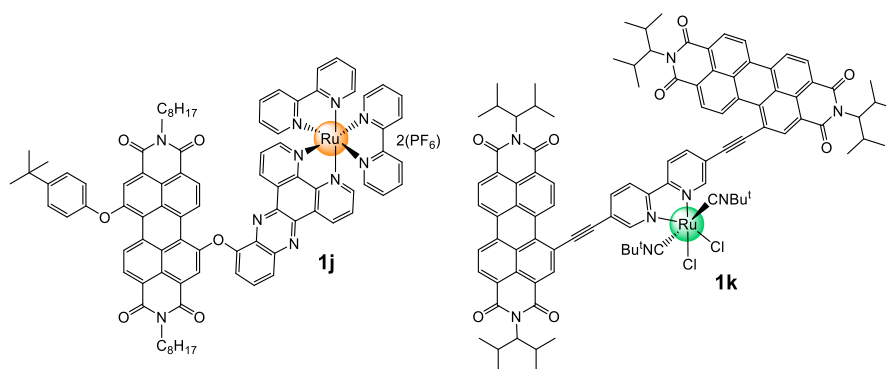


FIGURA 1.11 – Díades híbrido orgânica-inorgânica de complexos de metais de transição com ligantes derivatizados do PDI que populam o estado excitado $^3^*PDI$ de longa duração.^{68,72}

Com base neste cenário, nosso grupo de pesquisa preparou a díade doadora-receptora $[Ru(phen)_2(pPDIp)]^{2+}$ (FIGURA 1.12), composta pelos cromóforos $[Ru(phen)_3]^{2+}$ e PDI funcionalizado com fenantrolina nas posições imida (pPDIp).⁷³ A primeira propriedade importante resultante da combinação dos cromóforos foi o aumento da solubilidade da díade em solventes orgânicos e em solução aquosa em relação ao ligante livre pPDIp (solúvel somente em DMSO e DMF). As propriedades ópticas e dos estados excitados da díade também foram aprimoradas. Em acetonitrila a díade apresentou ampla absorção no visível (350-560 nm) com ϵ de $\sim 58.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e o espectro de absorção foi caracterizado pela somatória da absorção de ambas as componentes $\{Ru(II)(phen)_3\}$ e $\{pPDIp\}$, indicando um acoplamento fraco entre as duas componentes no estado fundamental. A luminescência de ambos os cromóforos foi preservada na díade, de modo que a excitação com comprimentos de onda abaixo de 500 nm, região onde a absorção da componente $\{Ru(II)(phen)_3\}$ predomina, a díade exibiu a fosforescência do estado $^3^*MLCT$ ($\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$, $\tau_{\text{ph}} > 500 \text{ ns}$), similar a fosforescência observada para o $^3^*MLCT$ do complexo referência $[Ru(phen)_3]^{2+}$. Por outro lado, a excitação com comprimentos de onda acima de 500 nm, região na qual somente a componente $\{pPDIp\}$ absorve, a díade exibiu a fluorescência

com estrutura vibrônica do estado $^1p\text{PDIp}$ ($\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$, $\tau_{\text{fl}} = 10 \text{ ps}$ e 3.5 ns), similar a fluorescência do ligante livre pPDIp.

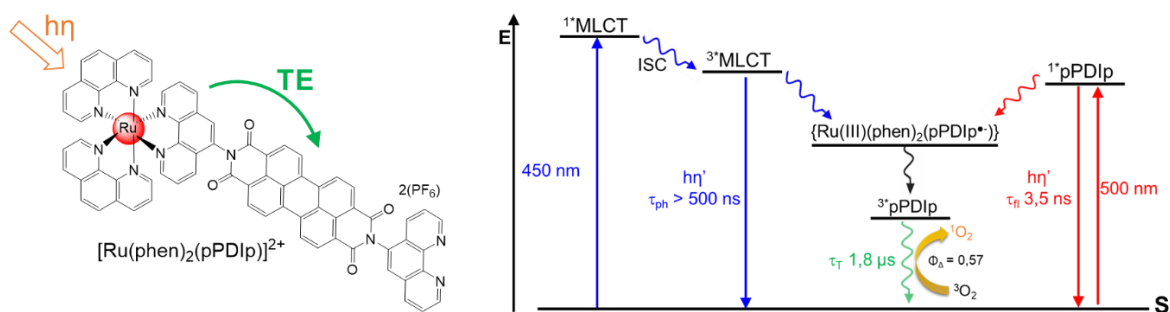


FIGURA 1.12 – Estrutura molecular e diagrama qualitativo dos processos fotofísicos da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$.

Além da população dos estados $^3\text{MLCT}$ e $^1p\text{PDIp}$, a combinação dos cromóforos na díade expandiu as propriedades dos estados excitados. A excitação de ambos os cromóforos resultou na formação do estado excitado intermediário de separação de cargas $\{(\text{Ru}(\text{III})(\text{phen})_2\text{pPDIp}^+)\}$ ($\tau_{\text{CS}} = 28 \text{ ps}$) através da transferência de elétrons da componente doadora $\{\text{Ru}(\text{II})(\text{phen})_3\}$ para o pPDIp receptor de elétrons. Em seguida, a recombinação de cargas levou a população do estado $^3p\text{PDIp}$ com tempo de vida de $1,8 \mu\text{s}$.⁷³ A partir do estado $^3p\text{PDIp}$ a díade gerou o $^1\text{O}_2$ através do processo de transferência de energia tripleto-tripletto, com um rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) de 57%.⁷³

Diferentes propriedades espectroscópicas foram observadas quando a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ foi avaliada em solução aquosa, devido a formação de agregados π - π .⁷⁴ A agregação induziu a inversão das intensidades das bandas de absorção 0-0 e 0-1 da componente pPDIp, a fluorescência do $^1p\text{PDIp}$ foi totalmente suprimida e somente a fosforescência da $^3\text{MLCT}$ foi observada. A agregação da díade em meio aquoso não impediu a geração de $^1\text{O}_2$.

A díade $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ demonstrou potencial para participar como intermediário em reações de transferência de elétrons química- e fotoinduzidas. Na presença de trietilamina (TEA), a díade foi reduzida gerando o ânion radical $\text{pPDIp}^{\cdot-}$ e a coloração da solução mudou de laranja para verde. Em seguida, a irradiação com luz de 420 nm resultou na formação do diânion pPDIp^{2-} e na mudança de cor para violeta. Os elétrons resultantes das reações de redução foram usados para reduzir o metilviologênio (MV^{2+}), permitindo a recuperação da mistura díade-TEA em um processo cíclico.⁷³

1.4 – Estados excitados tripleto: geração de oxigênio singleto e aplicações em terapia fotodinâmica

1.4.1 – Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)

O oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é o estado excitado de menor energia do oxigênio molecular (O_2). É uma das espécies reativas do oxigênio (EROs) e apresenta uma forte capacidade em oxidar diversas moléculas orgânicas, permitindo aplicações em diferentes áreas, incluindo o tratamento de águas residuais⁷⁵, degradação de poluentes orgânicos^{76,77}, síntese orgânica⁷⁸, fotocatalise⁷⁹, terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer^{80,81} e de infecções bacterianas^{82,83}, entre outras.⁸⁴

As propriedades e o comportamento do oxigênio refletem sua estrutura eletrônica única. Na FIGURA 1.13 está representado o diagrama de orbital molecular do O_2 no estado fundamental e dos respectivos estados eletrônicos excitados. A molécula de O_2 no estado fundamental é uma espécie tripleto e possui dois elétrons desemparelhados com a mesma multiplicidade de spin, sendo um elétron em cada orbital π -antiligante.³¹

A excitação eletrônica do $^3\text{O}_2$ resulta na inversão do spin do elétron e na população de dois estados excitados singletos denominados $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$. Esses estados diferem na posição dos elétrons nos orbitais antiligantes. O estado $^1\Sigma_g^+$ de maior energia (1,6 eV) possui os dois elétrons com spins opostos em dois orbitais antiligantes diferentes e decai rapidamente para o estado $^1\Delta_g$ através do processo de conversão interna. O estado $^1\Delta_g$ de menor energia (95 kJ.mol $^{-1}$), geralmente chamado de $^1\text{O}_2$, é caracterizado pelos dois elétrons emparelhados em apenas um orbital e pelo segundo orbital π^* vazio, o que torna essa molécula altamente instável e reativa. O $^1\text{O}_2$ pode retornar para o estado fundamental por emissão de luminescência (1270 nm) ou pode reagir com moléculas ricas em elétrons ao seu redor.^{31,85}

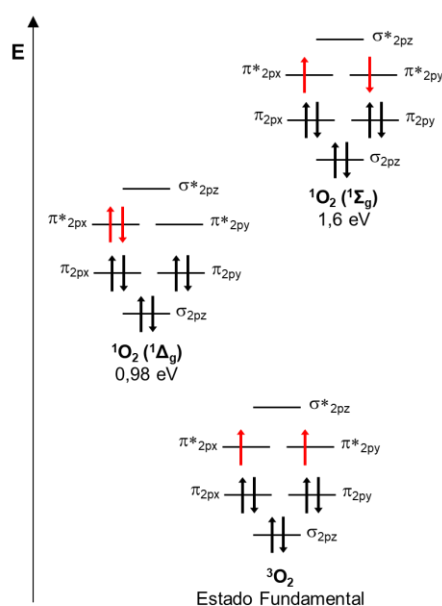


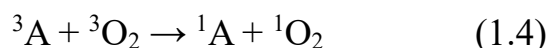
FIGURA 1.13 – Diagrama qualitativo dos orbitais moleculares com os respectivos níveis de energia e configurações eletrônicas do oxigênio molecular no estado fundamental e nos estados excitados $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g$.

Devido ao orbital π^* vazio o $^1\text{O}_2$ exibe uma alta reatividade com moléculas orgânicas ricas em elétrons como olefinas e compostos aromáticos policíclicos. A maioria das biomoléculas possui componentes insaturados que são

excelentes substratos para $^1\text{O}_2$, como por exemplo a guanina para DNA, ácidos graxos poliinsaturados, colesterol e vários aminoácidos, incluindo triptofano, tirosina, histidina, metionina e cisteína. As reações do $^1\text{O}_2$ com esses alvos biológicos podem desencadear danos irreversíveis e levar à morte celular.⁸⁶

O $^1\text{O}_2$ desempenha diversos papéis importantes nos sistemas biológicos e está associado aos mecanismos de defesa utilizados pelas células fagocitárias contra vírus e bactérias, oxidando moléculas e destruindo organismos possivelmente prejudiciais. Por outro lado, o $^1\text{O}_2$ pode levar à destruição de uma molécula, célula ou organismo e desencadear efeitos adversos em um sistema saudável e em bom funcionamento. Apesar dos organismos aeróbicos possuírem sistemas de defesas antioxidantes para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos, elevadas concentrações $^1\text{O}_2$ em um ambiente biológico podem induzir a uma sucessão de eventos moleculares e bioquímicos e causar a morte celular por mecanismos de apoptose ou necrose.^{85,87}

A geração do $^1\text{O}_2$ através da excitação direta do O_2 não é um processo usual devido a sua baixa absorção nas regiões espectrais do visível e do infravermelho-próximo (NIR). Uma maneira comum e conveniente de produzir $^1\text{O}_2$ é através da transferência de energia tripleto-tripletto. Nesse processo, uma molécula fotossensibilizadora absorve luz e a partir do estado tripleto, transfere sua energia de excitação para o estado fundamental do O_2 , produzindo o $^1\text{O}_2$ (Equação 1.4). Para que esse processo ocorra a energia do estado tripleto da molécula fotossensibilizadora deve ter energia superior ou igual a energia necessária para excitar o O_2 (0,98 eV).



O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ depende significativamente do ambiente e do solvente. Especificamente, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é de aproximadamente 67 μs em água deuterada mas apenas de $\sim 3,5$ μs em água. No meio biológico o tempo de vida é extremamente curto, cerca de 40 ns, limitando sua ação perto de seu local de geração.⁸⁸

A capacidade em gerar o $^1\text{O}_2$ foi relatada para alguns derivados do PDI representados na FIGURA 1.14. Por exemplo os compostos 1l e 1m com substituintes doadores de elétrons na posição 1,7-bay apresentaram um rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) 0,16 e 0,03, respectivamente, em clorofórmio.³⁷ O PDI substituído com um polímero conjugado na posição imida 1n demonstrou um Φ_Δ de 0,09 em metanol⁸⁹ enquanto no PDI com substituintes tetrafenil nas posições orto (1o) o Φ_Δ foi de 0,05 em diclorometano.⁹⁰

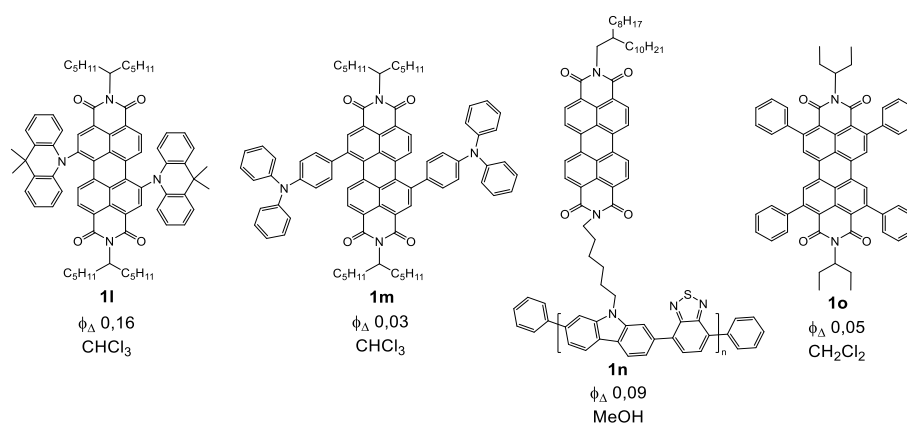


FIGURA 1.14 – Derivados do PDI que geram $^1\text{O}_2$, com os respectivos rendimentos quânticos de formação de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) em diferentes solventes.

A sensibilização do $^1\text{O}_2$ também foi observada para diversos CMT com ligantes derivados do PDI (FIGURA 1.15). Por exemplo, o complexo polipiridínico de Ru(II) 1p⁹¹ coordenado ao centro do anel do PDI, apresentou um Φ_Δ de 0,04 em tampão PBS após irradiação com luz de 420 nm e no complexo

com duas unidades de PDI $1q^{92}$ o Φ_{Δ} foi de 0,03 em DMSO. O complexo terpiridínico de Pt(II) com um ligante PDI $1r^{93}$ também gerou 1O_2 com um Φ_{Δ} de 0,91 em tolueno.

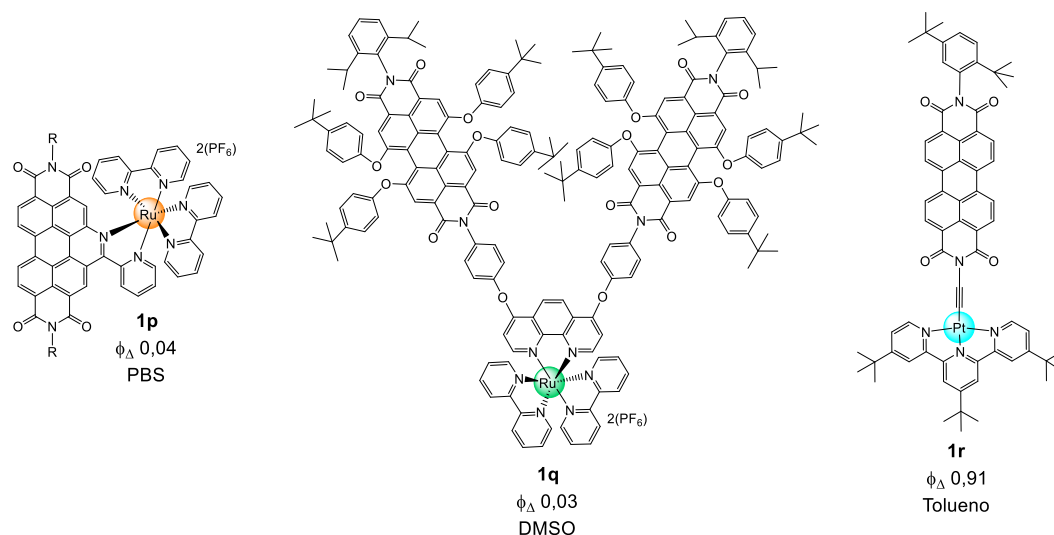


FIGURA 1.15 – Complexos de metais de transição com ligantes derivados do PDI que geram 1O_2 , com os respectivos Φ_{Δ} em diferentes solventes.

O efeito citotóxico do 1O_2 é atualmente utilizado na prática clínica em uma modalidade de tratamento denominada terapia fotodinâmica, na qual a produção controlada de 1O_2 leva à destruição das células ou dos tecidos alvos.

1.4.2 – Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica reconhecida que vêm demonstrando eficácia no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de cabeça e pescoço, pulmões, bexiga, câncer pele não melanoma e de carcinoma basocelular superficial e nodular. Também tem sido

aplicada com sucesso no tratamento de condições não cancerígenas e demonstrado eficácia na inibição de bactérias, vírus, fungos e parasitas.^{94,95} Neste caso, é denominada terapia fotodinâmica antimicrobiana (aTFD).

A TFD é baseada na interação entre um fármaco fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. Após a aplicação sistêmica ou tópica do fotossensibilizador, este é ativado por uma por uma fonte de luz com comprimento de onda específico. Como descrito anteriormente, os estados tripleto do FS são caracterizados por longos tempo de vida, possibilitando a reação com moléculas próximas. Na TFD o FS tripleto excitado reage com oxigênio molecular através de dois possíveis mecanismos (FIGURA 1.16). No mecanismo do Tipo I, o fotossensibilizador tripleto excitado transfere um elétron para uma molécula próxima, que pode ser um substrato biológico ou o oxigênio molecular gerando as espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No mecanismo do Tipo II fotossensibilizador transfere a energia de excitação para o oxigênio molecular gerando o 1O_2 . Ambos os processos resultam no acúmulo de EROs que gera estresse oxidativo, causando danos celulares irreversíveis e, por fim, na morte celular.⁹⁶

A TFD permite a destruição seletiva dos tumores devido a capacidade de direcionar e acumular o FS no tecido alvo e pela habilidade de ativá-lo por iluminação específica, fazendo com que as espécies citotóxicas sejam geradas somente na região onde a luz é aplicada, possibilitando um controle espacial e temporal do tratamento e minimizando danos nos tecidos adjacentes saudáveis. Em relação ao tratamento com antibióticos, a TFD possui duas vantagens principais: não induz resistência microbiana e reduz a necessidade de drogas sistêmicas.

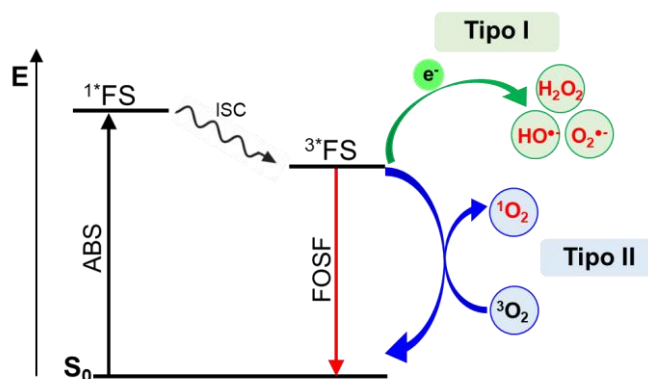


FIGURA 1.16 – Diagrama qualitativo do mecanismo fotofísico com representando as reações de um fotossensibilizador que ocorrem na terapia fotodinâmica.

Um fotossensibilizador ideal para aplicações em TFD deve ter alta capacidade de geração de oxigênio singleto, bandas de absorção dentro da janela fototerapêutica (750 – 800 nm) onde não ocorre a absorção da luz pelas biomoléculas e a penetração da luz no tecido é maior. Além disso, deve apresentar alta fotoestabilidade, mínima toxicidade no escuro, biocompatibilidade e capacidade de acumulação no tecido alvo.⁹⁷

A maior parte dos fotossensibilizadores aprovados para uso clínico consistem em moléculas orgânicas, como por exemplo o Photofrin[®], o Levulan[®] e o Foscan[®] e são usados para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de esôfago, pulmão, cabeça e pescoço, carcinomas basocelular e espinocelular.^{96,98} A maioria desses compostos apresentam uma estrutura geral de anel tetrapirrólico (FIGURA 1.17) e são porfirinas, clorinas e ftalocianinas. Devido a essa característica estrutural compartilhada, a maioria desses fotossensibilizadores possuem desvantagens semelhantes, como a baixa solubilidade em água, baixa fotoestabilidade e uma lenta eliminação do corpo de forma que permanecem presentes no corpo até muito tempo depois do tratamento.⁹⁹

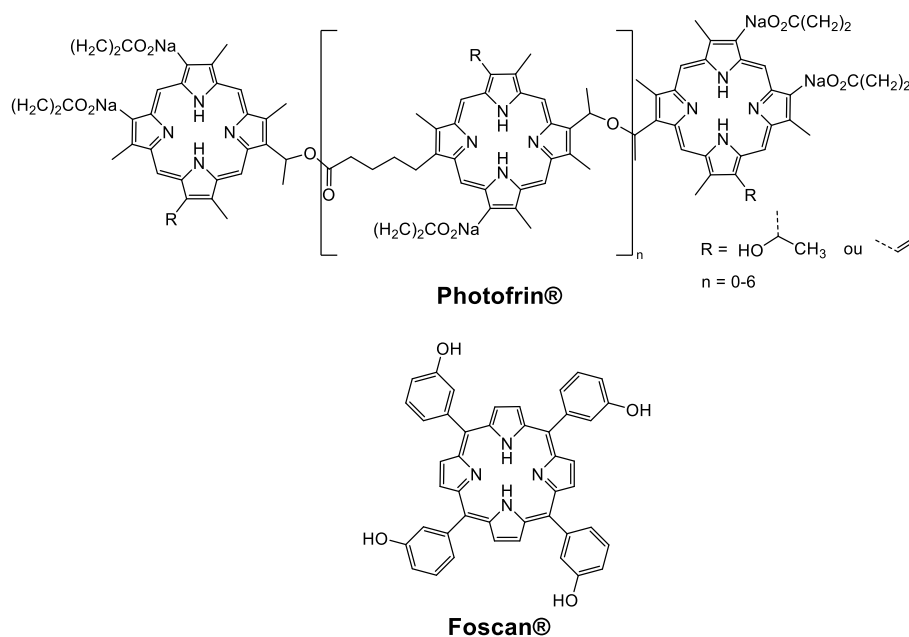


FIGURA 1.17 – Estruturas química dos fotossensibilizadores orgânicos aprovados clinicamente para o tratamento de câncer.

O desenvolvimento de fotossensibilizadores de complexos de coordenação de metais de transição vêm sendo utilizado como uma estratégia eficiente para superar as desvantagens dos fotossensibilizadores orgânicos. As propriedades estruturais e eletrônicas dos CMT podem ser ajustadas de acordo com a escolha criteriosa dos ligantes e dos metais. Essa versatilidade dos CMT oferece vantagens como uma ampla gama de estados de oxidação, números de coordenação e geometrias, produzindo um amplo espaço estrutural e químico a ser explorado.

A FIGURA 1.18 demonstra os complexos de Pd(II), Al(III) e Ru(II) que foram aprovados clinicamente ou estão em fase de ensaios clínicos para o tratamento de câncer através da TFD.⁹⁹ O Photosens[®] é uma ftalocianina de alumínio tetrasulfonada aprovada clinicamente na Rússia para o tratamento de câncer de pulmão, fígado, mama, pele e gastrointestinal. O TOOKAD[®] é um

complexo de Pd(II) coordenado a uma bacterioclorofila α , um pigmento fotossintético presente em bactérias fototróficas, e seu efeito fotocitotóxico está associado principalmente a geração dos radicais superóxido ou hidroxila. Atualmente é aprovado clinicamente no México, Israel e em diversos países da União Europeia para o tratamento de câncer de próstata.⁹⁹

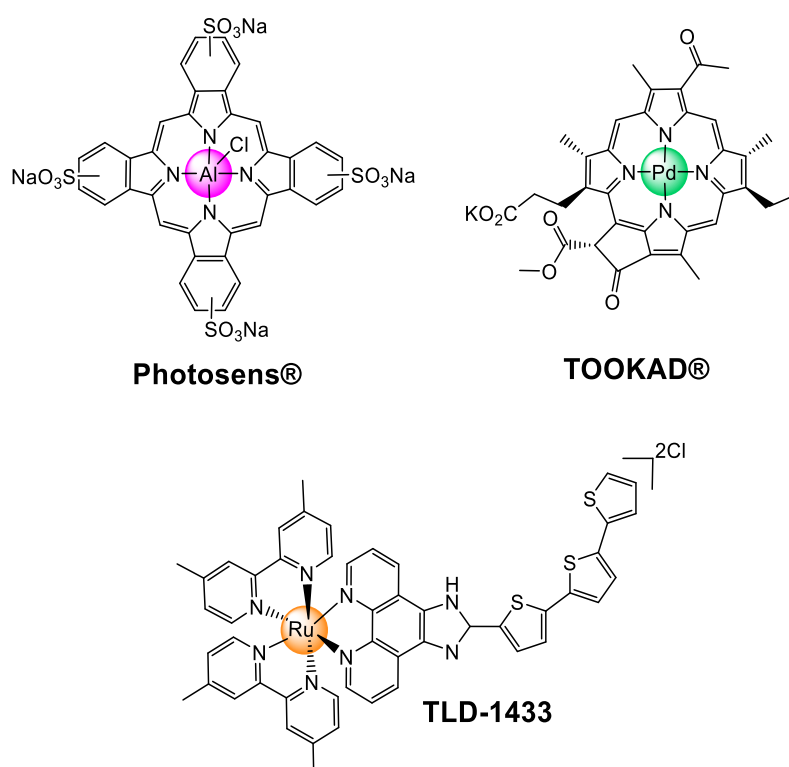


FIGURA 1.18 – Fotossensibilizadores de complexos de metais de transição que foram aprovados clinicamente ou estão em fase de ensaios clínicos para o tratamento de câncer através da TFD.

O TLD-1433 foi o primeiro fotossensibilizador de Ru(II) a entrar em ensaios clínicos e está atualmente em estudos de Fase II nos EUA e no Canadá para o tratamento de câncer de bexiga não-músculo invasivo.¹⁰⁰ O TLD-1433 é um complexo polipiridínico de Ru(II) que pode ser classificado como uma díade orgânica-inorgânica. Sua estrutura molecular é composta por um centro metálico que facilita a população dos estados excitados tripleto e pelo grupo orgânico α -

tertienil que proporciona um estado excitado tripleto intraligante ($^3^*IL$) com longo tempo vida e alta sensibilidade ao oxigênio.¹⁰¹

De acordo com McFarland e colaboradores, o estado $^3^*IL$ do TLD-1433 possui duas configurações possíveis (FIGURA 1.19): um estado $^3^*IL$ com caráter $\pi-\pi^*$ responsável pela sensibilização do 1O_2 e um estado $^3^*ILCT$ que pode participar de reações de transferência de elétrons com o oxigênio (ou substratos biológicos). O estado $^3^*ILCT$ é preenchido indiretamente a partir do decaimento do estado $^1^*MLCT$ formado após absorção da luz verde, enquanto o estado $^3^*IL$ é populado diretamente após a absorção da luz vermelha. Os efeitos PDT obtidos com luz verde são mais potentes do que aqueles com luz vermelha devido aos coeficientes de extinção molar mais baixos de TLD-1433 nos comprimentos de onda vermelhos.¹⁰² Assim, este fotossensibilizador pode gerar 1O_2 com quase 100% de eficiência, mas tem a capacidade de atuar através do mecanismo Tipo I em ambientes hipóxicos.

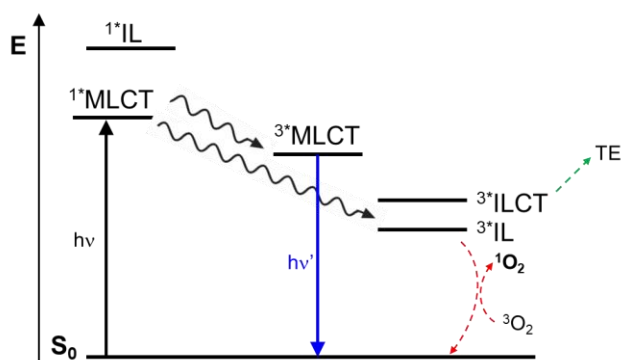


FIGURA 1.19 - Diagrama de energia qualitativo dos processos fotofísicos do fotossensibilizador TLD-1433. Figura adaptada da referência Monro et al. (2019).¹⁰²

Complexos polipiridínicos de Ru(II) vem sendo extensivamente estudados para aplicações biológicas devido as suas propriedades fotofísicas e

fotoquímicas.^{103–105} Como descrito anteriormente, são complexos cineticamente estáveis e termodinamicamente inertes; conseqüentemente, a dissociação do ligante e a toxicidade devido à liberação de metais pesados no meio biológico são limitadas. A inércia desses complexos para a dissociação do ligante nos estados fundamental e excitado permite a investigação de reações de transferência de elétrons intra e intermoleculares sem interferência da troca de ligante. Além disso, as propriedades ópticas desses complexos em relação às aplicações biológicas se beneficiam de um grande deslocamento de Stokes, que impede a auto supressão da luminescência, e de longos tempos de vida de emissão, que permitem imagens diretas de meios biológicos sem interferência da fluorescência de biomoléculas.¹⁰⁶ Diversos estudos vêm demonstrando aplicações dos complexos polipiridínicos de Ru(II) como fotossensibilizadores para a TFD para o tratamento de diversos tipos de câncer¹⁰⁷ e inativação bacteriana.^{108–110}

O desenvolvimento de materiais híbridos multifuncionais para obter simultaneamente um agente para diagnóstico e para tratamento eficaz do câncer, possibilitando de imagens de fluorescência e terapia fotodinâmica tem recebido muito interesse nos últimos anos.^{111–113} Essa combinação pode permitir a diferenciação precisa entre o tecido alvo e os tecidos saudáveis, possibilitando uma terapia guiada por imagem.

Os complexos de Ru(II) vêm sendo reconhecidos como potenciais biossensores para imagens celulares devido as suas excelentes propriedades fotofísicas, incluindo grandes deslocamentos de Stokes (>100 nm), estados excitados com longos tempos de vida e sensível ao ambiente. Além disso, esses complexos podem interagir de forma seletiva com diferentes biomoléculas, incluindo mitocôndria, retículo endoplasmático e o DNA.¹¹⁴

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo complexos polipiridínicos de Ru(II) para aplicações como sondas luminescentes para monitorar os processos de agregação de proteínas amiloides,^{115–117} inibidores

enzimáticos,^{118,119} agentes teranósticos para imagem celular e atividade antitumoral,^{120,121} fotossensibilizadores para aplicações em TFD no tratamento de câncer de pele melanoma⁷⁴ e como fungicida.¹²²

Recentemente nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ para atuar como FsT em terapia fotodinâmica no tratamento de câncer de pele melanoma e como fungicida. Experimentos *in vitro* com a linhagem celular de melanoma murino B16F10-Nex2 mostraram que a díade no escuro não apresentou citotoxicidade em concentrações até $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. No entanto, após ao tratamento com luz, a díade exibiu efeito fotocitotóxico significativo, com valores de IC_{50} de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sob irradiação com luz de 518 nm (dose = $0,41 \text{ J.cm}^{-2}$) e de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz de 420 nm (dose = $0,58 \text{ J.cm}^{-2}$).⁷⁴ Além disso, a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ também apresentou efeito significativo na inibição dos fungos *C. albicans* e *S. brasiliensis*, a qual na concentração de $0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ associada ao tratamento com luz de 518 nm (dose = $6,3 \text{ J.cm}^{-2}$) resultou em 100% de inibição do crescimento dessas espécies.¹²² Apesar desses resultados promissores, as aplicações fotoquímicas da díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ são limitadas devido a região de absorção entre 350-650 nm, abaixo da janela fototerapêutica (750 – 800 nm) ideal para aplicações em TFD.

Nesse sentido, como descrito na Seção 1.1, a adição de substituintes doadores de elétrons na posição bay do PDI tem sido utilizada como alternativa para modificar as propriedades ópticas e eletroquímicas desses cromóforos. Lucas et al. relataram que a substituição na posição 1,7-bay de compostos PDI por grupos doadores de elétrons, como a pirrolidina (Py), resultou em uma mudança na absorção e emissão para a região NIR.¹²³ Por exemplo, a 1,7-bis(pirrolidin-1-il)-3,4:9,10-perileno-bis(dicarboximida) exibiu uma intensa absorção em 686 nm ($\epsilon = 46.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) em tolueno e uma fluorescência em 721 nm ($\Phi_{\text{fl}} = 0,65$, $\tau_{\text{fl}} = 4,5 \text{ ns}$) atribuída ao estado singlete excitado (S_1) com caráter de transferência

de carga (CT). Embora esses derivados de PDI-pirrolidina mostrem excelentes propriedades de captação de luz na região do NIR, eles não são capazes de preencher o estado excitado tripleto de perileno diimida de longa duração. Portanto, diferentes estratégias têm sido utilizadas para atingir o estado 3PDI .^{25,124}

Este projeto de pesquisa estendeu o trabalho anterior sobre a díade $[Ru(phen)_2(pPDIp)]^{2+}$ desenvolvendo uma nova díade Ru(II)-perileno na qual a componente pPDIp foi modificada adicionando a pirrolidina como substituinte nas posições 1,7-bay do anel aromático com o objetivo de deslocar a absorção e a emissão da díade para a região do NIR e otimizar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas obtidas para a díade de referência $[Ru(phen)_2(pPDIp)]^{2+}$.

Neste trabalho sintetizamos e caracterizamos o novo ligante PDI-Py e a nova díade $[Ru(phen)_2(PDI-Py)]^{2+}$ (RuPDI-Py) onde phen = 1,10-fenantrolina e PDI-Py = perileno funcionalizado com pirrolidina nas posições 1,7-bay e com 1,10-fenantrolina nas posições imida (FIGURA 1.20). As propriedades fotofísicas e fotoquímicas da díade RuPDI-Py e dos compostos de referência foram avaliadas em DMSO e em água, utilizando técnicas espectroscópicas do estado estacionário e resolvidas no tempo. A eficiência de formação do 1O_2 e das espécies reativas de oxigênio também foi avaliada, bem como o potencial para aplicação com fotossensibilizador em terapia fotodinâmica no tratamento de câncer de pele melanoma e antimicrobiana. Além disso, para conseguir um controle espacial e temporal e uma fácil remoção da díade após a ação fotodinâmica, preparamos nanofibras polimérica funcionalizada com a díade RuPDI-Py visando o desenvolvimento de um material para atuar como um adesivo para o tratamento de lesões tópicas, permitindo um tratamento altamente seletivo e econômico podendo ser aplicado diretamente nas áreas tumorais e serem ativados por luz de diferentes comprimentos de onda através de um procedimento não invasivo.

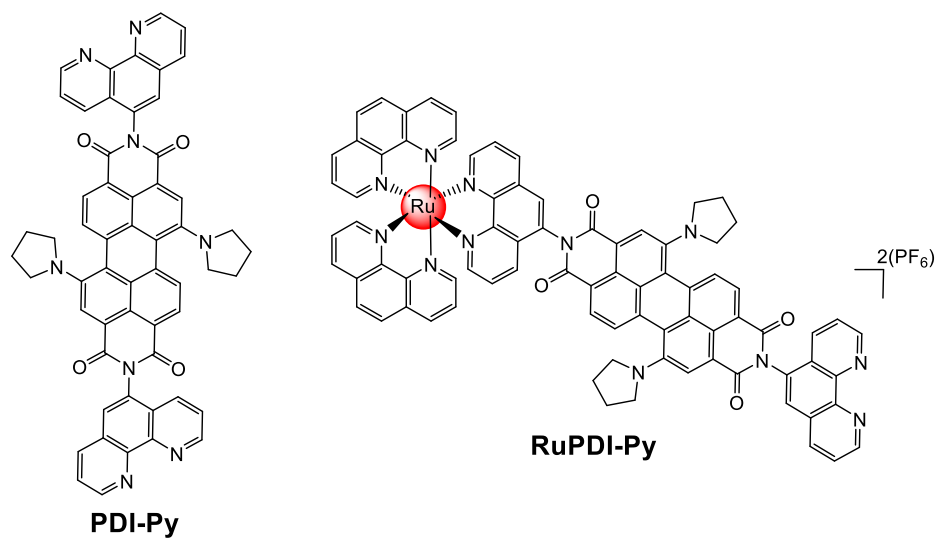


FIGURA 1.20 - Estruturas moleculares do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py.

2 – Objetivos

2.1 – Geral

Obter um fotossensibilizador polipiridínico de Ru(II)-perileno diimida apresentando propriedades espectroscópicas apropriadas para atuar em terapia fotodinâmica e em particular no tratamento tópico de câncer de pele melanoma.

2.2 – Específicos

A. Síntese e caracterização do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py.

- Sintetizar e caracterizar os compostos propostos utilizando as técnicas de RMN de ^1H , ^{13}C e 2D (COSY, HMBC e HSQC) e espectrometria de Massas (UHPLC-QToF-MS/MS).

B. Avaliar as propriedades eletroquímicas, fotofísicas e fotoquímicas do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py.

- Avaliar as propriedades fotofísicas dos compostos propostos utilizando técnicas espectroscópicas estacionárias (UV-vis, Luminescência) e resolvidas no tempo (espectroscopia de absorção transiente) em solventes orgânicos e em solução aquosa.

- Avaliar a estabilidade química e fotoquímica em solventes orgânicos e em solução aquosa.

C. Ativação do oxigênio singleto e/ou suas espécies reativas (EROs)

- Investigar a capacidade do compostos propostos em atuar como fotossensibilizadores para a ativação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e/ou das demais EROs ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot-}$) pela irradiação com luz azul e vermelha.

- Quantificar o $^1\text{O}_2$ e as EROs geradas através da fotossensibilização dos compostos propostos utilizando a técnica EPR com armadilhas de spins (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol e DMPO).

D. Desenvolvimento de filmes poliméricos para aplicações com potenciais adesivos para o tratamento tópico de câncer de pele

- Imobilizar a díade proposta em filmes poliméricos. Caracterizar os filmes utilizando as técnicas espectroscópicas de UV-vis, luminescência e microscopia eletrônica de varredura .

- Investigar a capacidade do do filme polimérico modificado com a díade em gerar $^1\text{O}_2$ e/ou as EROs pela irradiação com luz azul e vermelha.

E. Aplicação teranóstica do fotossensibilizador proposto.

- Investigar *in vitro* a citotoxicidade no escuro e a fotocitotoxicidade da díade RuPDI-Py em solução e imobilizada no filme polimérico em células de melanoma humano e em células saudáveis.

- Avaliar a absorção e localização do fotossensibilizador em células de melanoma humano utilizando a técnica de Microscopia Confocal e/ou FLIM.

3 – Materiais e métodos

3.1 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados nas sínteses dos compostos propostos neste projeto de pesquisa foram de procedência Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados nas sínteses dos compostos e nos estudos espectroscópicos foram de grau de pureza HPLC. A purificação dos compostos foi realizada por cromatografia em coluna (sílica-gel, alto grau de pureza, tamanho do poro de 60 Å, tamanho das partículas de 40-63 µm) de procedência Sigma-Aldrich. O complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ e o padrão $[\text{Os}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ utilizados nos ensaios espectroscópicos foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vincenzo Balzani (Università di Bologna – Itália)

Nos ensaios de EPR foram utilizadas as armadilhas de spins 2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) (Sigma-Aldrich) e 5,5-Dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) (Sigma-Aldrich) e o padrão 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina *N*-óxil (TEMPOL) (Sigma-Aldrich).

Nos ensaios biológicos para o cultivo celular da linhagem MDA-MB-435 utilizou-se meio Leibovitz-L15 (Vitrocell) suplementado com glutamina, vermelho de fenol, piruvato de sódio, galactose e 10% de soro fetal bovino. Para os estudos de terapia fotodinâmica utilizou-se o meio Leibovitz-L15 (Vitrocell) sem o vermelho de fenol. Para os ensaios de viabilidade celular utilizou-se o reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os compostos $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ e azul de metileno utilizados como referência nos ensaios biológicos são de procedência Sigma-Aldrich.

Para os ensaios microbiológicos, o LB-ágar e meio LB Broth (Lennox) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os fosfolípidios 1-palmitoil-2-oleoil-

glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DOPG) utilizados na preparação das membranas modelos foram fornecidos pela Avanti Polar Lipids. A sacarose e a glicose utilizadas na preparação das GUVs são de procedência Sigma-Aldrich. Para a preparação das nanofibras poliméricas, utilizou-se o polímero poliácridonitrila (PAN, $M_w = 150.000$) adquirido da Sigma-Aldrich.

3.2 – Sínteses

3.2.1 – Síntese do precursor 1,7-dibromoperileno-3,4,9,10-tetracarboxílico dianidrido (2)

Uma mistura de Perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico dianidrido (1) (4,0 g, 10,2 mmol) em ácido sulfúrico (98%, 60 mL) foi mantida sob agitação e em temperatura ambiente durante 20 h. Adicionou-se iodo (I_2 , 39 mg, 0,16 mmol) como catalisador e a mistura foi aquecida à 85 °C (em banho de silicone) e mantida sob agitação durante 3 h. Em seguida, o bromo (Br_2 , 2 mL, 39 mmol) foi adicionado gota a gota durante 4 h. A reação foi mantida a 80 °C sob agitação por 16 h. Após esse período, ao atingir temperatura ambiente, o excesso de Br_2 foi retirado borbulhado um fluxo de N_2 na mistura reacional durante 30 min. O produto da reação foi precipitado pela adição lenta de 40 mL água destilada gelada. O sólido resultante foi separado por filtração a vácuo, lavado com 1 L de água destilada (para neutralizar o pH) e com 600 mL de metanol e seco a vácuo. O produto obtido foi um sólido vermelho (5,55 g, rendimento de 99%), no entanto o produto não pode ser purificado, uma vez que é insolúvel em solventes orgânicos.

3.2.2 – Síntese do precursor *N,N'*-Dicicloexil-1,7-dibromoperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (3)

Uma suspensão de 1,7-dibromoperileno-3,4,9,10-tetracarboxílico dianidrido (**2**) (0,95 g, 1,72 mmol), ciclo-hexilamina (0,58 mL, 5,07 mmol) e ácido acético (0,48 mL, 8,83 mmol) em 20 mL de 1-metil-2-pirrolidona foi mantida a 85 °C, sob agitação e atmosfera de nitrogênio por 15 h. Após esse período, ao atingir temperatura ambiente, o precipitado foi separado por filtração gravimétrica e lavado com 200 mL de metanol. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel) utilizando diclorometano como eluente. A primeira banda foi coletada e após a rotaevaporação do solvente foi obtido um sólido vermelho (0,619 g, 50%).

3.2.3 – Síntese do precursor *N,N'*-Dicicloexil-1,7-dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (4)

Uma mistura de *N,N'*-Dicicloexil-1,7-dibromoperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (**3**) (0,095 g, 0,133 mmol) e pirrolidina (5 mL, 59,7 mmol) foi mantida a 60 °C, sob agitação e atmosfera de nitrogênio por 24 h. Após esse período, ao atingir temperatura ambiente a mistura reacional foi vertida em 20 mL de HCl (10%) sob agitação constante. Em seguida, o produto foi extraído com diclorometano (3 x 20 mL) e a fase orgânica foi recolhida, seca com MgSO₄ e concentrada por rotaevaporação. O precipitado foi purificado por coluna de cromatografia de sílica gel utilizando como eluente CH₂Cl/Hexano (2,5% Hexano, v/v). O produto obtido foi um sólido verde escuro (37 mg, rendimento de 40%).

3.2.4 – Síntese do precursor 1,7-Dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico dianidrido (5)

Uma mistura de *N,N'*-Dicicloexil-1,7-dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (4) (0,1 g, 0,15 mmol), KOH (0,6 g, 10 mmol) e 5 mL de isopropanol foi mantida sob refluxo por 2 h. Após esse período, ao atingir temperatura ambiente, 17 mL de ácido acético foi vertido na mistura reacional sob agitação. O sólido verde foi concentrado por rotaevaporação, lavado com 300 mL de água destilada e 80 mL de metanol e purificado por recristalização com tetracloreto de carbono e acetato de etila. A massa final obtida foi de 72 mg (95 %).

3.2.5 – Síntese do ligante *N*-1,10-fenantrolina-1,7-dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico diimida (PDI-Py)

Uma mistura de 0,188 mmol (0,1 g) de 1,7-Dipirrolidinilperileno-3,4:9,10-ácido tetracarboxílico dianidrido (5) e 0,424 mmol (0,083 g) de 1,10-fenantrolina-5-amino foi dissolvida em 3 mL de piridina previamente destilada e em 3 g de imidazol. A mistura foi mantida sob refluxo a 120 °C, agitação constante e atmosfera de nitrogênio por 24 h. Após atingir temperatura ambiente foram adicionados lentamente 25 mL de solução aquosa de HCl 15% para precipitação. O precipitado verde foi separado por filtração gravimétrica e lavado com 300 mL de água destilada e seco a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente o gradiente de polaridade CH₂Cl/MeOH (CH₂Cl:MeOH= 99:1; 95:5; 90:10 e 85:15, v/v). O produto obtido foi um sólido verde escuro (113 mg , 68%).

3.2.6 – Síntese do complexo precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

O complexo precursor [Ru(phen)₂Cl₂] foi preparado a partir de 0,765 mmol de RuCl₃.3H₂O (200 mg), 1,6 mmol de 1,10-fenantrolina (289,5 mg) e 5,44 mmol de LiCl (230 mg) dissolvidos em 15 mL de DMF previamente desaerado. O sistema permaneceu sob refluxo, agitação constante e atmosfera de nitrogênio por 8 h. Após este período, ao atingir temperatura ambiente, adicionou-se 150 mL de acetona gelada previamente destilada. A mistura foi mantida sob refrigeração durante 12 h para completa precipitação. O precipitado foi separado por filtração a vácuo, lavado com água destilada suficiente para o filtrado ficar incolor e 20 mL de éter. O complexo de coloração roxa foi seco a vácuo e o rendimento da reação foi de 30% (120 mg).

3.2.7 – Síntese da díade [Ru(phen)₂(PDI-Py)](PF₆)₂ (RuPDI-Py)

A díade [Ru(phen)₂(PDI-Py)](PF₆)₂ foi sintetizada a partir de 0,067 mmol (36 mg) do precursor [RuCl₂(phen)₂] e 0,1 mmol (89 mg) do ligante PDI-Py, dissolvidos em 7 mL de DMF previamente destilado. O sistema foi mantido sob refluxo, agitação contínua e atmosfera de nitrogênio por 24 h. Após este período, ao atingir temperatura ambiente, adicionou-se 0,134 mmol (22 mg) do contra-íon hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆) e 20 mL de éter para precipitação. A mistura reacional foi mantida sob refrigeração por 4 h para completa precipitação e, em seguida, o precipitado foi filtrado por filtração gravimétrica, lavado com água destilada gelada e éter e seco a vácuo. O sólido obtido foi purificado por sucessivas recristalizações em acetona/éter. Por fim, obteve-se um sólido cerde escuro (63 mg) com rendimento de 67%.

3.3 – Equipamentos e metodologias

3.3.1 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DXR 400 MHz e 600 MHz pertencentes ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.2 – Espectrometria de Massas UHPLC-QToF-MS/MS

As análises por UHPLC-QToF-MS/MS foram realizadas usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, sendo empregado os seguintes parâmetros para a ionização: tipo de ionização = ESI+, Gás Temp. = 320 °C, Gás Flow = 12 (L.min⁻¹), Nebulizer 35 Psi, Sheath Gás Temp. = 300 °C, Sheath Gás Flow = 10 (L.min⁻¹), VCap = 3800, Nozzle Voltage = 700 V, Fragmentor = 150, Skimmer = 65, OctopoleRFPeak = 750.

As amostras foram solubilizadas em 1000 µL de acetonitrila ou metanol (grau LC-MS) e posteriormente diluídas para as concentrações de 10 ppm e 5 ppm. Para estas análises foram realizadas uma infusão direta, utilizando como fase móvel água (solvente A, 0,1 % de ácido fórmico) e acetonitrila ou metanol (solvente C com 0,1 % de ácido fórmico), no modo isocrático e na proporção de

05:95 v/v respectivamente. A vazão da fase móvel foi de 0,300 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 5 µL.

O erro (em ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS adquirido monitorando uma faixa entre 150 a 1500 Da e posteriormente a faixa de 400 a 800 Da, com uma taxa de varredura de 3 espectros.s⁻¹ e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00.

3.3.3 – Espectroscopia de UV-vis

Os espectros de absorção eletrônica na região UV-vis foram obtidos utilizando os espectrofotômetros Agilent 8453A e Perkin Elmer λ40. Foram utilizadas celas de quartzo com caminhos ópticos de 10 mm e volume 3,5 mL e de 50 mm e volume 7 mL.

3.3.4 – Propriedades Eletroquímicas

Os estudos eletroquímicos foram realizados usando um potenciostato EcoChemie Autolab 30. As medidas de voltametria cíclica e pulso diferencial foram realizadas em soluções de benzonitrila ou de acetonitrila. As amostras foram preparadas a uma concentração de 1 mM com 0,1 M de TBAPF₆ como eletrólito suporte, à temperatura ambiente e em atmosfera de nitrogênio. A célula eletroquímica era composta pelo eletrodo de trabalho de carbono vítreo (0,08 cm²), o contraeletrodo foi uma espiral de Pt e um fio de prata foi empregado como eletrodo de quase-referência (AgQRE). Os potenciais relatados são referidos ao

SCE medindo o potencial AgQRE em relação ao ferroceno ($E_{1/2} = +0,43$ V vs SCE em benzonitrila e $+0,40$ V vs SCE em MeCN para Fc^+/Fc^{125}).

Os experimentos de espectroeletrólise foram realizados em uma cela de eletrodo opticamente transparente constituída por duas janelas de quartzo, um conjunto de três eletrodos fundido selado em um espaçador de polietileno. Os três eletrodos são: dois *minigrids* de Pt (32 fios/cm) como eletrodos de trabalho e contraeletrodos e um fio de prata como eletrodo quase-referência, posicionado bem próximo ao eletrodo de trabalho para minimizar a resistência ôhmica. A cela tem um arranjo do tipo sanduíche. A luz passa através da parte central do eletrodo de trabalho *minigrind* (80% de transmitância) e o caminho da óptico é da ordem de 100–200 μm . A difusão das espécies eletrogeradas entre os eletrodos é insignificante na escala de tempo experimental (10-50 s). A solução utilizada para experimentos espectroeletrólise foi preparada conforme descrito anteriormente para voltametria cíclica. Para localizar a janela de potencial correta correspondente ao processo redox de interesse, uma voltametria cíclica foi registrada a 5 mV/s antes da espectroeletrólise. Depois de reabastecer a cela com uma solução nova, o potencial de eletrólise foi variado entre os potenciais de -0,8 a +1,4 V e os espectros de absorção UV–Vis–NIR foram registrados com um espectrofotômetro Agilent Technologies 8543.

3.3.5 – Espectroscopia de Luminescência do estado estacionário

Os espectros de emissão e excitação foram obtidos nos espectrofluorímetros Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e fotomultiplicadora do tipo R928) e Edinburgh FLS920 equipado com a fotomultiplicadora Hamamatsu R928). As medidas foram

realizadas utilizando celas de quartzo de quatro lados de caminho óptico 10 mm e volume 3,5 mL. As soluções desaeradas foram preparadas em uma linha de vácuo de Schlenk por ciclos repetidos de *pump-freeze-thaw* ($\sim 4 \times 10^{-6}$ mbar) usando cubetas de quartzo seladas. As medidas de luminescência a 77 K foram realizadas em matriz de butironitrila preparadas em tubos de quartzo. O rendimento quântico de emissão do ligante PDI-Py foi calculado utilizando o padrão $[\text{Os}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ em acetonitrila ($\Phi_{\text{ph}} = 0,005$).

3.3.6 – Tempo de vida de emissão

Os tempos de vida de emissão foram medidos com um espectrofluorímetro Edinburgh FLS920 usando a técnica de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC). Os comprimentos de onda de excitação selecionados foram de 405 nm e 640 nm.

3.3.7 – Espectroscopia de absorção transiente de femtossegundos

Os experimentos de absorção transiente de femtossegundos foram realizados no Institute of Organic Synthesis and Photoreactivity (ISOF)-Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Itália, em colaboração com a Dra. Barbara Ventura.

Os espectros de absorção transiente foram medidos com o espectrômetro Ultrafast Systems HELIOS (HE-VIS-NIR) utilizando como fonte de excitação um sistema de laser Newport Spectra Physics Solstice-F-1K-230 V, combinado com um amplificador paramétrico óptico TOPAS Prime (TPR-

TOPAS-F) (duração de pulso de 100 fs, taxa de repetição de 1 kHz e comprimentos de onda de saída de 450 e 720 nm). O sistema Solstice era composto por um oscilador de femtosegundo Mai Tai HP Ti:Sa sintonizável (690-1040 nm) bombeado por um laser Nd:YVO4 (Millennia), amplificador regenerativo Ti:Sa bombeado por um diodo duplo intracavitário Q-switched laser pulsado Nd:YLF (Empower 30), extensor de pulso óptico e compressor de pulso óptico. A resolução temporal geral do sistema foi de 300 fs. Os experimentos foram realizados usando celas de quartzo de caminho óptico de 0,2 cm (absorbância em 450 e 720 nm = 0,2), em solução de DMSO, na presença de ar e sob agitação constante. Para reduzir a fotodegradação, a energia de bombeamento da amostra foi reduzida para 6 μ J/pulso. O software Surface Xplorer V4 da Ultrafast Systems foi usado para aquisição e análise de dados. As superfícies de dados 3D foram corrigidas para o chirp do pulso da sonda antes da análise.

3.3.8 – Espectroscopia de absorção transiente de nanossegundos

Os experimentos de absorção transiente de nanossegundos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof. Dra. Paola Ceroni, na Università di Bologna, Itália.

Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente em soluções desaeradas de DMSO ou água em uma cela de quartzo de 10 mm x 10 mm. As concentrações foram ajustadas para uma absorbância de 0,2 no comprimento de onda de excitação (355 nm). As amostras foram excitadas pelo 3º harmônico ($\lambda_{exc} = 355$ nm, pulsos únicos de 10 ns de duração e 40 mJ/pulso) do laser Continuum Surelite SLI-10 Nd:YAG. Uma lâmpada de Xe perpendicular ao feixe de laser foi usada como sinal de referência e o sinal foi detectado por um

fotodiodo sensível ao vermelho após passar por um monocromador de alta radiância Os espectros de absorção transiente foram obtidos a partir dos decaimentos medidos em vários comprimentos de onda (intervalo de 2 nm na região de 360 a 650 nm) e 16 tiros de laser individuais foram utilizados para melhorar a confiabilidade de cada aquisição. As análises cinéticas foram realizadas com procedimentos de ajuste de mínimos quadrados usando o software OriginLab.

3.3.9 – Determinação das espécies reativas de oxigênio geradas em solução

3.3.9.1 – Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram realizados junto ao grupo do Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento no Instituto de Física São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) e ao grupo do Prof. Dr. Petr Neugebauer em colaboração com Dr. Vinicius Tadeu Santana no Central European Institute of Technology (CEITEC) em Brno, República Tcheca.

No IFSC/USP o espectrômetro utilizado foi o Varian E109 operando em banda X (9.5 GHz) a temperatura ambiente e as condições experimentais foram: 0,25 G de modulação, 20 mW de potência, constante de tempo de 0,128 s, 16 scans. No CEITEC os experimentos foram conduzidos utilizando o espectrômetro Magnetech X-band EPR usando uma cela de quartzo especial para medir amostras líquidas em solventes polares. Os espectros foram registrados

usando uma potência de micro-ondas de 20 mW e uma amplitude de modulação de 1,4 G a 100 kHz.

Os compostos 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) e 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) foram utilizados como armadilhas de spin (do inglês *spin trap*) para verificar a formação de oxigênio singlete e das demais espécies reativas de oxigênio, respectivamente. Uma solução de 2 mL contendo o TMP-OH, (48 mmol.L⁻¹) ou o DMPO (0,03 mol.L⁻¹) e o ligante PDI-Py ou a díade RuPDI-Py (10 e 150 μmol.L⁻¹) foi preparada em tampão PBS pH 7,4 e em D₂O, sem saturação de O₂. Em seguida, 200 μL da mistura foram transferidos para a cela de quartzo. As medidas foram realizadas *in situ* no escuro e após as irradiações com luz de 420 nm e de 620 nm, em intervalos predeterminados de tempo. As amostras foram irradiadas posicionado o feixe de luz na janela da cavidade de micro-ondas do equipamento de EPR, permitindo a permanência da cubeta na mesma posição durante a irradiação e aquisição dos espectros. Soluções do TMP-OH e do DMPO no escuro e irradiadas foram mantidas como controle. Os espectros obtidos experimentalmente foram simulados para obtenção dos parâmetros de EPR como largura de linha, área do sinal de EPR, valor das constantes hiperfinas e valor de *g*.

A concentração de ¹O₂ gerado pela díade RuPDI-Py em solução tampão PBS (pH 7,4) foi determinada através de uma curva de calibração utilizando o 4-hidroxi-TEMPO (TEMPO) como padrão. Soluções de TEMPO em tampão PBS (pH 7,4) nas concentrações de 10, 5, 2, 0,5 e 0,1 μmol.L⁻¹ foram medidas e a curva de calibração foi obtida a partir das áreas dos espectros simulados obtidas ajustando os picos usando formas de linha Lorentzianas.

3.3.9.2 – Determinação de oxigênio singlete por espectroscopia de UV-Vis

Uma solução de 3 mL de DMSO contendo $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de 9,10-Dimetilantraceno (DMA) e os compostos RuPDI-Py, PDI-Py ou o complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (as concentrações dos compostos analisados foram ajustadas para uma absorvância de 0,1 no comprimento de onda de excitação 450 ou 720 nm) foi preparada em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. A absorvância inicial (A_0) dessa solução foi medida no espectrômetro Perkin Elmer $\lambda 40$ (feixe duplo) utilizando uma solução do respectivo composto analisado como branco, ou seja, os espectros de absorção dos compostos analisados foram subtraídos todas as vezes para analisar apenas a diminuição da intensidade de absorção do DMA. Em seguida, a solução foi irradiada com luz de 450 nm ou 720 nm em intervalos predeterminados de tempo (tempo total de irradiação = 30 min para a luz 720 e 10 min para a luz de 450 nm), monitorando as mudanças na absorvância do DMA em 380 nm (A_t). Da mesma forma, uma solução contendo somente o DMA irradiada foi utilizada como controle.

Os rendimentos quânticos de oxigênio singlete (ϕ_Δ) dos compostos RuPDI-Py e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO foram calculados a partir da Equação 3.1, utilizando a riboflavina como referência ($\phi_\Delta = 0,22$ em DMSO¹²⁶).

$$\phi_{\Delta(s)} = \phi_{\Delta(\text{ref})} \cdot \frac{m_s}{m_{\text{ref}}} \cdot \frac{\alpha_{\text{ref}}}{\alpha_s} \quad 3.1$$

onde m_s e m_{ref} correspondem a inclinação do gráfico do consumo de absorvância do DMA em 380 nm (A_0/A) vs tempo de irradiação da amostra e da referência, respectivamente e α corresponde ao fator de correção da absorção,

dado por $\alpha = 1-10^{-A}$ (onde A é a absorbância do comprimento de onda de irradiação).

3.3.10 – Modelos de membrana fosfolipídicas

3.3.10.1 – Preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUV) pelo método gel

As GUVs foram preparadas pelo método gel descrito primeiramente por Weinberger et.al.¹²⁷ Inicialmente foram colocados 300 μ L da solução de acetato de polivinila 5% (PVA) (m/m) em um béquer de 5 mL, que, em seguida, foi mantido em uma estufa com temperatura entre 50-60 °C até que se formasse o filme de PVA no fundo do béquer. Os lipídeos POPC e DOPG foram dissolvidos em clorofórmio (1 mg/mL) e as misturas nas proporções POPC/DOPG 80/20 foram preparadas. Em seguida, 16 μ L da solução das misturas dos lipídeos foram espalhados sob o filme de PVA e o sistema foi deixado no vácuo por 1 h para a secagem do solvente. Por fim, adicionou-se 1 mL da solução de sacarose (0,2 mol.L⁻¹) no béquer e o sistema foi mantido em repouso durante 1 h para a formação das vesículas. A diferença no índice de refração entre a glicose e a sacarose produz uma boa definição óptica.

3.3.10.2 – Microscopia óptica e de fluorescência

Para as medidas de microscopia de fluorescência, alíquotas de 50 μ L da suspensão das GUVs preparadas conforme descrito na seção 3.3.9.1, foram adicionadas em placas com fundo de vidro (Thermo Scientific™ Nunc™ Glass

Bottom Dishes, 12mm) contendo 200 μL de solução de glicose ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$). Em seguida, adicionou-se 2 μL da solução da díade RuPDI-Py ($2,4 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) ou do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($2,4$ e $10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Utilizamos um microscópio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss; Jena, Alemanha) com objetiva Ph2 63 \times . As imagens foram registradas com uma câmera digital AxioCam HSm (Carl Zeiss). O sistema de iluminação do microscópio foi utilizado no modo transmissão (campo claro), com iluminação de baixa intensidade, para observar as vesículas. As medidas de fluorescência e a irradiação das amostras foram realizadas com a lâmpada de 103W Hg (HXP 120, Kubler, Carl Zeiss, Jena, Germany) do microscópio utilizando o filtro Alexa ($\lambda_{\text{EX}} = 493 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 520 \text{ nm}$). A fluorescência e o contraste de fase foram medidos antes e após ao tratamento com a luz. Uma solução contendo somente as GUVs no escuro e irradiada foi utilizada como controle.

3.3.11 – Fontes de Luz

Nos ensaios de terapia fotodinâmica antibacteriana utilizou-se como fonte de luz um sistema de LED comercial com comprimento de onda de 450 nm (Kessil LED Lights PR160L, intensidade 2), operando a 200 mW/cm^2 . Para os ensaios de terapia fotodinâmica antitumoral e para o cálculo de rendimento quântico de oxigênio singlete utilizou-se como fonte de luz um sistema de LED de 450 nm (FIGURA 3.1), composto por 96 LEDs posicionados de forma que cada poço individual da placa de cultura de células recebesse a dose de luz homogênea.

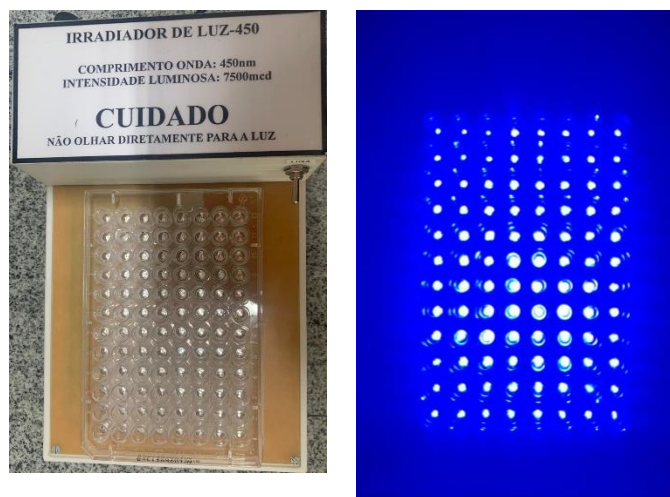


FIGURA 3.1 – Sistema de LED de 450 nm utilizado nos ensaios de terapia fotodinâmica antitumoral e para o cálculo de rendimento quântico de oxigênio singleto

3.3.12 – Terapia Fotodinâmica Antibacteriana

Os ensaios de terapia fotodinâmica antibacteriana foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar.

O método utilizado foi baseado no procedimento descrito por Frei *et al.*¹¹⁰ Primeiramente uma colônia isolada de bactérias *E. Coli* (DH5 α) foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB e mantido a 37 °C por 16 h. Após esse período o inóculo foi centrifugada por 10 min, o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspendido em 4 mL de tampão PBS (pH 7,4). A densidade óptica da suspensão de bactérias foi de 0,6 em 600 nm que corresponde a 10⁸ bactérias/mL para uso nos experimentos. Em uma placa de 96-poços foram incubados 100 μ L da suspensão de bactérias juntamente com 100 μ L de diferentes concentrações da díade RuPDI-Py (0,5-50 μ mol.L⁻¹) em PBS (1% DMSO) durante 15 min no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida, para avaliar o

efeito da terapia fotodinâmica, as placas foram irradiadas usando uma lâmpada de LED (450 nm, Kessil LED Lights PR160L, intensidade 2) durante 5 min posicionada a 4 cm de distância da placa contendo as células. As amostras controles foram incubadas com a díade e mantida no escuro. Também foi realizado o controle com as bactérias incubadas somente com PBS contendo 1% de DMS. Em seguida, as células foram diluídas em série até 10^5 e 30 μ L das respectivas diluições foram gotejados em placas LB-ágar. As placas de LB-ágar foram incubadas a 37 °C por 18 h com o ágar para baixo para secagem das gotas e, após este período, o número de unidades formadoras de colônia por mL (CFU/mL) foi calculado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.13 – Terapia Fotodinâmica antitumoral

Os ensaios de terapia fotodinâmica antitumoral foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti no Departamento de Gerontologia da UFSCar.

3.3.13.1 – Linhagem Celular

As células foram obtidas do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti. As células da linhagem tumoral de melanoma humano MDA-MB-435, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura Leibovitz-L15 (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As células foram mantidas em incubadora úmida a 37 °C para serem utilizadas nos ensaios, cultivadas em frascos de cultura. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células, que ocorre por incubação com 2

mL de solução de tripsina em incubadora úmida a 37 °C durante 5 minutos. A reação foi parada com a adição de 2 mL de meio de cultura 10% FBS e as células em suspensão centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuspensionado em meio de cultura e a contagem de células viáveis foi realizada no contador de células automatizado TC20 (BIO-RAD) na presença do corante Trypan Blue.

3.3.13.2 – Avaliação da citotoxicidade e da fotocitotoxicidade pela técnica do MTT

A citotoxicidade e fotocitotoxicidade da díade RuPDI-Py, do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e do padrão azul de metileno sobre as células MDA-MB-435 foram avaliadas através da técnica colorimétrica de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT através da enzima mitocondrial desidrogenase, provocando a clivagem do anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela para um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan (1-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-3,5-difenil formazan), que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Estes cristais podem ser solubilizados para gerar uma solução cuja intensidade de cor é medida por absorvância e que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.¹²⁸

Para o ensaio, as células MDA-MB-435 foram plaqueadas em placa de 96 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) e mantidas na incubadora úmida a 37 °C por 24 h para permitir a adesão. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e 100 μL de diferentes concentrações dos compostos RuPDI-Py, $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e azul de metileno (diluídos em 0,033% de DMSO e meio Leibovitz-L15) foram

adicionados aos poços. As células foram incubadas a 37°C por 4 h. Após esse período, o meio contendo os compostos foi removido e 100 µL do meio de cultura Leibovitz-L15 sem o corante vermelho de fenol (10% FBS) foi adicionado em cada poço. As células foram irradiadas com um sistema de luz de LED de 450 nm durante 5 e 10 minutos. Uma placa foi mantida no escuro como controle. Após ao tratamento com a luz, as placas foram mantidas na estufa por 24 h nas mesmas condições descritas acima. Após esse período, o meio de cultura de cada poço foi retirado e uma solução contendo MTT (1 mg/mL) foi adicionada (100 µL/poço). As placas foram então mantidas durante 4 h a 37 °C e em seguida os cristais formados foram diluídos em DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca (BioTek Synergy H1) em comprimento de onda de 540 nm. O controle positivo utilizado nesse experimento foi azul de metileno, um fotossensibilizador comumente utilizado em terapia fotodinâmica antitumoral.¹²⁹ A determinação do IC₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) dos complexos foi determinada a partir de uma curva de concentração utilizando o software GraphPad Prism®.

3.3.13.3 – Preparo das amostras para a microscopia de fluorescência e microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM)

Para examinar os efeitos da díade RuPDI-Py sobre a organização do núcleo e do citoesqueleto em células tumorais de melanoma humano da linhagem MDA-MB-435, foram utilizados os marcadores 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) e *Alexa 488 Fluor® Phalloidin* (Faloidina, Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific). Além disso, o marcador *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG, Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para monitorar a formação de oxigênio singleto nas células.

Para o preparo das amostras para as microscopias as células MDA-MB-435 foram plaqueadas (1×10^6 células) em placas para microscopia óptica com fundo de vidro (Thermo Scientific™ Nunc™ Glass Bottom Dishes, 12 mm) e mantidas na incubadora a 37 °C durante 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da díade RuPDI-Py (diluída em 0,033% de DMSO e meio Leibovitz-L15) e incubadas no escuro por 4 h. Em seguida, o meio contendo a díade foi removido e 1,0 mL do meio de cultura Leibovitz-L15 sem o corante vermelho de fenol (10% FBS) foi adicionado em cada placa. Para a marcação com o SOSG as células foram incubadas com 40 μL de SOSG ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) durante 10 min e, após esse período, a solução com o marcador foi removida e 1,0 mL do meio de cultura Leibovitz-L15 sem o corante vermelho de fenol (10% FBS) foi adicionado em cada placa. As células foram irradiadas com um sistema de luz de LED de 450 nm durante 5 minutos e mantidas por 24 h na incubadora sob as mesmas condições descritas acima. Após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi parada com três lavagens (10 min) de PBS/glicina. Após a lavagem, foi adicionado o marcador Alexa 488 Fluor® Phalloidin (5 μL da solução estoque em 200 μL de PBS em cada placa) durante 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS (3 x 10 min) e coradas com DAPI (0,5 $\mu\text{g/mL}$) durante 4 minutos para marcação do núcleo. As células foram lavadas novamente com PBS, as placas foram cobertas com Fluoromount G (ThermoScientific) e armazenadas no escuro para posterior obtenção das imagens.

3.3.13.4 – Microscopia de fluorescência e microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM)

As imagens de microscopia de fluorescência e de microscopia por tempo de vida de fluorescência foram obtidas em um sistema de medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal MT-200 – PicoQuant, microscópio invertido de detecção Olympus (IX71) junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito (Laboratório de Fotobiofísica, FFCLRP-USP). Para excitar as amostras nas medidas de FLIM foram empregados os lasers de diodo pulsado de 470 nm (LDH-D-C-450) e 640 nm (LDH-D-C-640) e para a emissão foram utilizados os filtros BLP01-488R e HQ690/70m. Para as imagens de fluorescência os filtros de excitação utilizados foram o U-MNU2 BP360/370 e U-MWB2 BP460/490. As imagens foram adquiridas e processadas pelo software operacional do microscópio, SymPhoTime.

3.3.14 – Preparação das nanofibras poliméricas utilizando a técnica de eletrofiação

As nanofibras poliméricas foram preparadas em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa na EMBRAPA Instrumentação de São Carlos.

3.3.14.1 – Pré-tratamento ou funcionalização das nanofibras no *core*

Soluções contendo o polímero poliacrilonitrila (PAN) a 10% (m/v) em DMF foram preparadas na presença de diferentes concentrações do composto RuPDI-Py ou $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (10 – 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e mantidas sob agitação por 24 h. Em seguida, a solução polimérica foi transferida para uma seringa de vidro e

acoplada a uma bomba de ejeção. Os parâmetros utilizados para a eletrofição foram: vazão de ejeção da solução = 0,3 mL.h⁻¹, tensão = 14 kV, diâmetro interno da agulha = 1,2 mm (18G), , umidade relativa = 38% e temperatura = 25 °C. As nanofibras foram depositadas durante 2 h em um coletor metálico cilíndrico (80 mm de diâmetro) girando a 180 rpm.

3.3.14.2 – Caracterização das nanofibras poliméricas

A morfologia e o diâmetro das nanofibras poliméricas foram avaliados usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (microscópio JEOL JSM-6510) utilizando a tensão de voltagem de 15 kV. Amostras das mantas de nanofibras (2 mm²) foram cortadas e fixadas em fita de carbono e revestidas com ouro usando um sputter coater (Leica-SCD 050). O diâmetro da fibra foi estimado a partir das imagens MEV com o auxílio do software de análise de imagens Image J (National Institutes of Health, EUA), medindo 100 fibras aleatórias.

A luminescência dos compostos imobilizados nas nanofibras foi avaliada utilizando discos de 1 cm de diâmetro das mantas de nanofibras fixados em um porta amostra de estado sólido. Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

3.3.14.3 – Cinética de liberação dos compostos imobilizados nas nanofibras poliméricas

As mantas de nanofibras de PAN funcionalizadas com a díade RuPDI-Py foram cortadas em discos de 1 cm de diâmetro e incubadas em 2 mL de solução de tampão PBS (pH 7,4). As soluções foram mantidas no escuro e em temperatura ambiente e 600 µL da solução foram coletados em intervalos de tempo predeterminados e analisados por espectroscopia de UV-Vis e de luminescência, e, em seguida, adicionados de volta à amostra. Os mesmos estudos de liberação foram realizados na presença de luz visível, onde as fibras em solução de PBS foram irradiadas com luz de 450 nm durante 30 min.

3.3.14.4 – Geração de oxigênio singlete pelas nanofibras poliméricas

A capacidade das nanofibras de PAN funcionalizadas com a díade RuPDI-Py em gerar oxigênio singlete foi avaliada pelas técnicas de EPR com armadilhas de spin e por UV/vis. Para os estudos com a técnica de EPR, um disco (2 cm de diâmetro) das mantas de nanofibras de PAN funcionalizadas com os compostos foi incubado em 2 mL da solução do spin-trap TMP-OH, (48 mmol.L^{-1}) em PBS (pH 7,4). A solução foi irradiada com luz de 450 nm durante 30 min e, em seguida, o espectro de EPR foi medido utilizando as mesmas condições descritas na seção 3.3.8.1. Uma solução contendo somente a nanofibra de PAN incubada com o spin-trap e seguida pela irradiação foi utilizada como controle.

Para os estudos com a técnica de UV/Vis, um disco com 2 cm de diâmetro das mantas de nanofibras de PAN funcionalizadas com os compostos foi incubado em 2 mL da solução de DMA (2 mg/10 mL) em uma mistura de PBS/EtOH 1/1 (v/v). A solução foi irradiada com luz de 450 nm em intervalos predeterminados de tempo (tempo total de irradiação = 30 min) e os espectros de absorção foram medidos utilizando as mesmas condições descritas na seção

3.3.8.2. Uma solução contendo somente a nanofibra de PAN incubada com o DMA e seguida pela irradiação foi utilizada como controle.

4 – Resultados e discussão

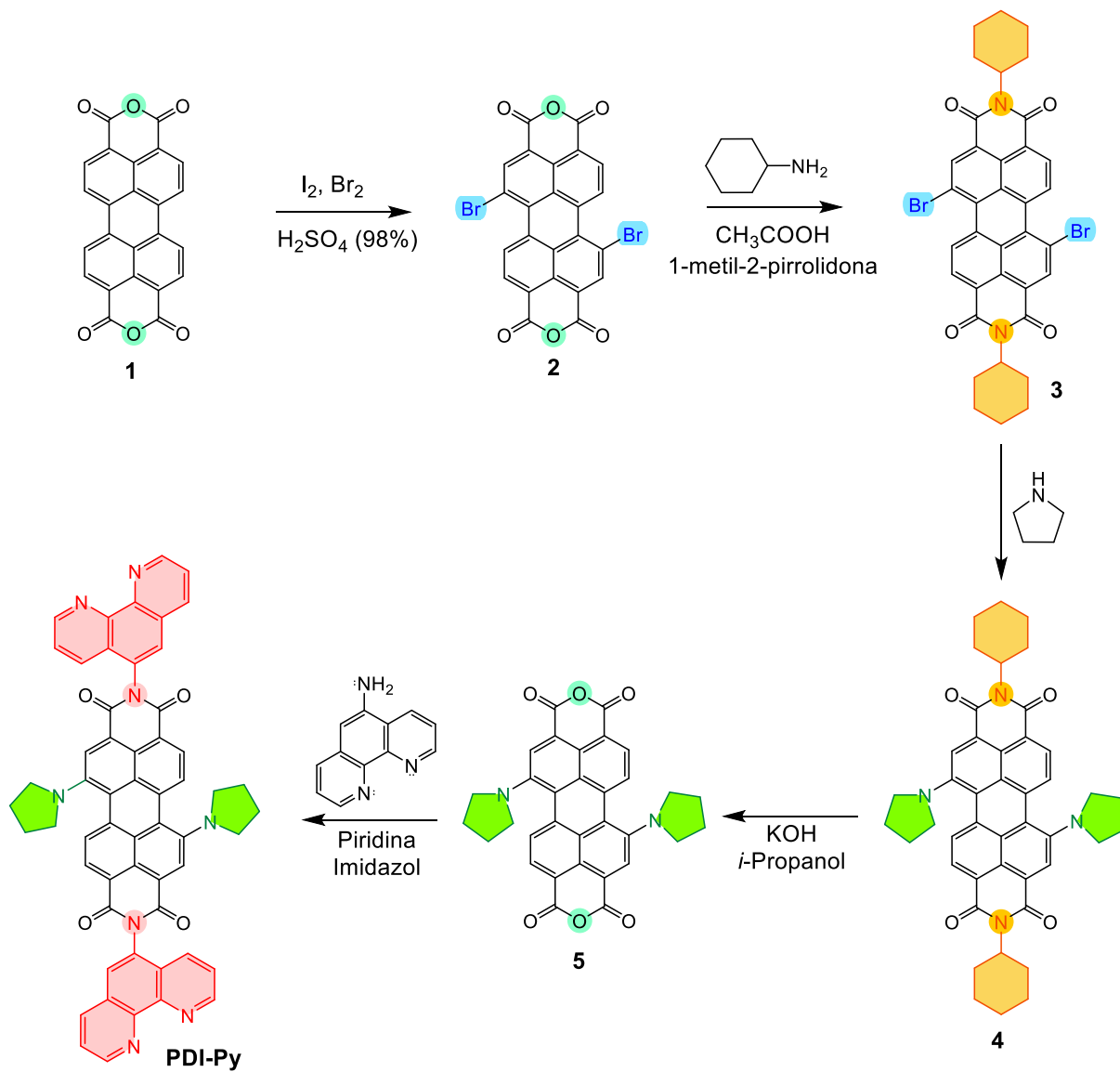
4.1 – Síntese e caracterização

4.1.1 – Ligante PDI-Py

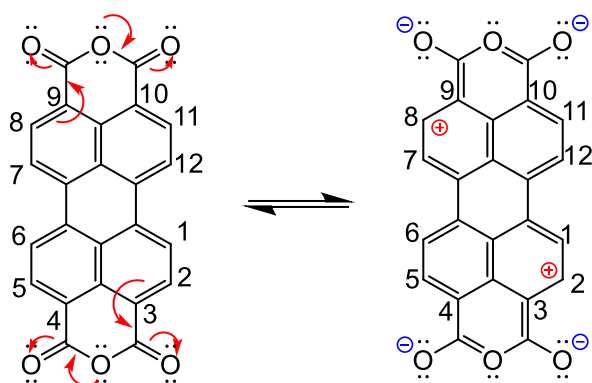
A rota sintética para o ligante PDI-Py está representada no ESQUEMA 4.1. A síntese dos compostos precursores 2, 3, 4 e 5 foram baseadas no procedimento descrito na literatura por Würthner et. al.,²² enquanto a síntese do PDI-Py foi baseada no procedimento descrito por Büyükekşi et. al.¹³⁰ para um derivado do PDI com estrutura química similar.

A bromação do perileno dianidrido (1) ocorre através de uma reação de substituição eletrofílica em aromáticos (SeAr).¹³¹ Os oxigênios do grupo anidrido são mais eletronegativos que o carbono e retiram densidade eletrônica do anel aromático para participar da conjugação com as carbonilas, diminuindo a densidade eletrônica na região orto do anel (C2, C5, C8 e C11), conseqüentemente a posição menos eletro-deficiente é a posição bay (C1, C6, C7 e C12). Como em reações de SeAr o anel aromático utiliza os elétrons π para o ataque nucleofílico¹³¹, a redução da densidade eletrônica diminui a reatividade nas posições orto e favorece as posições bay (ESQUEMA 4.2). O H₂SO₄ utilizado na reação é um ácido forte e interage com o Br₂ deixando o bromo mais eletrofílico. O eletrófilo reage com dois elétrons π do anel aromático nas posições bay 1,7 (C1 e C7) (região rica em elétrons) formando um cátion intermediário. O intermediário catiônico é evidentemente menos estável do que o material de partida ou o produto, mas é estabilizado por ressonância o que permite a delocalização da carga pelo anel em direção aos oxigênios da carbonila. Em seguida, um próton é removido e o sistema aromático é regenerado, resultando no

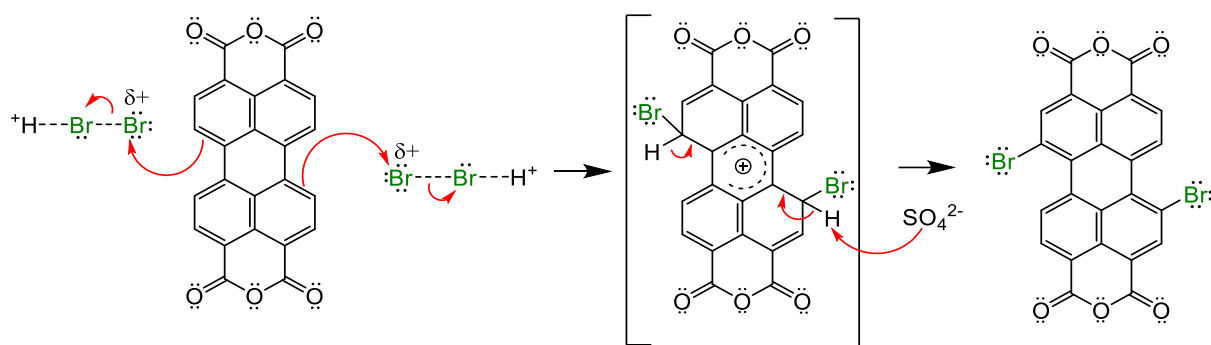
1,7-dibromoperileno-dianidrido (2). O mecanismo proposto para essa etapa da síntese está representado no ESQUEMA 4.3.



ESQUEMA 4.1 – Rota sintética para o ligante PDI-Py



ESQUEMA 4.2 – Estruturas de ressonância do perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico dianidrido (1) demonstrando a deslocalização de carga provocada pelo grupo anidrido que favorece a substituição regioespecífica nas posições bay 1 e 7.

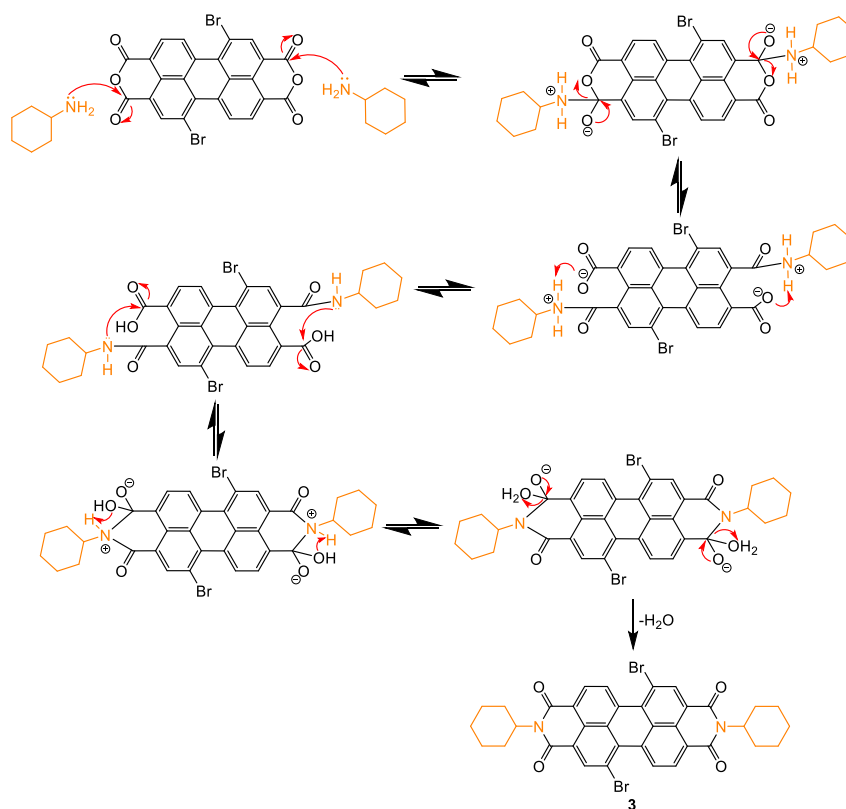


ESQUEMA 4.3 – Mecanismo de reação de bromação proposto para a síntese do 1,7-dibromoperileno dianidrido (2).

O 1,7-dibromoperileno-dianidrido (2) é insolúvel em solventes orgânicos e, portanto, a purificação e a confirmação de sua estrutura tornaram-se limitada. Dessa forma, a mistura obtida da primeira etapa de reação foi utilizada para uma sequente reação de imidização com ciclo-hexilamina. O ESQUEMA 4.4 representa o mecanismo de reação proposto para esta etapa da reação. O produto obtido, 1,7-dibromoperileno diimida (3), apresentou boa solubilidade em solventes orgânicos, o que facilitou a purificação através da cromatografia em

coluna de sílica gel utilizando diclorometano como eluente. A estrutura do composto 3 foi confirmada por $^1\text{H-RMN}$ - (FIGURA 4.1) e está de acordo com o relatado na literatura.²²

Infelizmente, a imidização direta com a 1,10-fenantrolina-5-amino, que é a proposta do ligante final, não é possível devido à baixa solubilidade do produto com a fenantrolina, dificultando os processos de purificação. Por isso é necessária a adição da ciclo-hexilamina e posterior substituição pela 1,10-fenantrolina-5-amino.



ESQUEMA 4.4 – Mecanismo de reação de imidização proposto para a síntese do 1,7-dibromoperileno diimida (3).

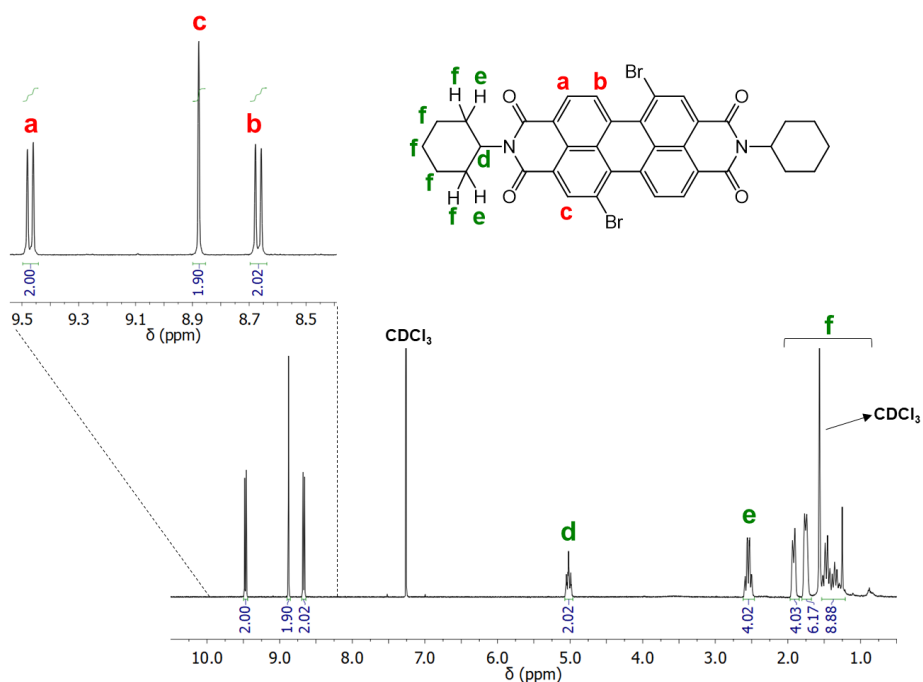
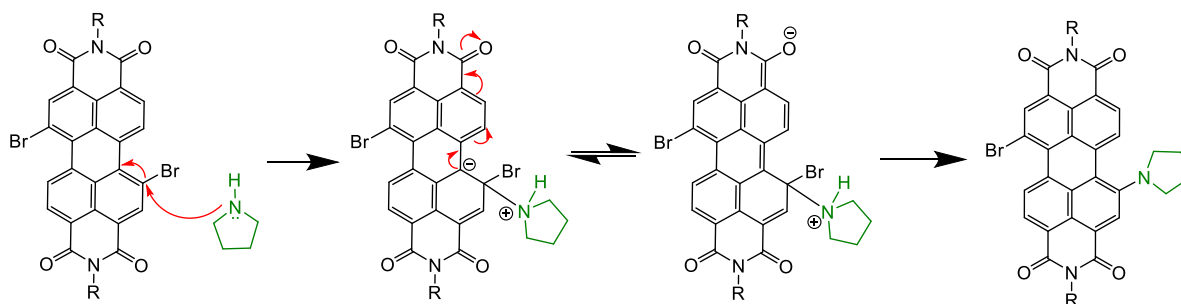


FIGURA 4.1 – Espectro de ¹H-RMN- (CDCl₃, 400 MHz) do precursor 1,7-dibromoperileno diimida (3) com as atribuições dos sinais de prótons.

A próxima etapa da rota sintética consistiu na substituição do Br por duas moléculas de pirrolidina através de uma reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr), representada no ESQUEMA 4.5. O mecanismo envolve a adição de um nucleófilo seguido da eliminação do grupo abandonador.¹³¹ A pirrolidina atua como um nucleófilo forte e tende a procurar uma região deficiente de elétrons no anel aromático. A posição orto do anel aromático é uma região deficiente de elétrons, no entanto, se o nucleófilo é adicionado nessa posição o grupo abandonador será um hidreto, uma base dura que não é um bom grupo de saída, resultando em uma reatividade baixa nessa posição com o nucleófilo. Os átomos de Br na posição bay 1 e 7 promovem uma deficiência na densidade eletrônica do carbono ligado ao substituinte devido ao efeito indutivo provocado pela diferença de eletronegatividade. O Br é considerado um bom grupo de saída devido a incompatibilidade do tamanho do orbital (Bromo= orbital 4p) com os orbitais do C sp², fazendo com que a sobreposição não seja tão eficiente. Esses

fatores fazem com que os C1 e C7 apresentem a nuvem de elétrons π alterada favorecendo o ataque nucleofílico da pirrolidina na posição bay do anel.

A reação começa com o ataque da pirrolidina aos carbonos C1 e C7 que contém o grupo abandonador. A configuração desses carbonos varia de uma hibridização trigonal plana sp^2 para a tetraédrica sp^3 , alterando a aromaticidade do sistema e produzindo um intermediário aniônico. Nesse estado de transição a carga negativa é delocalizada para as imidas (região da molécula que retira elétrons) e a capacidade dos átomos de oxigênio em acomodar a carga estabiliza o complexo intermediário. Quando o Br é eliminado as configurações do C1 e C7 retornam para a hibridização sp^2 e a aromaticidade é restabelecida.



ESQUEMA 4.5 – Mecanismo da reação de substituição nucleofílica aromática proposto para a síntese do 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4).

A substituição nucleofílica da molécula 1,7-dibromoperileno diimida com pirrolidina a 60 °C proporcionou a formação do 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4), com rendimento de 40% após a purificação por coluna de cromatografia de sílica gel. Nesta etapa da reação ocorreu a mudança da coloração de vermelho para verde do sólido obtido. A estrutura do composto 4 foi confirmada por $^1\text{H-RMN}$ - (FIGURA 4.2) e está de acordo com o relatado na literatura.²²

A etapa seguinte da rota sintética consistiu em uma reação de saponificação para a retirada da ciclo-hexilamina da posição imida e retorno do anidrido. A mistura 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4) com KOH em isopropanol resultou na formação do 1,7-dipirrolidinil perileno dianidrido (5) com rendimento de 95%. A estrutura do composto 5 foi confirmada por $^1\text{H-RMN-}$ (FIGURA 4.3) e está de acordo com o relatado na literatura.²²

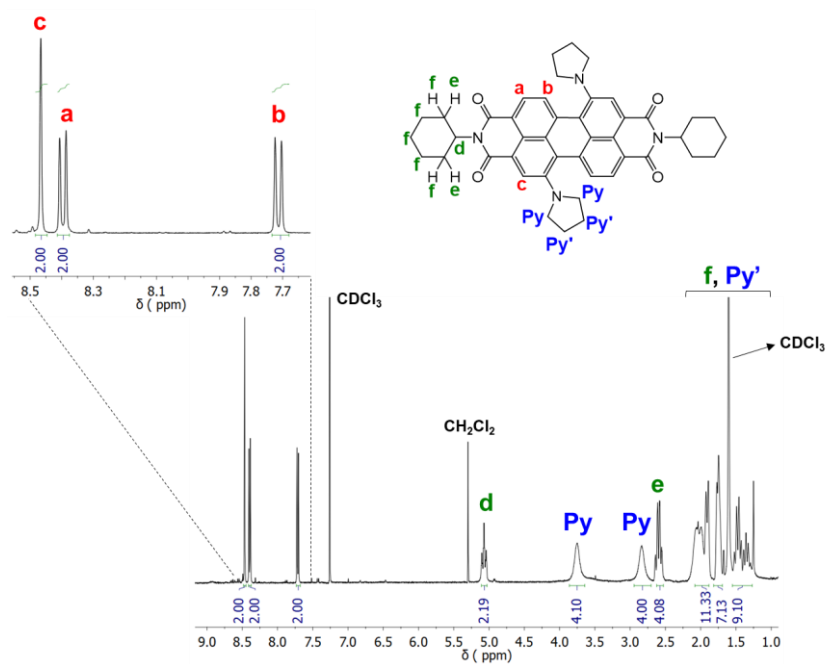


FIGURA 4.2 – Espectro de $^1\text{H-RMN-}$ (CDCl_3 , 400 MHz) do precursor 1,7-dipirrolidinil perileno diimida (4) com as atribuições dos sinais de prótons.

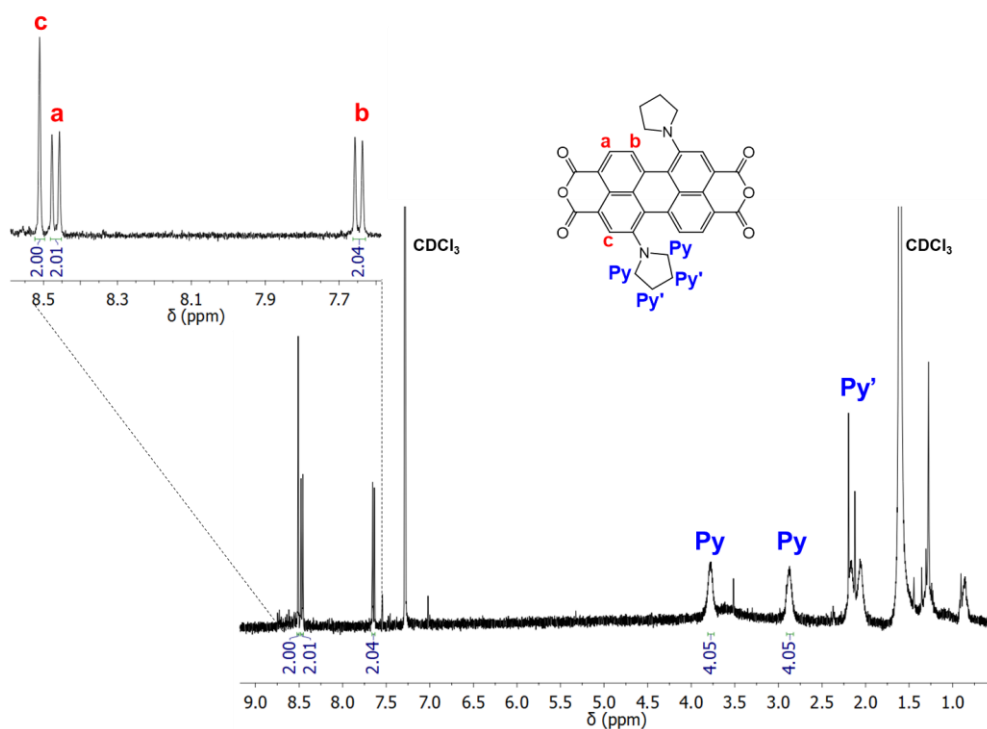


FIGURA 4.3 – Espectro de ¹H-RMN- (CDCl₃, 400 MHz) do precursor 1,7-dipirrolidinil perileno dianidrido (5) com as atribuições dos sinais de prótons.

A última etapa da síntese do ligante consistiu na adição da 1,10-fenantrolina-5-amino na posição imida do anel. A 1,10-fenantrolina além de permitir a coordenação ao centro metálico Ru(II), pode atuar como um ligante ponte permitindo a transferência de elétrons entre Ru(II) e o PDI-Py. A síntese do ligante PDI-Py foi adaptada do procedimento descrito na literatura para derivados do PDI bay-substituído¹³⁰, utilizando piridina e imidazol como solventes, sob refluxo e atmosfera de nitrogênio por 24 h. O mecanismo reacional é similar ao representado no ESQUEMA 4.5. O sólido final obtido apresentou coloração verde escuro (FIGURA 4.4) e a estrutura molecular proposta foi confirmada por espectrometria de massas e por RMN.

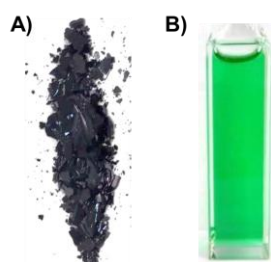


FIGURA 4.4 – Ligante PDI-Py (A) sólido e em (B) solução de DMSO.

Na análise por espectrometria de massas, identificaram-se os picos dos íons moleculares de $m/z = 443,1521$ e $m/z = 855,2954$ (FIGURA 4.5) que correspondem a massa do PDI-Py protonado com dois e um próton, respectivamente.

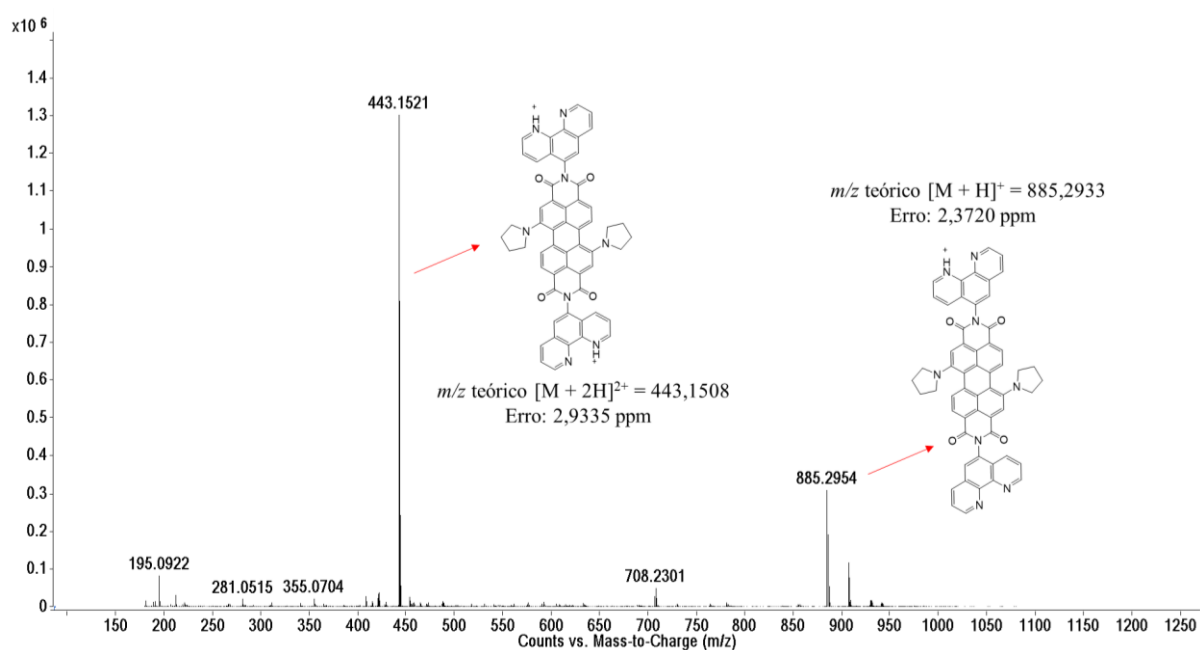


FIGURA 4.5 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do ligante PDI-Py em metanol.

Os deslocamentos químicos e as respectivas atribuições dos prótons e dos carbonos do ligante PDI-Py foram determinadas correlacionando as informações dos experimentos de RMN 1D e 2D e são mostrados nas FIGURA 4.6 FIGURA 4.9 e na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C do ligante PDI-Py em DMSO-d₆.

Próton	^1H (ppm) (m, n° H)	COSY (ppm)	^{13}C - HSQC (ppm)	^{13}C - HMBC (ppm)
2	9,23 (m, 2H)	7,88	150,12	136,7
3	7,88 (dd, 2H)	8,58; 9,23	123,19	127,12
4	8,58 (d, 2H)	7,78	136,11	127,12; 145,9; 150,12
6	8,22 (s, 2H)	-	127,12	131,99; 136,11; 145,91
7, a	8,43 (m, 4H)	7,75; 7,72	126,19; 131,39	122,0; 145,91; 149,86; 163,91
8	7,72 (dd, 2H)	8,42; 9,17	123,19	116,87; 131,39; 129,80
9	9,18 (d, 2H)	7,72	149,86	123,52
b	7,76 (d, 2H)	8,44	123,53	116,87; 118,51; 129,80
c	8,46 (s, 2H)	-	120,00	122,0; 163,91
Py	3,78 (m, 2H)	-	50,67	
Py	2,85 (m, 2H)	-	50,67	
Py'	1,80-2,20 (m, 8H)	-	25,56	

Os prótons aromáticos das fenantrolinas e do centro do anel do PDI foram observados na região de 9,4 a 7,6 ppm. Estruturas simétricas de perileno 1,7-dipirrolidinil substituídos apresentam um padrão no espectro de $^1\text{H-NMR}$ nos prótons da região aromática, com três sinais (um singleto e dois dubletos) na faixa de 8,0-9,0 ppm e cada um destes com área proporcional para dois hidrogênios, indicando que existem apenas três tipos de prótons no núcleo de perileno.¹³² Esse padrão foi mantido no ligante PDI-Py, demonstrando que após a adição dos substituintes fenantrolina a simetria da molécula foi preservada e as pirrolidinas encontram-se nas posições 1,7-bay.

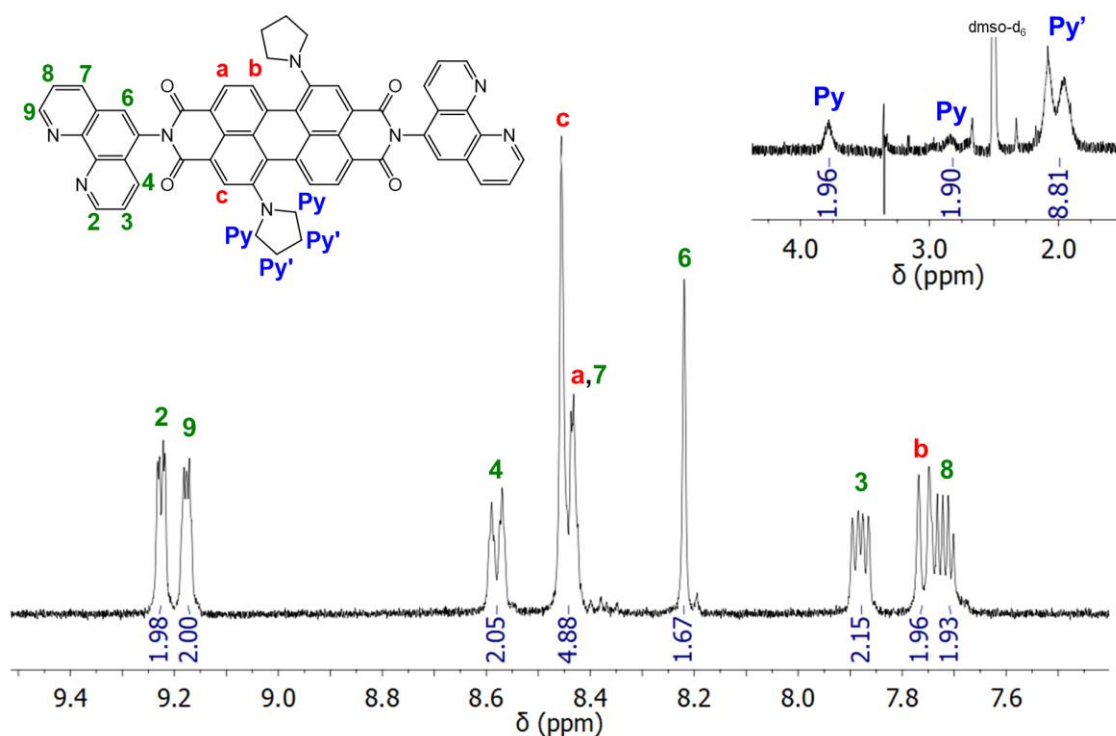


FIGURA 4.6 – Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do ligante PDI-Py em DMSO-d_6 (600 MHz) com as atribuições dos sinais dos prótons.

A correlação do acoplamento H–H foi dada pelo espectro de $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, FIGURA 4.7. Os picos cruzados observados indicaram as seguintes

correlações: $H_2 \leftrightarrow H_3$, $H_9 \leftrightarrow H_8$, $H_4 \leftrightarrow H_3$, $H_7 \leftrightarrow H_8$ e $H_a \leftrightarrow H_b$. A combinação dos espectros 1H - ^{13}C HSQC e 1H - ^{13}C HMBC também foram consistentes com a estrutura proposta. O espectro 1H - ^{13}C HSQC (FIGURA 4.8) demonstrou que os prótons H_3 e H_8 da fenantrolina interagem com carbonos que possuem o mesmo deslocamento químico (123,19 ppm) e o espectro de 1H - ^{13}C HMBC (FIGURA 4.9) demonstrou que o C da carbonila aparece em 164,07 ppm e interage com os prótons H_a e H_c .

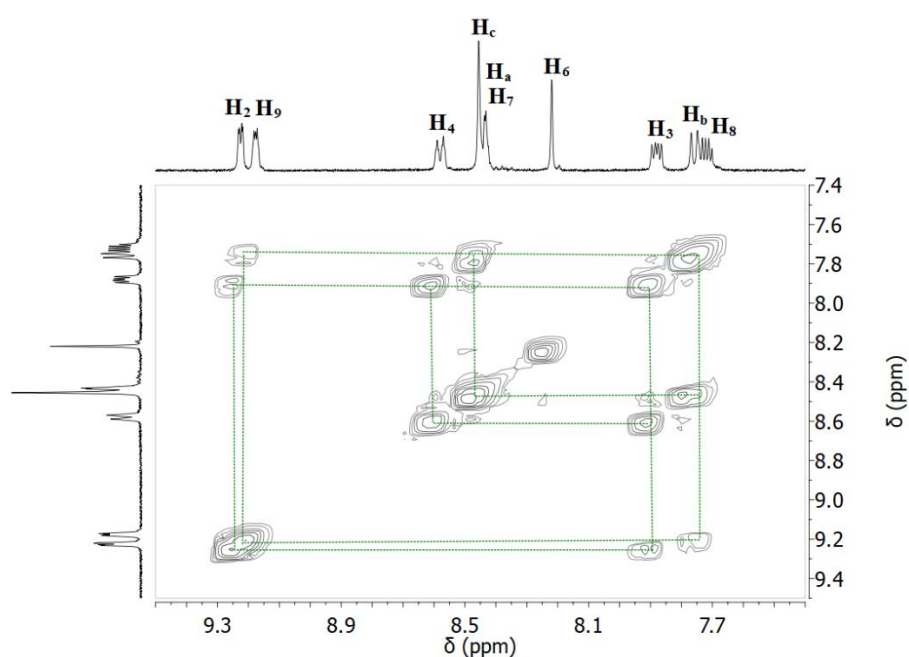


FIGURA 4.7 – Região aromática do espectro de RMN 1H - 1H COSY do ligante PDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos 1H - 1H .

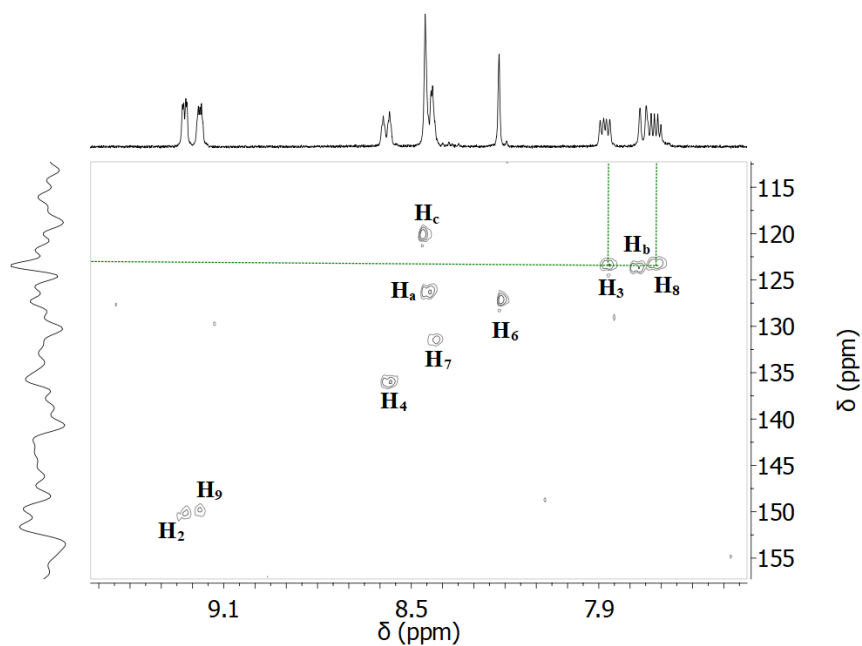


FIGURA 4.8 – Região aromática do espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC do ligante PDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C .

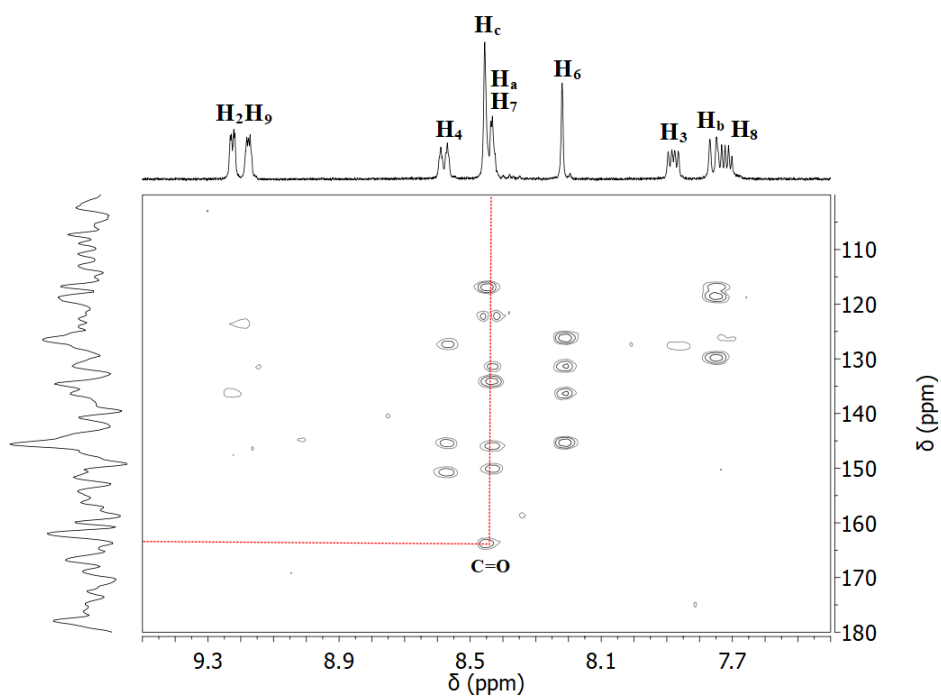


FIGURA 4.9 – Região aromática do espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC do ligante PDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C .

4.1.2 – Complexo [Ru(phen)₃]²⁺

O complexo [Ru(phen)₃]²⁺ utilizado como referência foi obtido comercialmente (Sigma-Aldrich). No entanto, os espectros de RMN 1D e 2D foram medidos em DMSO-d₆ para posterior comparação com a díade RuPDI-Py. Os deslocamentos químicos dos prótons e dos carbonos com as respectivas atribuições são apresentados na TABELA 4.2 e FIGURA 4.10.

Os prótons observados na região de 9,0-7,5 ppm correspondem aos oito hidrogênios aromáticos de cada molécula de fenantrolina e está de acordo com o relatado na literatura para esse complexo.¹³³ O espectro de ¹H-¹H COSY (FIGURA 4.11) indicou as seguintes correlações de acoplamento H-H: H₄/H₇ ↔ H₃/H₈ e H₂/H₉ ↔ H₃/H₈. Os sinais de ¹³C foram determinados pelos experimentos de HSQC (FIGURA 4.12) a partir da correlação com os sinais de ¹H.

TABELA 4.2 – Deslocamentos químicos (δ, ppm) de ¹H e ¹³C do complexo [Ru(phen)₃]²⁺ em DMSO-d₆.

Próton	¹ H (ppm) (m, n° H)	COSY (ppm)	¹³ C- HSQC (ppm)
2, 9	8,82 (dd, 6H)	7,80	136,83
5, 6	8,43 (s, 6H)	-	128,03
4, 7	8,11 (dd, 6H)	7,80	152,73
3, 8	7,80 (dd, 6H)	8,11; 8,82	126,30

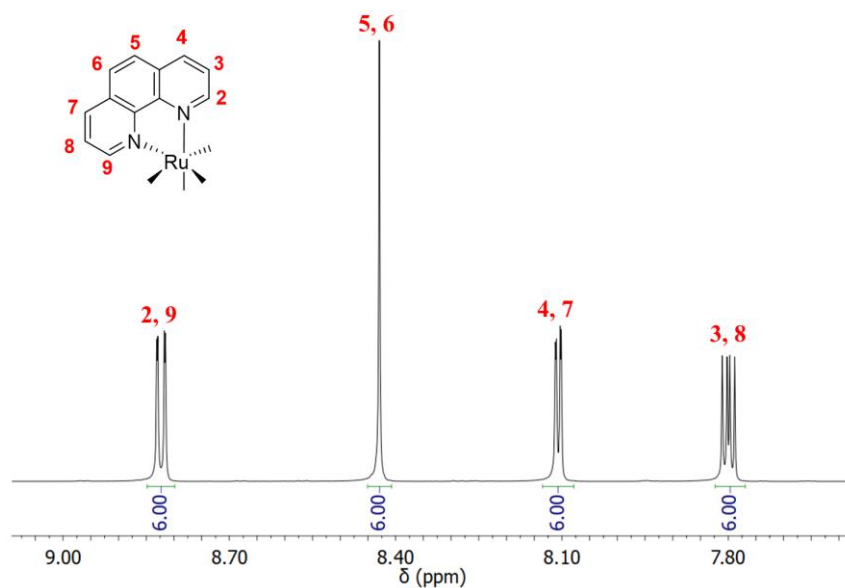


FIGURA 4.10 – Espectro de ^1H -RMN (região aromática) do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO-d_6 (600 MHz) com as atribuições dos sinais dos prótons.

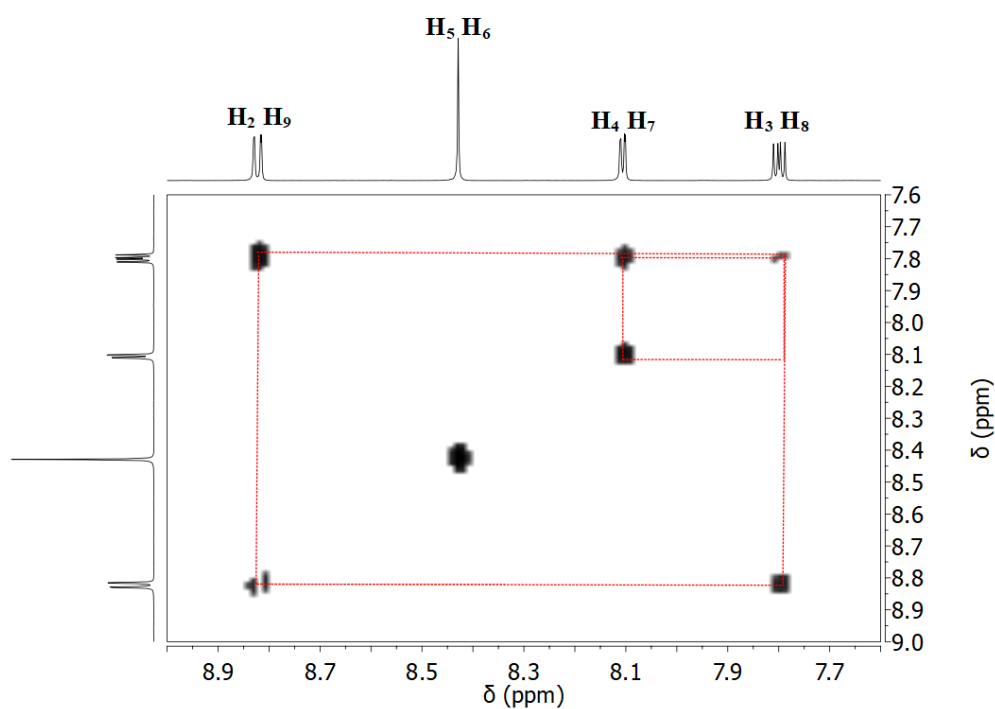


FIGURA 4.11 – Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (região aromática) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^1H .

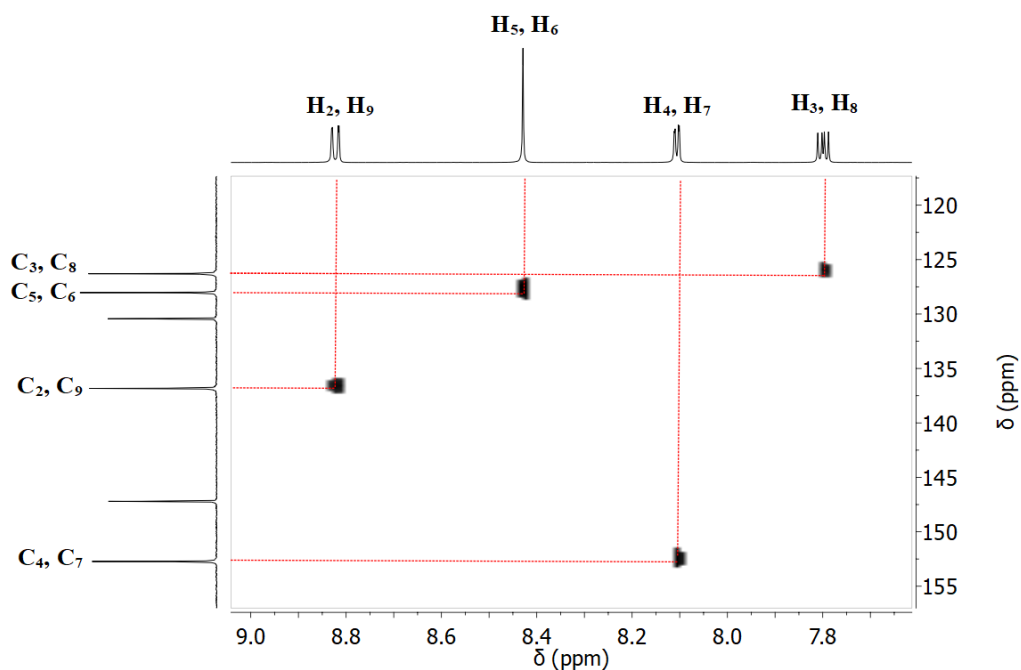
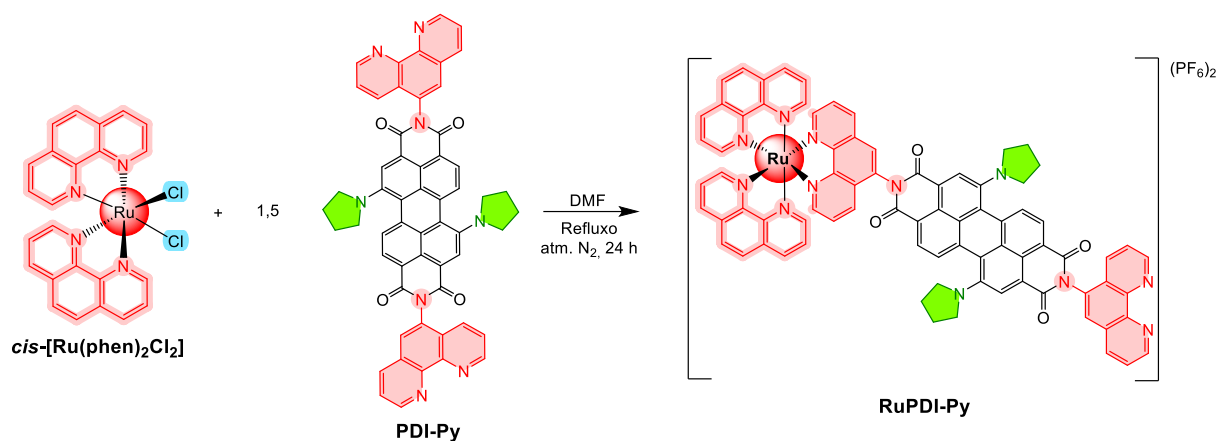


FIGURA 4.12 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (região aromática) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C .

4.1.3 – Díade RuPDI-Py

A díade RuPDI-Py foi sintetizada de acordo com o método previamente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa⁷³, utilizando DMF como solvente, sob refluxo e atmosfera de nitrogênio por 24 h, conforme demonstrado no ESQUEMA 4.6. Após a purificação, o rendimento da reação foi de 67% e o sólido obtido apresentou coloração verde escuro (FIGURA 4.13).



ESQUEMA 4.6 – Rota sintética da díade RuPDI-Py.

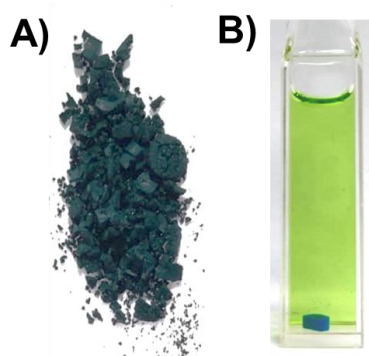


FIGURA 4.13 – Díade RuPDI-Py (A) sólido e em (B) solução de DMSO.

A estrutura molecular da díade RuPDI-Py foi confirmada por espectrometria de massas e por RMN. Na análise por espectrometria de massas (FIGURA 4.14), identificaram-se os picos dos íons moleculares de $m/z = 449,1137$ referente à protonação do ligante PDI-Py, deixando a díade com três cargas positivas $[M + H]^{3+}$, e o íon de $m/z = 637,1649$ referente à massa da díade com duas cargas positivas $[M]^{2+}$. Além disso, os picos apresentaram o padrão isotópico típico dos compostos de rutênio.¹³⁴

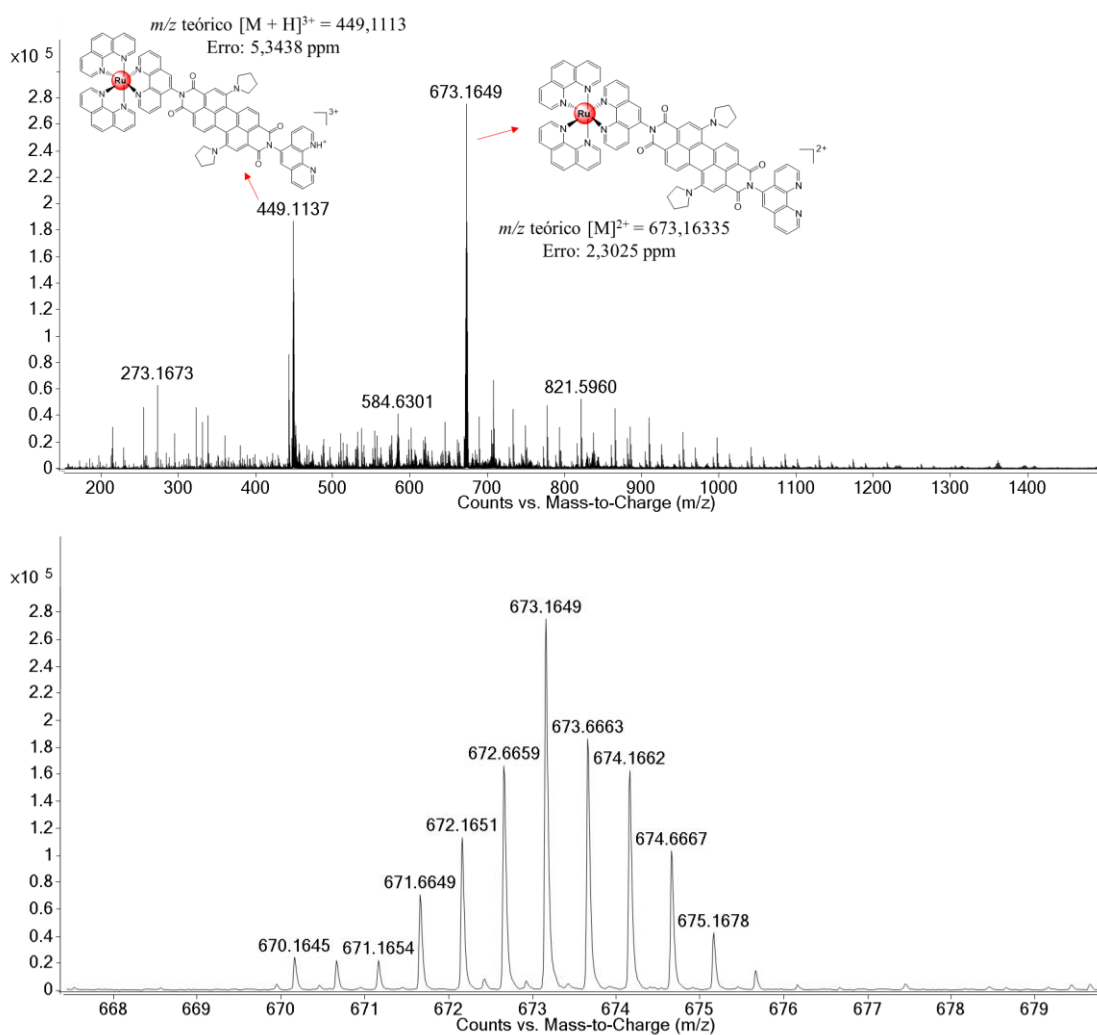


FIGURA 4.14 – Espectro de massas (MALDI-TOF) da díade RuPDI-Py (em acetonitrila) e a distribuição isotópica do rutênio referente ao pico do íon molecular m/z 673,1649.

O espectro de ^1H RMN da díade RuPDI-Py está representado na FIGURA 4.15 e os deslocamentos químicos dos prótons e carbonos estão descritos na TABELA 4.3. A grande sobreposição dos sinais na região aromática dificultou a atribuição precisa dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais. Para facilitar a interpretação do espectro, a atribuição dos sinais foi realizada correlacionando o deslocamento químico dos prótons do ligante livre PDI-Py e do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ com as informações dos experimentos de RMN 1D e 2D.

TABELA 4.3 – Deslocamentos químicos (δ , ppm) de ^1H e ^{13}C da díade RuPDI-Py em DMSO- d_6 .

Proton	^1H (ppm) (m, n $^\circ\text{H}$)	COSY (ppm)	^{13}C -HSQC (ppm)	^{13}C -HMBC (ppm)
phen-PDI				
2	9,23 (m, 1H)	7,8	150,6	124,4; 137,2; 146,1
3	7,88 (m, 1H)	8,57; 9,23	124,3	128,6
4	8,58 (m, 1H)	7,78	136,11	127,12; 145,9; 150,12
6	8,21 (m, 1H)		128,4	132,2; 146,12
7	8,42 (m, 1H)		132,3	
8	7,72 (m, 1H)		124,3	117,3; 119,1; 130,9
9	9,18 (m, 1H)	7,72	151,4	124,4; 146,1
phen-PDI/Ru				
2'	8,85 (m, 1H)	7,80	136,4	128,8; 147,8; 153,2
3', 8'	7,64 – 7,73 (m, 2H)		124,3	
4', 7'	8,14 – 8,23 (m, 2H)	7,80	153,5	127,1; 137,2; 147,7
6'	8,66 (m, 1H)		126,5	128,5; 134,0; 137,3; 147,7
9'	8,78 (m, 1H)		133,5	128,8; 147,8; 153,2
phen-Ru				
2'', 9''	8,82 (m, 4H)	7,86	137,5	147,8; 153,2
3'', 8''	7,86 (m, 4H)		126,9	130,9; 153,3
4'', 7''	8,12 (m, 4H)	7,86	153,5	127,0; 137,2; 147,7
5'', 6''	8,42 (m, 4H)		128,4	122,7; 130,9; 147,7; 151,1
PDI-Py				
a, a'	8,43 – 8,50 (m, 2H)	7,65 – 7,77	126,8	
b, b'	7,65 – 7,77 (m, 2H)	8,43 – 8,50	124,3	
c, c'	8,43 – 8,50 (m, 2H)		120,86	164,4
Py	3,79		52,8	
Py	2,85		52,8	
Py'	1,80-2,20		25,5	

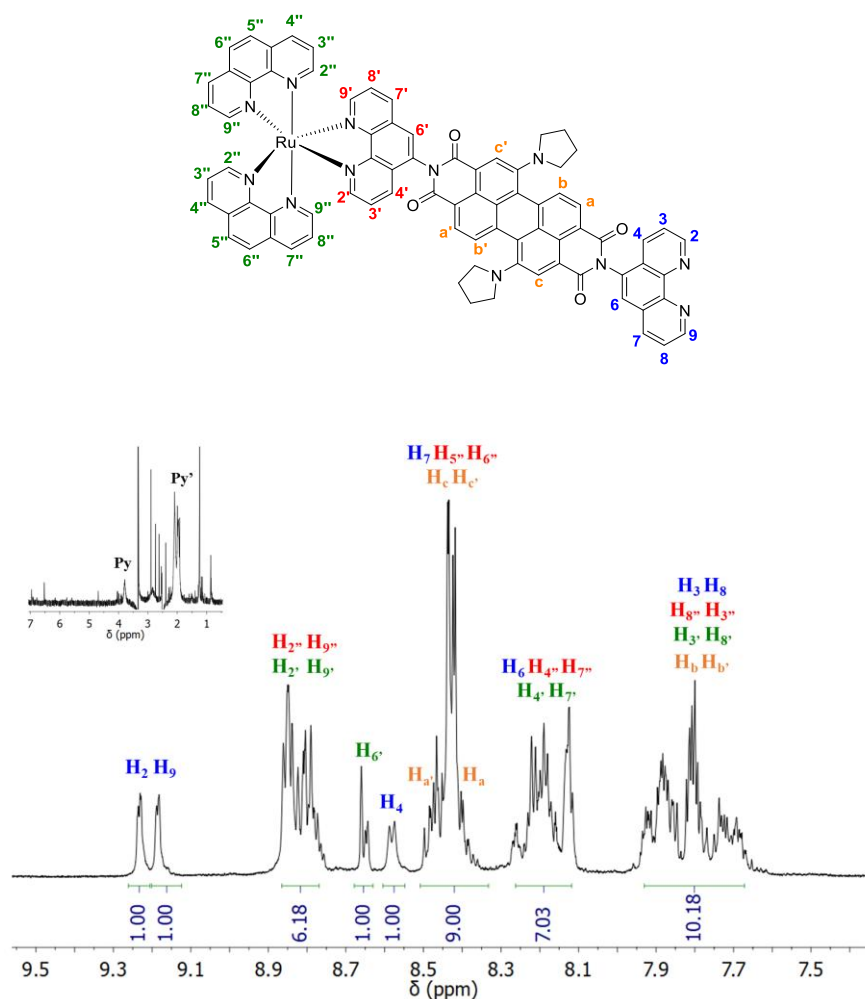


FIGURA 4.15 – Espectro de ^1H -RMN da díade RuPDI-Py em DMSO- d_6 (600 MHz) com as respectivas atribuições dos sinais dos prótons.

A FIGURA 4.16 demonstra a comparação entre espectros de ^1H -RMN da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. A díade RuPDI-Py apresentou uma gama maior de sinais de prótons aromáticos do que os seus precursores, todos em uma região muito próxima entre si. A coordenação ao centro metálico induziu a quebra de simetria da molécula PDI-Py, resultando no desdobramento dos sinais dos hidrogênios do núcleo do PDI-Py em seis sinais (H_a , $\text{H}_{a'}$, H_b , $\text{H}_{b'}$, H_c e $\text{H}_{c'}$), indicando que existem seis tipos diferentes de prótons aromáticos no núcleo do ligante. Os prótons $\text{H}_{a'}$, H_b e $\text{H}_{c'}$ localizados próximos a fenantrolina coordenada ao Ru(II) aparecem

deslocados em relação aos prótons da outra extremidade do anel, devido a desblindagem induzida pelo centro metálico. Os sinais dos prótons H_b e H_b' (entre 7,95 e 7,65 ppm) são fortemente blindados pelas pirrolidinas e aparecem deslocados em relação aos outros prótons aromáticos do núcleo PDI. O desdobramento observado é característico de moléculas de perileno assimétricas.^{135,136}

Os prótons das fenantrolinas foram separados em três conjuntos de sinais. A fenantrolina do ligante PDI-Py não coordenada (phen-PDI) apresentou sinais com deslocamentos químicos similares ao observado para o ligante livre. Da mesma maneira, as duas fenantrolinas coordenadas ao centro metálico Ru(II) (phen-Ru), representadas pelos símbolos H_n'' , apresentaram sinais com deslocamentos químicos similares ao observado no complexo referência $[Ru(phen)_3]^{2+}$. No entanto, os prótons da fenantrolina que atua como ponte entre o centro metálico e o núcleo do PDI-Py (phen-PDI-/Ru), representada pelos símbolos H_n' , apresentaram um pequeno deslocamento dos sinais para regiões de maiores ppm em relação aos precursores, devido a desblindagem induzida pelo centro metálico.

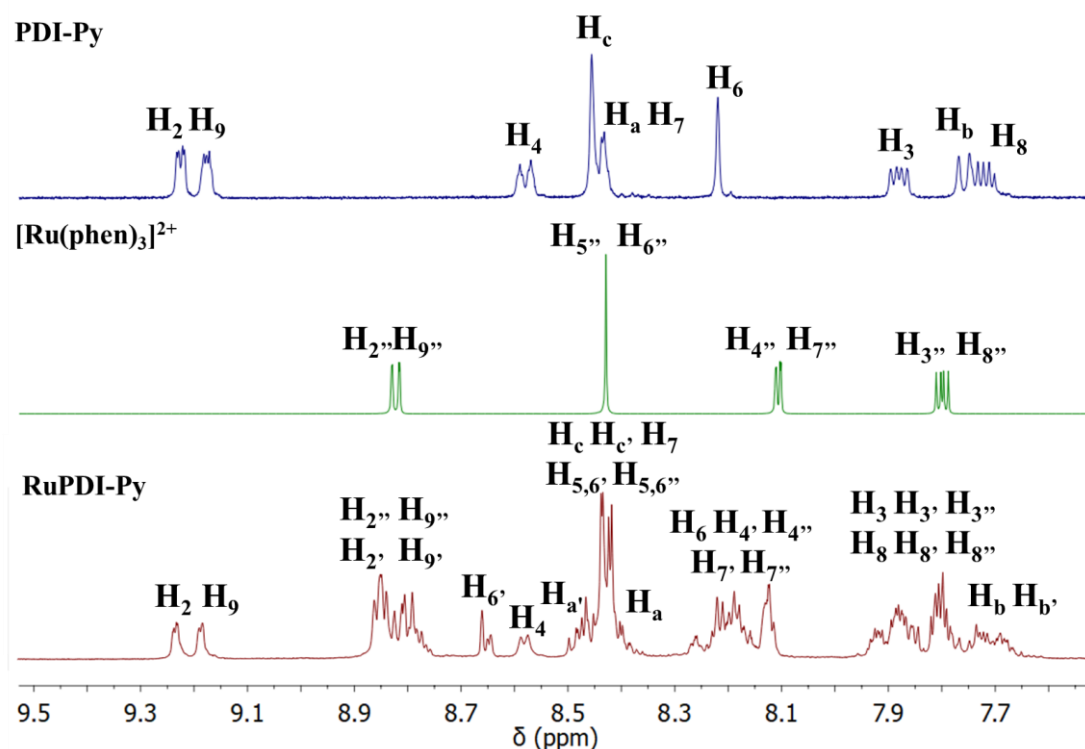


FIGURA 4.16 – Comparação entre espectros de ^1H -RMN (região aromática) da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO-d_6 (600 MHz).

O espectro de ^1H - ^1H COSY da díade RuPDI-Py está representado na FIGURA 4.17. Os prótons do núcleo do PDI exibiram a correlação $\text{H}_a/\text{H}_a' \leftrightarrow \text{H}_b/\text{H}_b'$ nas regiões entre 8,50-8,36 ppm / 7,95-7,65 ppm. Os prótons referentes à fenantrolina do ligante PDI-Py não coordenada apresentaram as correlações $\text{H}_2/\text{H}_9 \leftrightarrow \text{H}_3/\text{H}_8$, $\text{H}_4 \leftrightarrow \text{H}_3$ e $\text{H}_7 \leftrightarrow \text{H}_8$, similares ao ligante livre. Devido à grande sobreposição dos sinais dos dois conjuntos de fenantrolinas coordenadas ao Ru(II), as correlações de acoplamento ^1H - ^1H foram divididas em regiões e os acoplamentos observados foram $\text{H}_{2',2''}/\text{H}_{9',9''} \leftrightarrow \text{H}_{3',3''}/\text{H}_{8',8''}$ e $\text{H}_{4',4''}/\text{H}_{7',7''} \leftrightarrow \text{H}_{3',3''}/\text{H}_{8',8''}$.

Os acoplamentos C-H indicados no espectro ^1H - ^{13}C HSQC (FIGURA 4.18) demonstraram os deslocamentos químicos dos carbonos das duas

fenantrolinas coordenadas ao Ru(II), da fenantrolina do PDI-Py não coordenada e do núcleo do PDI permaneceram similares aos deslocamentos químicos observados no complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e no ligante livre PDI-Py. Por outro lado, os carbonos $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$ e $\text{C}_{9'}$ da fenantrolina ponte apresentaram um pequeno deslocamento em relação aos precursores. Conforme observado no espectro de ^1H - ^{13}C HMBC (FIGURA 4.19) os carbonos carbonílicos em 164 ppm interagem com os prótons H_a , H_c , $\text{H}_{a'}$ e $\text{H}_{c'}$ do núcleo do PDI-Py.

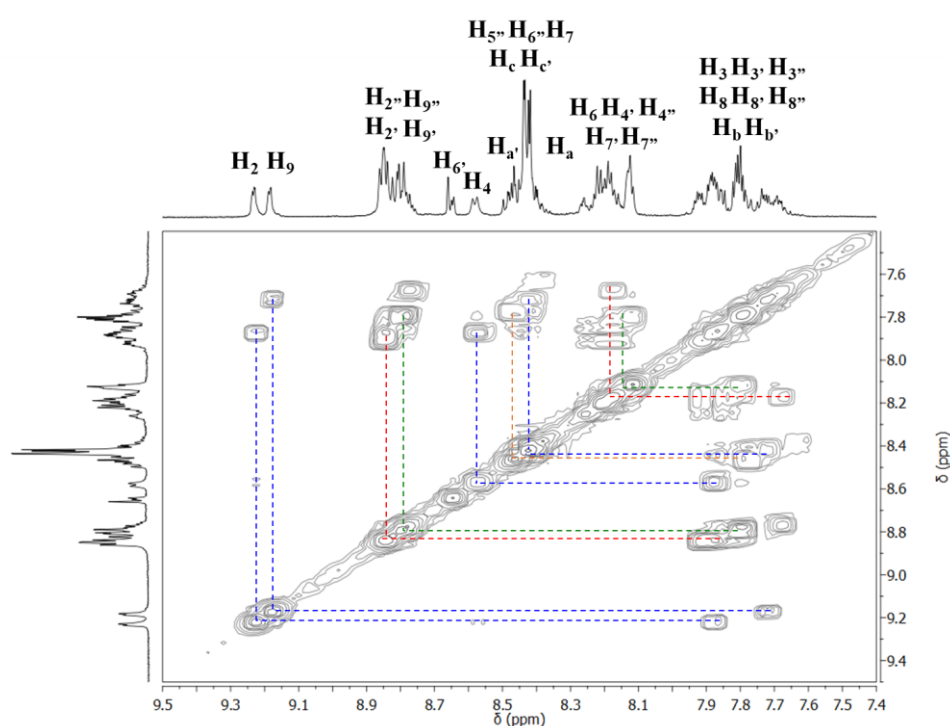


FIGURA 4.17 – Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO-d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^1H .

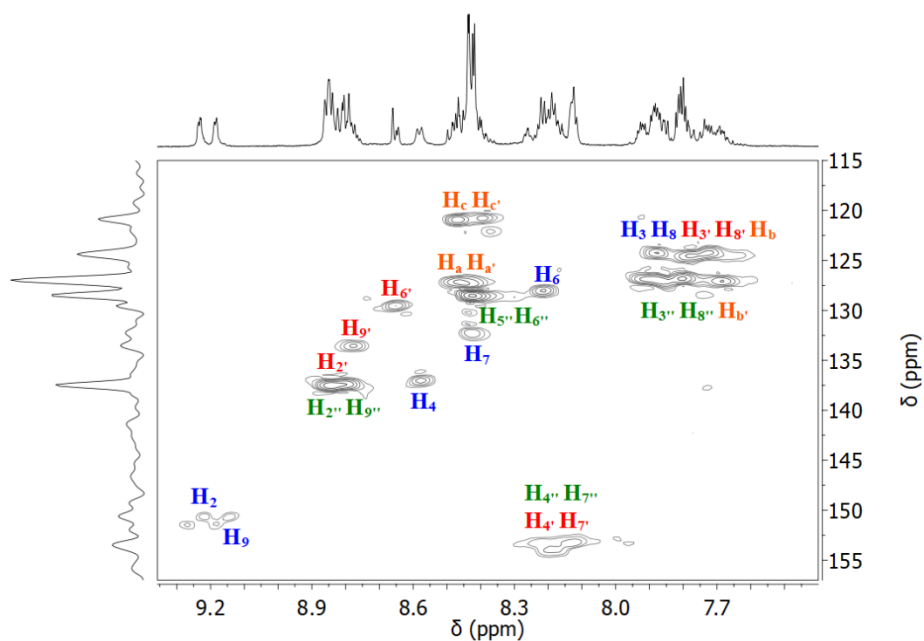


FIGURA 4.18 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HSQC (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C .

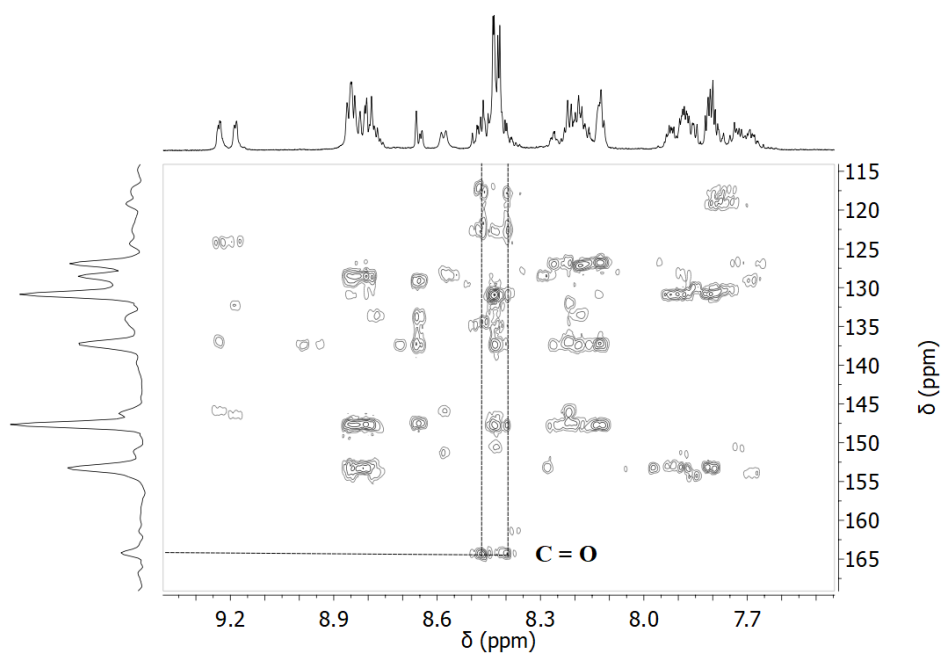


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ^1H - ^{13}C HMBC (região aromática) da díade RuPDI-Py (DMSO- d_6 , 600 MHz). As linhas tracejadas indicam os acoplamentos ^1H - ^{13}C .

4.2 – Propriedades eletroquímicas

As propriedades eletroquímicas da díade RuPDI-Py e do ligante PDI-Py foram analisadas nos solventes benzonitrila e acetonitrila utilizando as técnicas de voltametria cíclica (CV) e de voltametria de pulso diferencial (DPV). Os potenciais redox obtidos estão sumarizados na TABELA 4.4 e os voltamogramas são demonstrados na FIGURA 4.20.

TABELA 4.4 – Propriedades eletroquímicas da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em benzonitrila e em acetonitrila (MeCN). Os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) foram determinados a partir dos experimentos de CV.^a

Solvente	Composto	$E_{1/2}$ (V vs SCE)					
		Red ₁	Red ₂	Red ₃	Ox ₁	Ox ₂	Ox ₃
Benzonitrila	PDI-Py	-0,78	-0,87	-1,14	0,63	0,76	1,01
	RuPDI-Py	-0,72	-0,83	-1,16	0,66	0,78	1,06
MeCN	PDI-Py	-0,69	-0,81	-	0,67	0,79	-
	RuPDI-Py	-0,67	-	-	0,68	0,80	1,35
	$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	-1,41 ^b					1,40 ^b

^a O Ferroceno foi utilizado como padrão interno para correção do eletrodo de referência (+0,43 V vs SCE em benzonitrila; +0,40 V vs SCE em MeCN¹²⁵).

^b Valores obtidos da referência Montalti et. al, 2006.⁶⁴

O ligante PDI-Py exibiu duas reduções reversíveis em -0,78 e -0,87 V vs SCE e duas oxidações reversíveis em +0,63 e +0,76 V vs SCE em benzonitrila, semelhantes ao relatado na literatura para derivados do PDI bay-substituídos com pirrolidina.^{68,123} A introdução dos grupos pirrolidinil no centro

do anel do PDI induziu a um potencial de oxidação no ligante PDI-Py que não foi observado anteriormente no ligante pPDIp não-substituído no núcleo, o qual exibiu apenas potenciais de redução (-0,54 e -0,81 V vs SCE em DMF).⁷³ Isso ocorre devido ao forte caráter doador de elétrons do substituinte pirrolidina.²

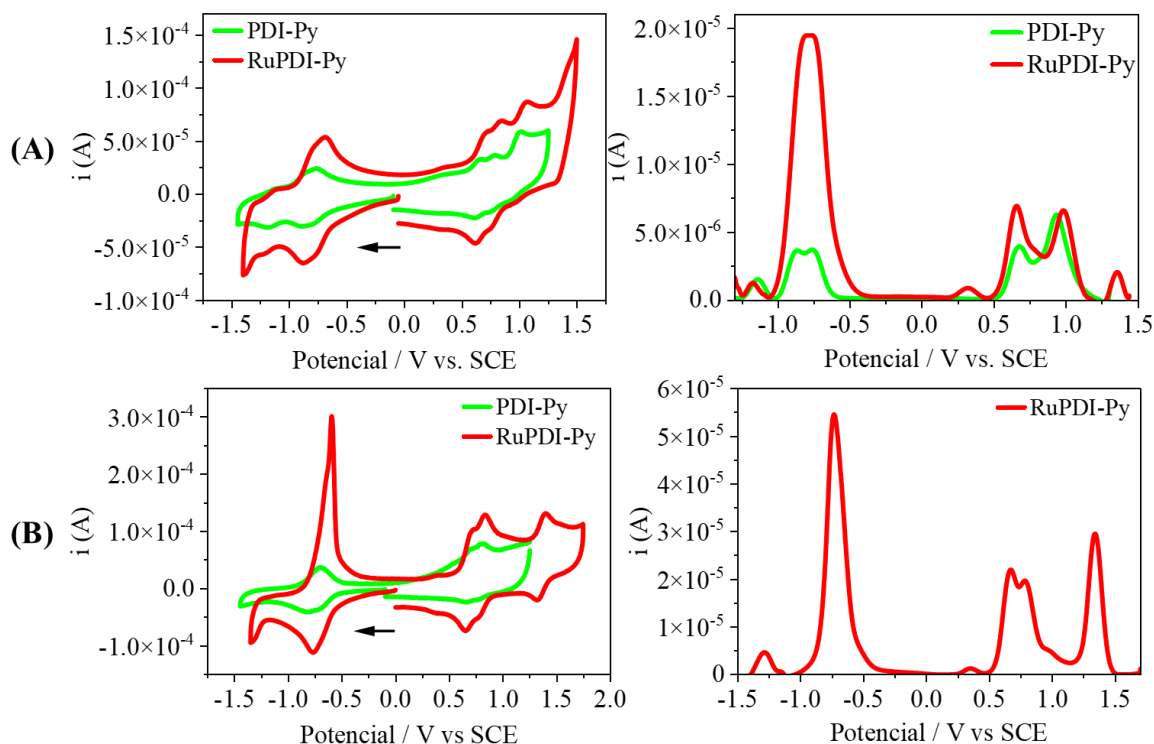


FIGURA 4.20 – Voltamogramas cíclicos (esquerda) e voltamogramas de pulso diferencial (direita) da díade RuPDI-Py e do ligante PDI-Py em (A) benzonitrila e em (B) acetonitrila. Velocidade de varredura: 2 V/s, o Ferroceno foi utilizado como padrão interno para correção do eletrodo de referência.

A díade RuPDI-Py não apresentou mudanças significativas nos potenciais redox das componentes {PDI-Py} e {Ru(phen)₃} em comparação com os componentes individuais. Por exemplo, em benzonitrila a díade exibiu duas reduções reversíveis em -0,72 e -0,83 V vs SCE e as duas oxidações reversíveis em +0,66 e +0,78 V vs SCE, atribuídos aos processos de redução e de oxidação

da componente {PDI-Py}. Além disso, a díade RuPDI-Py exibiu uma oxidação reversível de um elétron em +1,35 V vs SCE em acetonitrila, atribuído ao par redox $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$. O potencial de oxidação do par $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ na díade RuPDI-Py diminui quando comparado ao potencial do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (+1,40 V vs SCE⁶⁴). Medições na janela de potencial de redução em acetonitrila não foram possíveis devido à adsorção da díade na superfície do eletrodo.

Os dados eletroquímicos demonstraram que a primeira redução e a primeira oxidação na díade são localizadas na componente {PDI-Py} e, conseqüentemente, essa componente é capaz de atuar como aceptora e/ou doadora de elétrons. Esses resultados diferem do observado anteriormente para a díade referência $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$, na qual a componente {pPDIp} atuava somente como uma forte receptora de elétrons.⁷³

Com base nos dados de CV¹³⁷ a energia dos orbitais HOMO e LUMO foram estimadas para o ligante PDI-Py e para a díade RuPDI-Py e os valores estão descritos na TABELA 4.5. O ligante e a díade apresentaram os orbitais HOMO com energias similares. Combinando os valores de HOMO com os valores do *bandgaps* ópticos (E_g^{opt}), as energias dos orbitais LUMO também foram similares em ambos os compostos. Esses resultados indicaram que a coordenação ao centro metálico de Ru(II) não induziu a mudanças significativas na energia dos orbitais de fronteira.

A energia do estado de separação de cargas (CS) foi estimada pela diferença entre o primeiro potencial de oxidação do doador e o primeiro potencial de redução do receptor de elétrons $[E_{CS} = E_{1ox}(D) - E_{1red}(R)]$.⁶⁸ Para a díade em acetonitrila, o estado CS de menor energia pode ser previsto como {Ru(III)-(PDI-Py^{•-})} com energia de 2,04 eV ou como Ru(II)^{•-}-(PDI-Py^{•+}) com energia de 2,08 eV. Resultados semelhantes foram observados para díades de Ru(II)-PDI⁶⁸ e sugerem que independentemente de qual componente da díade atue como um

doador ou receptor de elétrons, isto é, independente da direção da transferência de carga na díade, o estado CS tem a mesma energia.

TABELA 4.5 – Energias dos orbitais HOMO e LUMO estimados por voltametria cíclica.

Composto	E_{onset}^{ox} (V) ^a	HOMO (eV) ^b	LUMO (eV) ^c	E_g^{ele} (eV)	E_g^{opt} (eV) ^c
PDI-Py	0,51	-3,97	-2,42	1,55	1,55
RuPDI-Py	0,59	-3,89	-2,40	1,49	1,49

^a E_{onset}^{ox} = início do potencial de oxidação;

^b Calculado utilizando as equações empíricas: $HOMO = -(4.48 + E_{onset}^{ox})$ e $LUMO = HOMO + E_g^{opt}$;¹³⁷

^c Estimado a partir do comprimento de onda que corresponde ao início da banda de absorção ($E_g^{opt} = 1240/\lambda_{onset}$).

4.2.1 – Espectroeletróquímica

Os estudos espectroeletróquímicos da díade RuPDI-Py e do ligante PDI-Py foi realizado em solução de MeCN para caracterizar espectroscopicamente as espécies oxidadas e reduzidas e auxiliar na identificação desses íons nos espectros de absorção transiente decorrentes da transferência de elétrons fotoinduzida.

A FIGURA 4.21 mostra que após redução o ligante e a díade apresentaram o consumo das bandas de absorção em 440 nm e 715 nm e o crescimento de novas bandas em 815 nm e 920 nm. Esses resultados são consistentes com a formação do ânion radical de derivados do PDI bay-substituídos com pirrolidina (PDI-Py^{•-}).^{124,138} Por outro lado, a oxidação da díade

RuPDI-Py resultou no consumo das bandas de absorção em 440 nm e 715 nm concomitante com o crescimento das novas bandas em 890 nm e 1030 nm, associadas à formação do cátion radical de derivados do PDI bay-substituídos com pirrolidina (PDI-Py \bullet^+).^{25,123} A formação do cátion PDI-Py \bullet^+ não foi observada no ligante livre PDI-Py, independente do potencial de oxidação aplicado (+0,8 - +1,2 V).

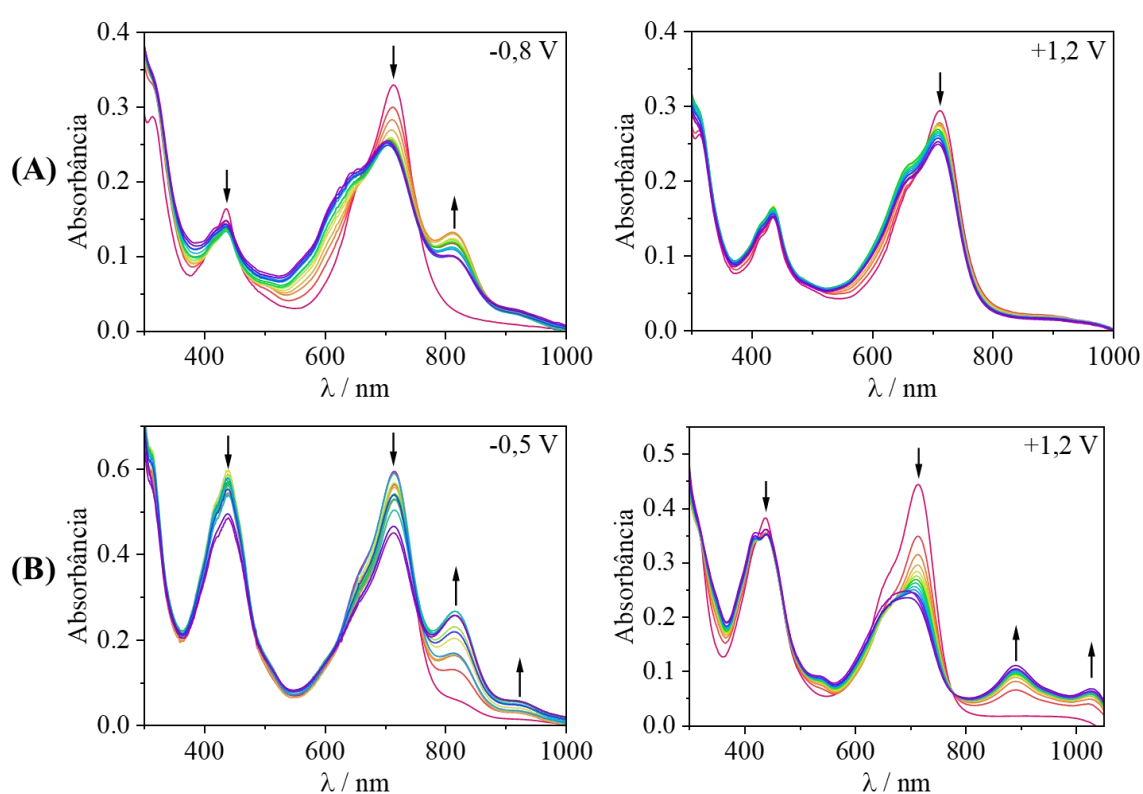


FIGURA 4.21 – Espectros de absorção UV-Vis do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py em solução de MeCN/TBAPF₆ obtidos durante os experimentos de espectroeletróquímica.

4.3 – Propriedades fotofísicas em DMSO

4.3.1 – Espectroscopia de UV-Vis e de Luminescência

As propriedades fotofísicas da díade RuPDI-Py foram avaliadas em solução de DMSO e comparadas com as propriedades do ligante PDI-Py e do complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Os resultados obtidos estão sumarizados na TABELA 4.6 e na FIGURA 4.22.

TABELA 4.6 – Propriedades fotofísicas do ligante PDI-Py, da díade RuPDI-Py e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$).

Composto	λ_{max} Abs, nm ($\epsilon, \text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} Emissão, nm	τ_{EM} , ns	$\Phi_{\text{fl/ph}}$
PDI-Py	435 (9.300)	767	1,75	0,03
	720 (20.685)			
RuPDI-Py	435 (30.108)	776	1,50	
	720 (33.925)			
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	450 (10.447)	610	804	0,22

O espectro de absorção do ligante livre PDI-Py (FIGURA 4.22A) foi caracterizado por duas bandas de absorção com máximos em 420 nm e 720 nm atribuídas às transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_2$ e $S_0 \rightarrow S_1$, respectivamente. Esses resultados são consistentes com os espectros de absorção relatados na literatura para derivados do PDI bay-substituídos com pirrolidina descritos na Seção 1.1.^{18,19,132} A substituição nas posições bay resultou no deslocamento batocrômico dos máximos de absorção ($\sim 185 \text{ nm}$) e na perda das três bandas de absorção com

características vibrônicas observadas no ligante pPDIp sem o substituinte no centro do anel.⁷³

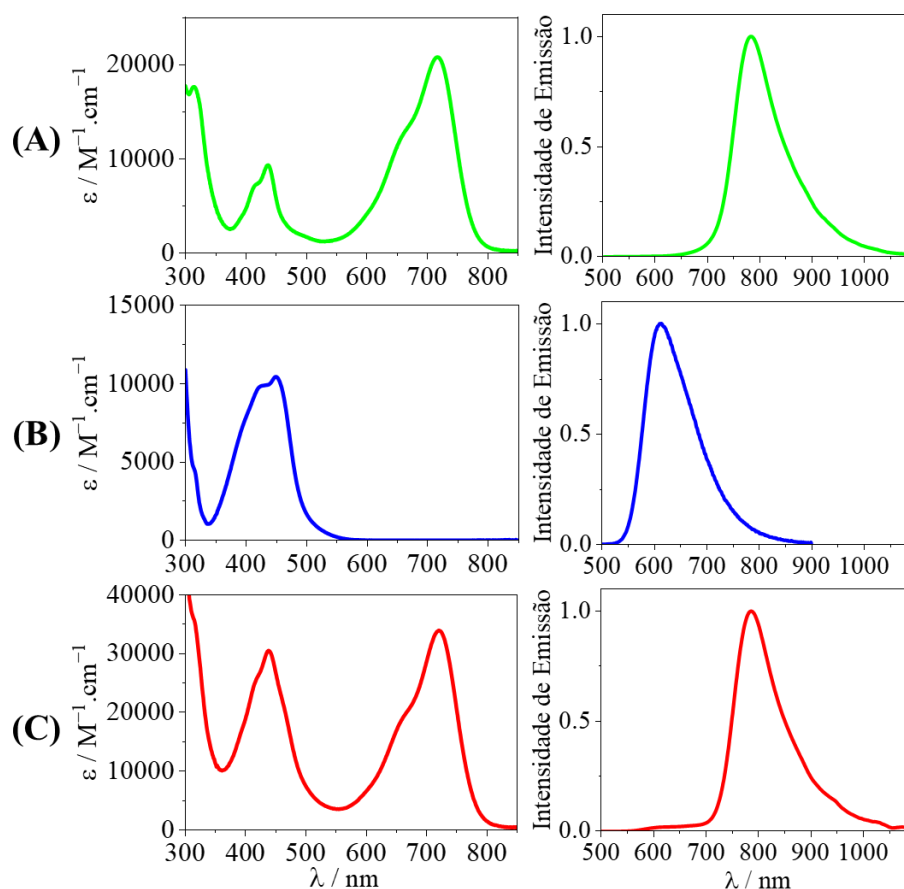


FIGURA 4.22 – Espectros de absorção (esquerda) e de emissão (direita) do (A) ligante PDI-Py, do (B) complexo $[Ru(phen)_3]^{2+}$ e da (C) díade RuPDI-Py em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu M$ e $\lambda_{EX} = 420$ nm).

O ligante PDI-Py apresentou uma ampla banda de emissão entre 660-1020 nm com máximo em 780 nm, atribuída à fluorescência do estado excitado singlete (S_1). O espectro de emissão não demonstrou dependência da presença de oxigênio e o espectro de excitação apresentou perfil similar ao espectro de absorção (FIGURA 4.23). O tempo de vida de fluorescência ($\tau_{fl} = 1,75$ ns) (FIGURA 4.24) e o rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_{fl} = 0,03$) foram menores do que os observados para o pPDIp ($\tau_{fl} = 3,5$ ns e $\Phi_{fl} = 0,97$ em DMF).⁷³

De acordo com a literatura^{18,19,123} derivados do PDI bay-substituídos com pirrolidina possuem baixos rendimentos quânticos de fluorescência e curtos tempos de vida de fluorescência em solventes polares, devido ao caráter de transferência de carga intramolecular (CT) do estado excitado de menor energia.

O espectro de absorção do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO (FIGURA 4.22-B) exibiu uma banda de absorção larga entre 350-500 nm com o máximo em 450 nm ($\epsilon = 17.200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), atribuída à transição $S_0 \rightarrow {}^1\text{MLCT}$ ($\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$). O espectro de emissão apresentou uma banda com máximo em 605 nm ($\Phi_{\text{ph}} = 0,22$, $\tau_{\text{ph}} = 804 \text{ ns}$), atribuída à fosforescência do estado ${}^3\text{MLCT}$.

O espectro de absorção da díade RuPDI-Py (FIGURA 4.22-C) preservou a banda de absorção de menor energia do ligante PDI-Py em 720 nm ($\epsilon = 33.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) atribuída à transição $S_0 \rightarrow S_1$, enquanto a banda de absorção em 440 nm ($\epsilon = 29.500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi caracterizada pela sobreposição das transições $S_0 \rightarrow S_2$ do PDI-Py e $S_0 \rightarrow {}^1\text{MLCT}$ do $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. O espectro de emissão da díade RuPDI-Py apresentou uma banda com máximo em 790 nm similar à fluorescência do ligante PDI-Py, que manteve o perfil independente do comprimento de onda de excitação (350-700 nm) e da presença de oxigênio em solução. No entanto, houve uma redução do tempo de vida de fluorescência para $\tau_{\text{fl}} = 1,50 \text{ ns}$ (FIGURA 4.24) quando comparado com o ligante livre. O espectro de excitação em $\lambda_{\text{EM}} = 780 \text{ nm}$ demonstrou perfil similar ao espectro de absorção do PDI-Py (FIGURA 4.23). Esses resultados indicaram que a emissão da díade ocorre exclusivamente a partir fluorescência do estado excitado S_1 da componente $\{\text{PDI-Py}\}$ (${}^1\text{PDI-Py}$).

Notavelmente, a emissão intensa na região de $\sim 600 \text{ nm}$ e com longo tempo de vida proveniente do estado ${}^3\text{MLCT}$ da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ foi completamente suprimida na díade em todos os solventes orgânicos avaliados (como será demonstrado posteriormente na seção 4.3). Esses resultados diferem daqueles observados anteriormente para a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{73}$ que

apresentou a emissão de ambas as componentes $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ e $\{\text{pPDIp}\}$. A supressão da $^3\text{MLCT}$ na nova díade provavelmente resulta de interações intramoleculares entre os estados excitados dos componentes $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ e $\{\text{PDI-Py}\}$.^{25,139}

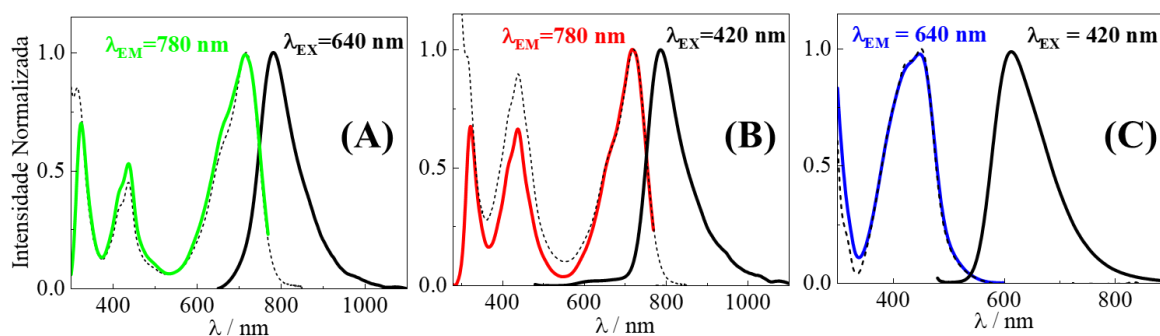


FIGURA 4.23 – Comparação entre os espectros de emissão (linha sólida preta), excitação (colorido) e absorção (linha tracejada) do (A) ligante PDI-Py, da (B) díade RuPDI-Py e do (C) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$).

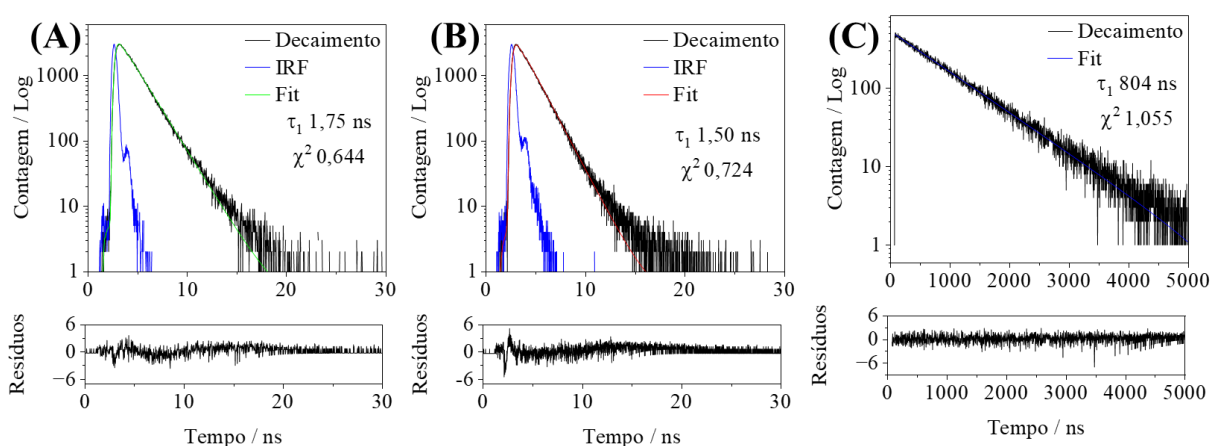


FIGURA 4.24 – Perfis dos decaimentos dos tempos de vida de emissão dos compostos (A) PDI-Py e (B) RuPDI-Py com $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 640/780 \text{ nm}$ e do (C) complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ com $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}} = 405/600 \text{ nm}$, em solução de DMSO desaerada ($c = 20 \mu\text{M}$)

Para avaliar a eficiência da fluorescência do estado excitado $^1\text{PDI-Py}$, as intensidades de emissão da díade e do ligante livre foram comparadas utilizando soluções com absorvância igual a 0,1 nos comprimentos de onda de excitação (FIGURA 4.25). Os resultados obtidos demonstraram que quando a componente $\{\text{PDI-Py}\}$ foi seletivamente excitada em 640 nm a intensidade de fluorescência do $^1\text{PDI-Py}$ foi a mesma na díade e no ligante livre. No entanto, usando excitação em 420 nm, onde a fração da luz absorvida corresponde à 60% pela componente $\{\text{PDI-Py}\}$ e à 40% pela componente $\{\text{Ru(phen)}_3\}$, o rendimento quântico de fluorescência do estado $^1\text{PDI-Py}$ na díade diminuiu 25% em comparação com o ligante PDI-Py. Esses resultados sugeriram que quando a díade foi excitada na região onde somente a componente $\{\text{PDI-Py}\}$ absorveu luz, a fluorescência $^1\text{PDI-Py}$ predominou as vias de decaimento e não houve interações significativas entre as componentes $\{\text{PDI-Py}\}$ e $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ no estado excitado.

Por outro lado, quando a díade foi excitada onde ambas as componentes absorvem luz, a fluorescência PDI-Py é promovida apenas pela luz absorvida diretamente pela componente $\{\text{PDI-Py}\}$ e não pela excitação da componente $\{\text{Ru(phen)}_3\}$. A supressão da fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$ da componente $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ pode ser resultante de processos de transferência de energia e/ou de transferência de elétrons no estado excitado entre as componentes $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ e PDI-Py}.

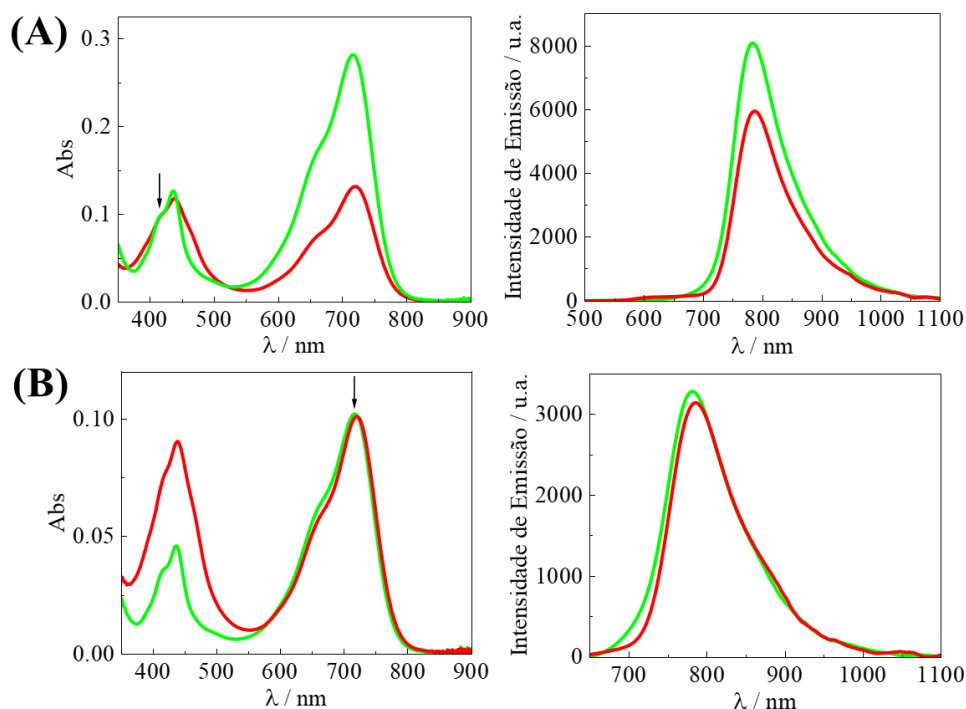


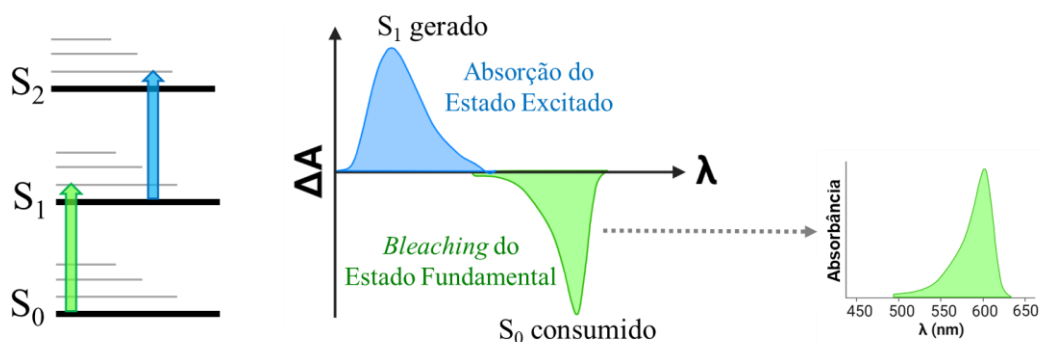
FIGURA 4.25 – Comparação das intensidades de emissão do ligante PDI-Py (verde) e da díade RuPDI-Py (vermelho) em DMSO utilizando soluções com absorvância igual a 0,1 nos comprimentos de onda de excitação (A) $\lambda_{EX} = 420$ nm e (B) $\lambda_{EX} = 720$ nm (soluções aeradas).

4.3.2 – Espectroscopia de absorção transiente (TA)

A técnica de espectroscopia de absorção transição (TA) na escala de tempo de femtossegundo (fs) e de nanossegundo (ns) foi utilizada para investigar as propriedades dos estados excitados do ligante PDI-Py, da díade RuPDI-Py e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO e obter informações sobre os processos de supressão da fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$.

Na técnica de TA uma fração das moléculas é promovida para um estado eletrônico excitado por meio de um pulso de bombeamento (*pump*) gerando as espécies transientes. Um pulso de luz branca de baixa intensidade é utilizado para a sondagem (*probe*), o qual irá induzir transições eletrônicas do

estado transiente para os estrados eletrônicos de maiores energias, como representado no ESQUEMA 4.7. O espectro de absorção transiente ilustra a diferença entre o espectro de absorção da amostra excitada e o espectro de absorção da amostra no estado fundamental (ΔA). O sinal positivo no espectro ΔA corresponde à absorção do estado excitado e o sinal negativo corresponde à absorção do estado fundamental (usualmente chamada de *bleach*) que é observada na região de comprimentos de onda similares ao espectro de absorção UV-vis. Alterando o tempo de atraso τ entre o pulso de bombeamento e o pulso de sondagem, um espectro de ΔA é registrado a cada atraso de tempo, resultando na variação dos espectros ΔA em função do tempo τ e do comprimento de onda λ , ou seja, $\Delta A(\lambda, \tau)$. A partir da relação $\Delta A(\lambda, \tau)$ é possível obter informações sobre as populações e sobre os processos de desativação dos estados excitados, incluindo processos de transferência de elétrons e de energia, cruzamento intersistemas, solvatação, entre outros.^{106,140,141}



ESQUEMA 4.7 – Esquema simplificado do processo de absorção transiente e do perfil do espectro de absorção transiente.

Os comprimentos de onda de excitação selecionados para os experimentos de TA foram de 355 nm e de 420 nm, onde ambas as componentes

{PDI-Py} e {[Ru(phen)₃]²⁺} absorvem luz, e de 720 nm onde apenas a componente {PDI-Py} absorve luz.

4.3.2.1 – Ligante PDI-Py

Os espectros de TA na escala de tempo de fs do ligante PDI-Py são demonstrados na FIGURA 4.26. Em ambos os comprimentos de excitação analisados, 450 e 720 nm, os espectros de TA foram caracterizados pelas absorções positivas em 480 e 963 nm que correspondem à absorção do estado excitado e estendem-se até 1600 nm, e por bandas negativas em 720 e 770 nm atribuídas ao consumo da absorção do estado fundamental e à emissão estimulada, respectivamente. Os pontos isobésticos observados em 680 e 840 nm indicaram a presença de ao menos um processo no estado excitado.

A cinética de decaimento dos sinais TA após a excitação em 720 nm foi caracterizada pelas constantes de tempo τ_1 de 1,4 ns em todas as regiões do espectro, valor próximo ao tempo de vida de fluorescência ($\tau_{fl} = 1,75$ ns), e τ_2 de 10 ps na região do NIR, que pode ser decorrente do relaxamento induzido pelo solvente. Dinâmicas espectrais semelhantes foram observadas após a excitação em 450 nm; no entanto, a constante de tempo curta τ_2 de 10 ps também foi observada na região do visível, podendo ser atribuída à conversão interna (IC) dos estados $S_2 \rightarrow S_1$. As características espectrais dos sinais de TA juntamente com as constantes de tempo indicaram que no ligante PDI-Py, independente do comprimento de onda de excitação, o estado excitado gerado foi o estado singlete ¹*PDI-Py. As características do estado excitado tripleto do PDI-Py não foram observadas nos experimentos de TA nas escalas de tempo de fs ou de ns. O espectro de TA do PDI-Py foi semelhante ao relatado para os estados excitados singletos de derivados do PDI substituídos com pirrolidina.^{25,71,124,142,143}

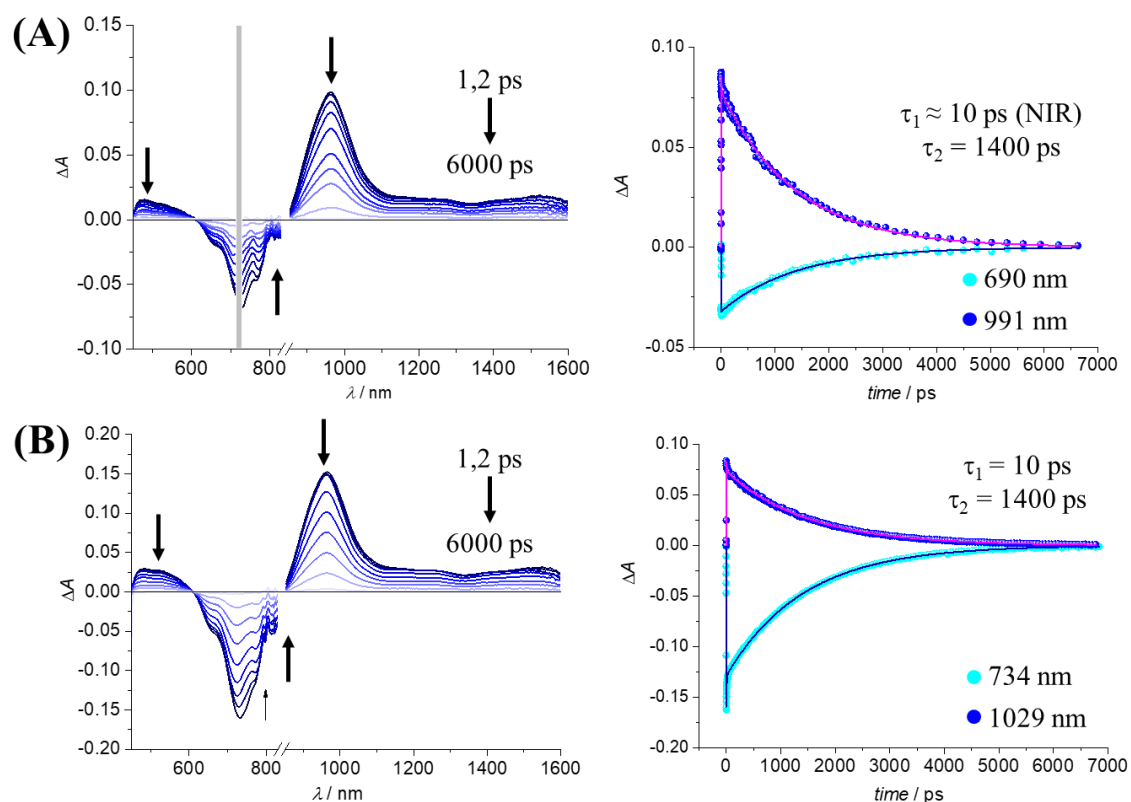
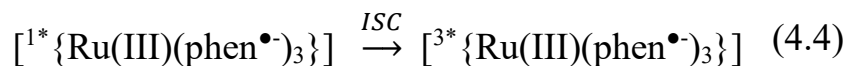


FIGURA 4.26 – Espectros de absorção transiente de fs do ligante PDI-Py em DMSO com λ_{EX} de (A) 720 nm e (B) 450 nm e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.

4.3.2.2 – Complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$

O espectro de TA do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ na escala de tempo de fs (FIGURA 4.27A) demonstrou uma banda de absorção positiva ampla e de baixa intensidade na região entre 500 e 1200 nm simultaneamente com o consumo da absorção do estado fundamental em ~ 450 nm. Os sinais de TA não decaíram completamente na janela temporal da técnica, indicando que a cinética de decaimento apresenta constantes de decaimento maiores que 6000 ps. O espectro de TA na escala de tempo de ns foi coletado para investigar as propriedades das

espécies excitadas com tempos de vida longos e está representado na FIGURA 4.27B. Após a excitação em 355 nm, o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentou a absorção transiente típica do estado $^3\text{MLCT}$ de complexos polipiridínicos de Ru(II),¹⁴⁴ com o consumo do estado fundamental em 480 nm simultaneamente à formação da absorção positiva em 520 nm. A cinética de decaimento dos sinais TA foi caracterizada por um decaimento biexponencial com as constantes de tempo τ_1 de 780 ns, que está de acordo com o tempo de vida da fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$ ($\tau_{\text{ph}} = 800$ ns), e τ_2 de 51 μs em todas as regiões do espectro. Esses resultados indicaram que a excitação em 355 nm ou 450 nm promoveu o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ para o estado $^1\text{MLCT}$ e o rápido cruzamento intersistemas (<300 fs) gerou o estado $^3\text{MLCT}$, conforme descritos nas Equações 4.3 a 4.5.



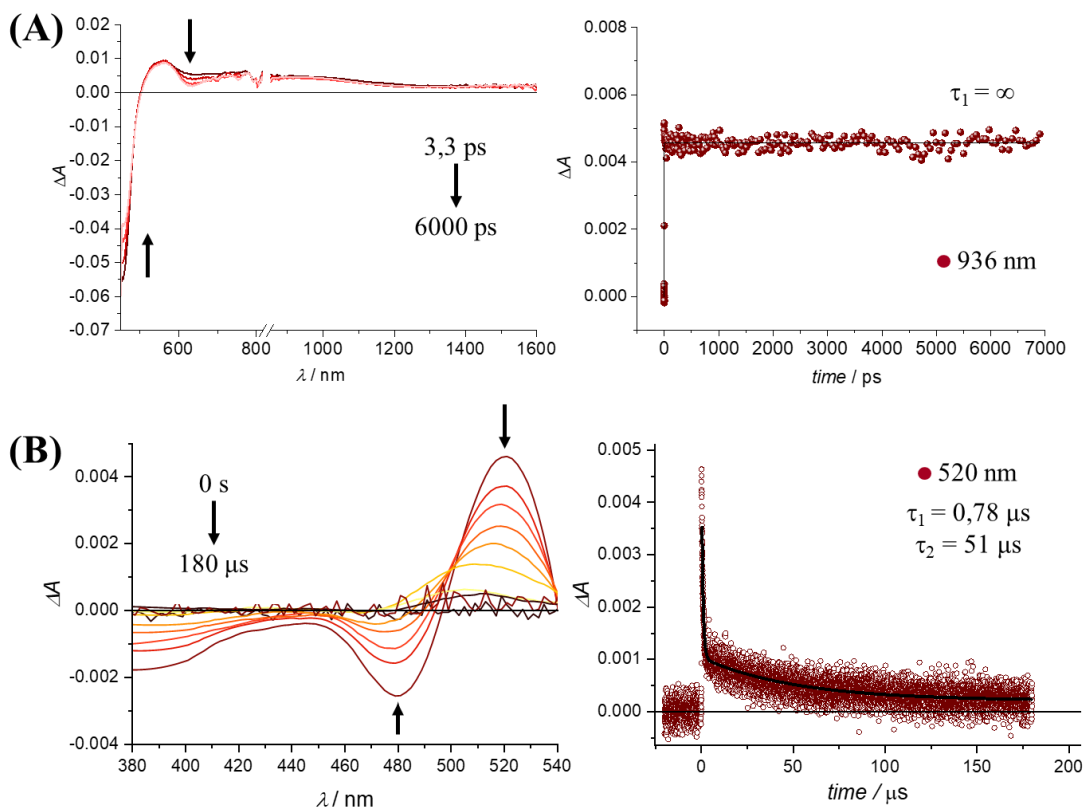


FIGURA 4.27 – Espectros de absorção transiente do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO obtidos na escala de tempo de (A) femtossegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e de (B) nanosegundo com $\lambda_{\text{EX}} = 355 \text{ nm}$, com as cinéticas de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.

4.3.2.3 – Díade RuPDI-Py

O espectro de TA da díade RuPDI-Py na escala de tempo de fs obtido após a excitação seletiva do componente {PDI-Py} em 720 nm (FIGURA 4.28) exibiu características espectrais idênticas às observadas no ligante PDI-Py, indicando a formação do estado excitado singlete $^1\text{PDI-Py}$. A cinética de decaimento foi caracterizada pela constante de tempo τ_1 de 1,3 ns, ligeiramente menor quando comparada ao ligante PDI-Py, porém, a redução do tempo de vida

da fluorescência da díade também foi observada nos experimentos de luminescência ($\tau_{fl} = 1,50$ ns). Os resultados obtidos no estado estacionário e nas técnicas espectroscópicas resolvidas no tempo após a excitação em 720 nm indicaram a absorção de luz e a emissão somente pela componente {PDI-Py}, conforme indicado nas Equações 4.6 e 4.7.

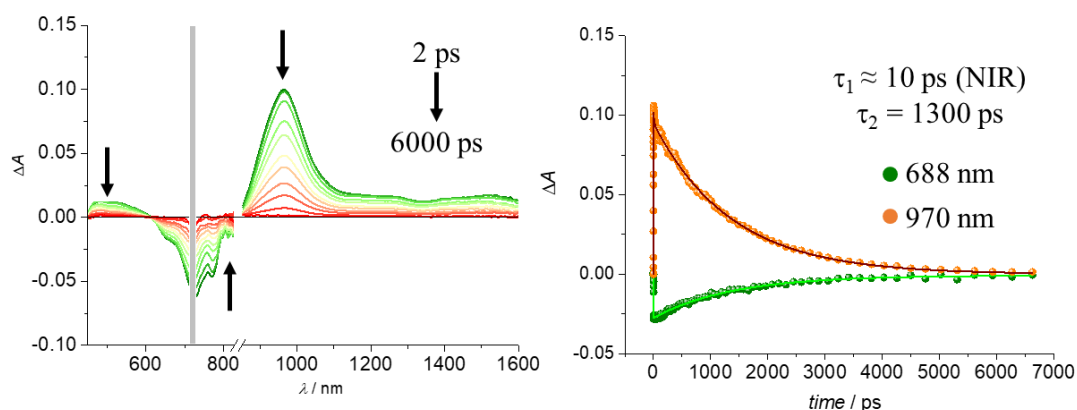
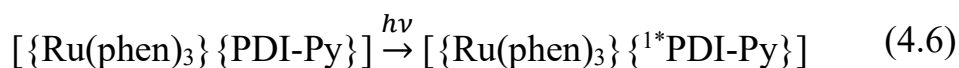


FIGURA 4.28 – Espectro de absorção transiente de fs da díade RuPDI-Py em DMSO com λ_{EX} de 720 nm e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.

A excitação da díade RuPDI-Py em 450 nm resultou em espectros de TA diferentes dos obtidos com a excitação em 720 nm. As mudanças espectrais estão representadas na FIGURA 4.29 e foram divididas em três processos com diferentes intervalos de tempo. O espectro de TA obtido logo após o pulso de laser (FIGURA 4.29A) demonstrou uma ampla banda absorção positiva em 534 nm, atribuída à absorção do estado excitado $^3\text{MLCT}$ da componente {Ru(phen)₃}

(idêntico ao espectro de TA da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, FIGURA 4.27). Adicionalmente, o espectro mostrou características do estado S_1 da componente $\{\text{PDI-Py}\}$, no entanto, o consumo do estado fundamental em 730 nm apresentou uma banda menos estruturada com a ausência da emissão estimulada em 770 nm quando comparado ao ligante livre. Na escala de tempo inicial (0,627 – 2,59 ps), a absorção em 534 nm permaneceu constante e na região de 650-1100 nm não foram observadas mudanças espectrais significativas.

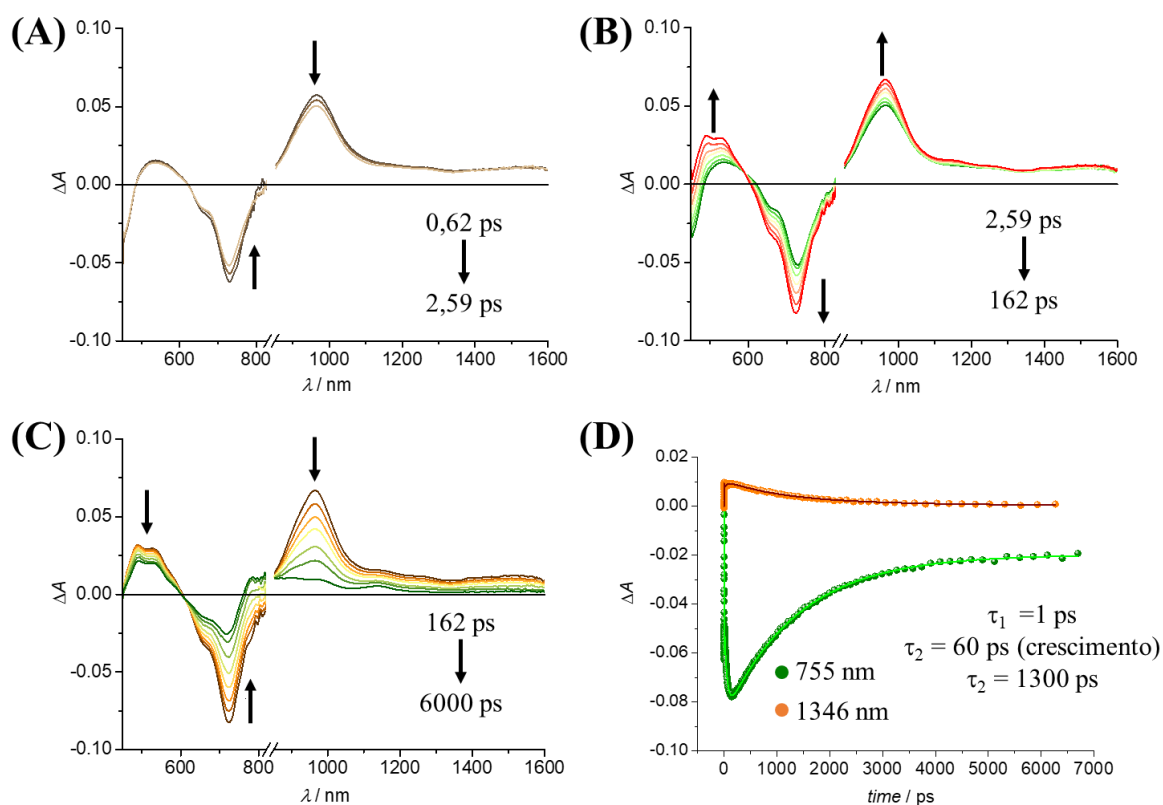


FIGURA 4.29 – Espectro de absorção transiente de fs da díade RuPDI-Py em DMSO com λ_{EX} de 450 nm com os tempos de atraso indicados nos perfis de absorção e a cinética de decaimento dos sinais TA com os ajustes associados aos dados.

Durante os 162 ps seguintes (FIGURA 4.29B), as mudanças espectrais foram caracterizadas pela transformação da banda positiva na região de 450 – 600 nm em uma banda estruturada simultaneamente com o aumento da absorção do estado fundamental e da absorção positiva na região NIR. A constante de tempo deste processo de crescimento foi de $\tau_1 = 60$ ps em todo o espectro e o ponto isobéstico em 580 nm indicou a interdependência das duas espécies envolvidas na absorção.

Em uma escala de tempo mais longa (162 – 6000 ps) (FIGURA 4.29C), a absorção positiva na região NIR decaiu com a mesma cinética observada para a excitação de 450 nm ($\tau_2 = 1,3$ ps), indicando o decaimento do estado $^1PDI-Py$. No entanto, o último espectro exibiu uma pequena absorção positiva em 800 nm, provavelmente indicando a geração de um estado intermediário de separação de cargas (CS) $\{Ru^{3+}-(PDI-Py^{\cdot-})\}$, considerando que o ânion radical de perileno diimida substituído por pirrolidina é caracterizado por uma banda de absorção característica em 800 nm, conforme observado nos nossos experimentos de espectroeletrólquímica (Seção 4.2.1) e relatado na literatura para derivados de perileno com estruturas moleculares semelhantes.¹²⁴ A absorção na região de 450 – 600 nm e o consumo do estado fundamental não decaíram completamente nessa janela temporal, resultando em um espectro que permaneceu em escalas de tempo mais longas.

Os experimentos de TA com escala de tempo de ns foram realizados para obter informações sobre os estados excitados com tempos de vida longos e estão ilustrados na FIGURA 4.30. Inicialmente, o espectro apresentou uma banda de absorção positiva estruturada entre 450 e 600 nm simultânea ao consumo do estado fundamental entre 600 e 700 nm. Ao decorrer do tempo, a absorção positiva perdeu a característica estruturada, transformando-se um ombro largo. Além disso, o ponto isobéstico em 564 nm indicou a interdependência das duas espécies envolvidas na absorção transiente. A partir da análise global, obteve-se uma

cinética de decaimento biexponencial com os espectros de decaimento associados ao estado CS $\{Ru^{3+}-(PDI-Py^{\bullet-})\}$ com a constante de tempo τ_1 de 4 μs (que corresponde à 30% do todo o decaimento) e ao estado tripleto $^3PDI-Py$ com a constante de tempo τ_2 de 36 μs . Os espectros obtidos apresentaram características espectrais e tempos de vida compatíveis com os estados de CS e tripleto de compostos derivados de PDI bay-substituídos.^{25,124,143}

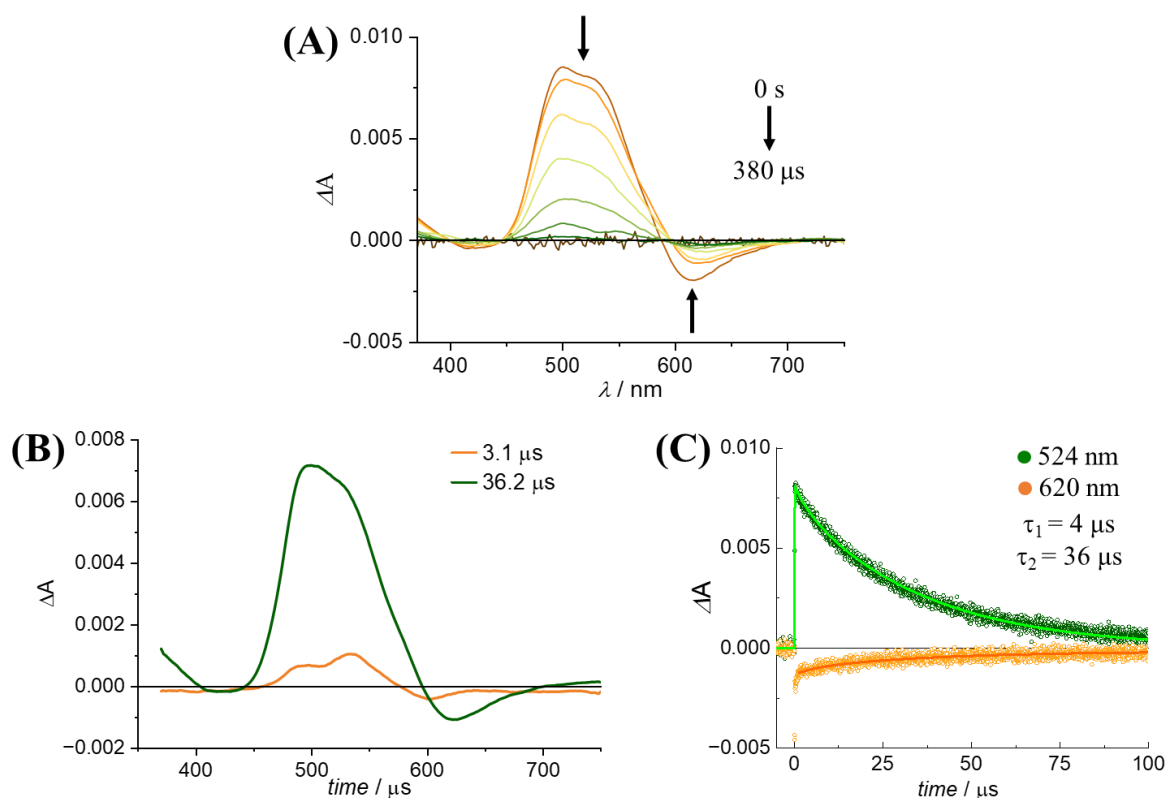
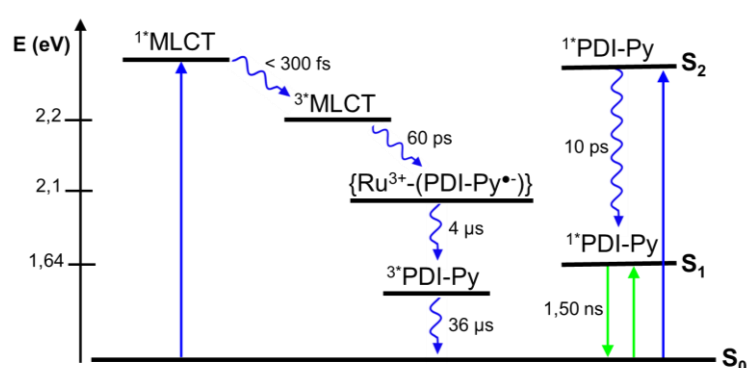


FIGURA 4.30 – (A) Espectro de absorção transiente de ns da díade RuPDI-Py em DMSO (solução desaerada) com λ_{EX} de 355 nm. (B) Espectros obtidos a partir da análise global do decaimento e a (C) cinética de decaimento associada à análise global com os ajustes associados aos dados.

Um diagrama qualitativo de nível de energia descrevendo a fotofísica da díade RuPDI-Py é apresentado no ESQUEMA 4.8. A excitação do $\{PDI-Py\}$

em 720 nm resultou na população do estado $^1\text{PDI-Py}$, que decaiu emitindo fluorescência em 780 nm. No entanto, considerando que a excitação em 355 nm e 450 nm contém características de ambas as componentes $\{\text{PDI-Py}\}$ e $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ e assumindo que ambos os estados são preenchidos, espera-se que os estados $^1\text{MLCT}$ e $^1\text{PDI-Py}$ (S_2) contribuam para essas absorções. A população do $^1\text{MLCT}$ foi seguida pelo ISC eficiente para o estado $^3\text{MLCT}$. A supressão da fosforescência do $^3\text{MLCT}$ pode ser atribuída à transferência de elétrons da componente $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ para a componente $\{\text{PDI-Py}\}$, que resultou na formação do estado excitado intermediário de CS $\{\text{Ru}^{3+}\text{-PDI-Py}^{\bullet-}\}$ em 60 ps. O estado CS decaiu com um longo tempo de vida de 4 μs para gerar o estado excitado tripleto $^3\text{PDI-Py}$ de longa duração (36 μs). Esse processo foi similar ao observado para a díade referência $[\text{Ru(phen)}_2(\text{pPDIp})]^{2+}$, no entanto, os tempos de vida associados aos estados CS e tripleto foram maiores na nova díade RuPDI-Py quando comparados à díade referência.⁷³ É importante ressaltar que a formação do estado $^3\text{PDI-Py}$ só foi observada na díade RuPDI-Py após a excitação da componente $\{\text{Ru(phen)}_3\}$ e não houve evidências de sua geração no ligante PDI-Py, reforçando a importância da participação do centro metálico Ru(II) no processo.



ESQUEMA 4.8 – Diagrama qualitativo de níveis de energia da díade RuPDI-Py em DMSO. As linhas azuis indicam a excitação em 450 nm e as linhas verdes indicam a excitação em 720 nm. As energias dos estados excitados foram

estimadas de acordo com as os resultados obtidos dos experimentos eletroquímicos e espectroscópicos.

4.3.3 – Interação não-covalente entre o ligante PDI-Py e o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$

O efeito da interação não-covalente entre o ligante PDI-Py e o complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ sobre as propriedades fotofísicas foi avaliado comparando soluções das moléculas individuais com uma mistura contendo PDI-Py e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e com uma solução contendo somente a díade RuPDI-Py, todas soluções com a mesma concentração, conforme representado na FIGURA 4.31.

O espectro de absorção da mistura PDI-Py/ $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foi caracterizado pela somatória das absorções de ambas as moléculas na região de 400-500 nm, enquanto a banda em 720 nm manteve o perfil observado no PDI-Py livre. Além disso, o espectro da absorção da mistura manteve a emissão de ambas as moléculas, ou seja, a emissão do $^3\text{MLCT}$ em 610 nm e do $^1\text{PDI-Py}$ em 780 nm. Esses resultados demonstraram que a interação não-covalente entre as moléculas PDI-Py e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ não tem efeito sobre os parâmetros fotofísicos de cada molécula independente e que as alterações das propriedades observadas na díade RuPDI-Py são resultantes da coordenação das componentes.

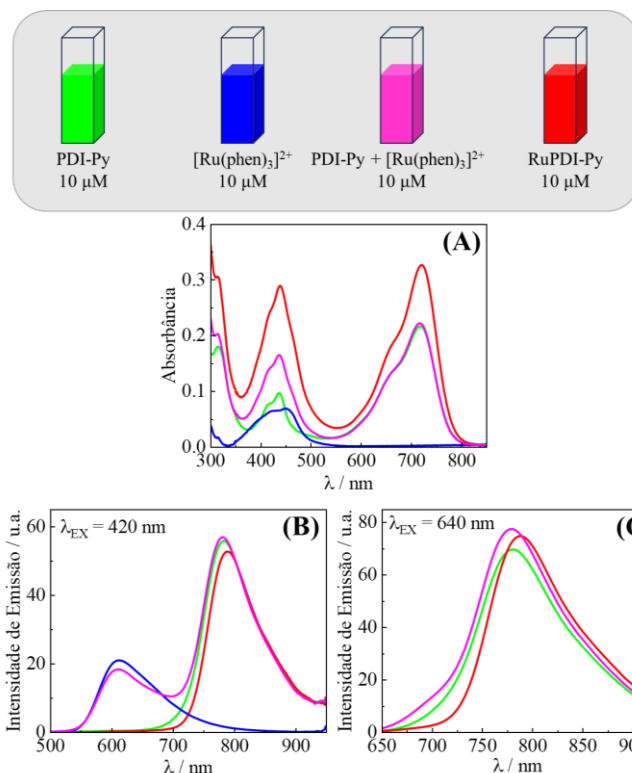


FIGURA 4.31 – Comparação entre os espectros de (A) absorção e de (B e C) emissão das soluções do ligante livre PDI-Py (verde), do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (azul), da díade RuPDI-Py (vermelho) e da mistura PDI-Py/ $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (rosa) ($c = 10 \mu\text{M}$, solução aerada).

4.3.4 – Estabilidade química e fotoquímica em DMSO

As estabilidades química e fotoquímica do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py em solução de DMSO foram avaliadas através da técnica de espectroscopia de UV-vis. Como demonstrado na FIGURA 4.32 e FIGURA 4.33, não houve alterações nos espectros de absorção do ligante e da díade após 24 h em solução de DMSO, ou sob irradiação com luz de 450 nm ou de 720 nm. Esses resultados demonstraram a estabilidade química e fotoquímica de ambos os compostos em solução de DMSO.

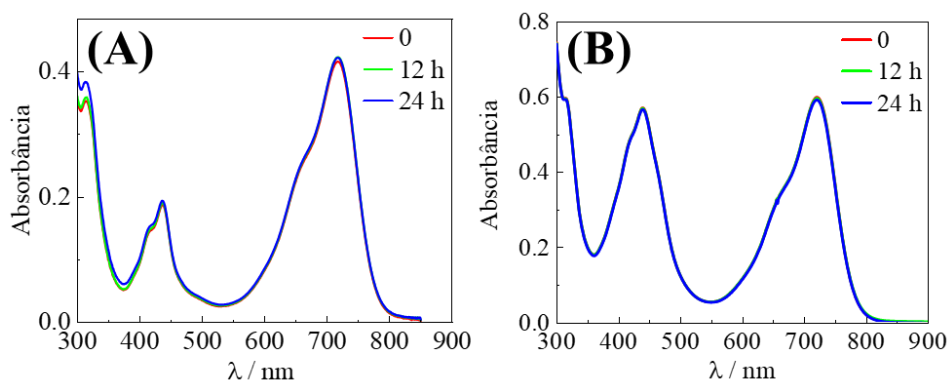


FIGURA 4.32 – Estabilidade química do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py avaliada através dos espectros de absorção em solução de DMSO ($c = 20 \mu\text{M}$, solução aerada).

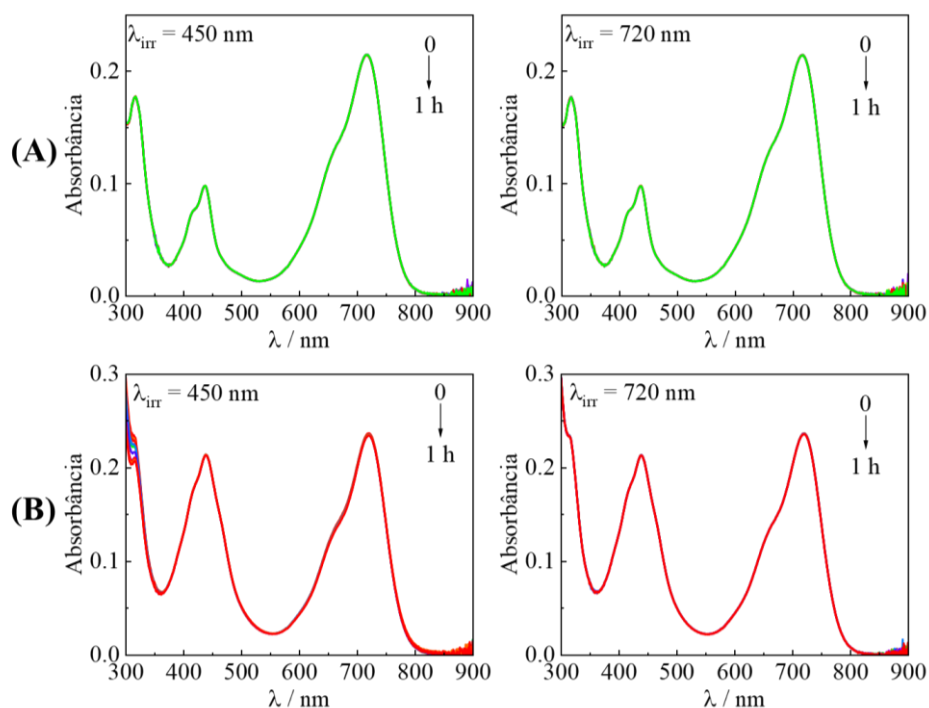


FIGURA 4.33 – Estabilidade fotoquímica do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py avaliada através dos espectros de absorção em solução de DMSO ($c = 10 \mu\text{M}$, solução aerada), sob irradiação com luz de 450 nm e de 720 nm (tempo total de irradiação = 1 h).

4.4 – Solvatocromismo

Os espectros de absorção e de emissão e os tempos de vida de emissão do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py foram medidos em uma série de solventes orgânicos de diferentes polaridades em temperatura ambiente e em uma matriz sólida a 77 K para avaliar o efeito solvatocrômico e confirmar o caráter de transferência de carga (CT) do estado S_1 da componente {PDI-Py}. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 4.34 e sumarizados na TABELA 4.7.

TABELA 4.7 – Propriedades fotofísicas do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py em solventes orgânicos.

Solvente	PDI-Py			RuPDI-Py		
	λ_{Abs} , nm	λ_{EMs} , nm	τ_{EM} , ns	λ_{Abs} , nm	λ_{EMs} , nm	τ_{EM} , ns
Diclorometano	718	755	2,80	726	765	2,40
Metanol	714	775		718	778	
THF	697	739		704	745	
DMSO	720	767	1,75	720	776	1,50
DMF	712	763		716	769	
Acetonitrila	712	766		715	766	
Butironitrila ^a		747	4,80		750	4,84

^a Matriz sólida à 77 K.

Ao contrário do pequeno deslocamento nos espectros de absorção, os espectros de emissão do ligante PDI-Py e da díade RuPDI-Py foram amplamente deslocados para o vermelho com o aumento da polaridade do solvente, o que indica fortes características de transferência de carga (CT) para os estados excitados dos compostos. Geralmente derivados do PDI bay-substituídos com

pirrolidina apresentam um forte caráter solvatocrômico devido à característica de transferência de carga do estado eletrônico excitado de menor energia S_1 , resultante da transição eletrônica entre o substituinte doador de elétrons e o centro do anel do PDI receptor de elétrons.¹²³

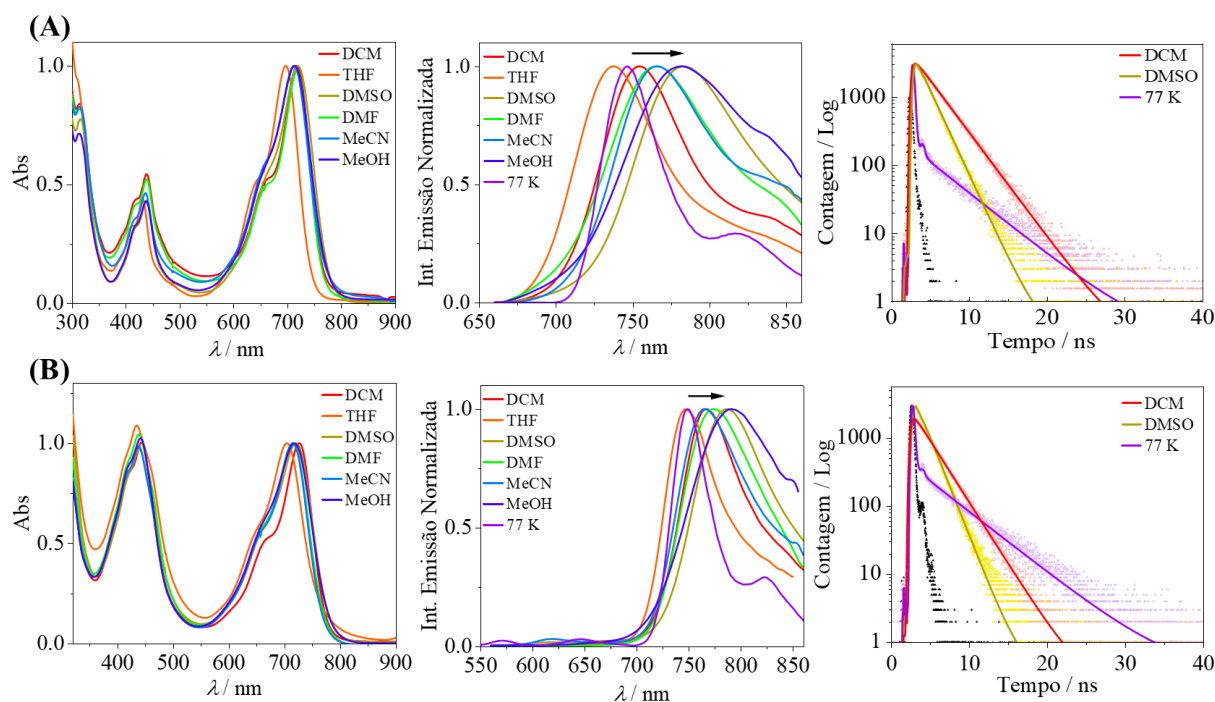


FIGURA 4.34 – Espectros de absorção e de emissão e perfis do decaimento dos tempos de vida de emissão do (A) ligante PDI-Py e da (B) díade RuPDI-Py em solventes orgânicos com diferentes polaridades em temperatura ambiente (soluções aeradas) e em matriz rígida de butironitrila a 77 K ($c = 10 \mu\text{M}$). Os espectros de emissão foram medidos usando $\lambda_{\text{EX}} = 650 \text{ nm}$ e 450 nm para o ligante e para díade, respectivamente. Os tempos de vida de emissão foram medidos utilizando $\lambda_{\text{EX}} = 640 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 780 \text{ nm}$.

Solventes polares estabilizam o estado excitado polar, diminuindo a energia e, conseqüentemente, deslocando o espectro para maiores comprimentos de onda. Além disso, geralmente moléculas doadoras-receptoras que possuem

transições eletrônicas de CT apresentam maior solvatocromismo no estado excitado do que no estado fundamental devido ao momento de dipolo momentâneo resultante da transição eletrônica.¹⁴⁵

4.5 – Propriedades fotofísicas em água

Devido à perspectiva para aplicações biológicas da díade RuPDI-Py, suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas foram analisadas em água e comparadas ao complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Visto que o ligante PDI-Py é insolúvel em água, não foi possível uma comparação direta com as propriedades da díade.

4.5.1 – Espectroscopia de UV-Vis e de Luminescência

O espectro de absorção da díade RuPDI-Py em água está representado na FIGURA 4.35A. Mudanças espectrais prontamente aparentes foram observadas em comparação com a absorção em DMSO, incluindo a redução nos valores dos coeficientes de absorvidade molar e o desvio para maiores comprimentos de onda (~ 40 nm) de todas as bandas de absorção. A banda de absorção de menor energia em 720 nm referente a componente {PDI-Py} apresentou uma redução de 48% do coeficiente de absorvidade molar juntamente com o alargamento da banda, perda da estrutura vibrônica e alteração das intensidades. A banda de absorção em 440 nm também apresentou redução na absorvidade (26%), embora em menor extensão. O complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentou um valor de absorvidade molar maior em água ($\epsilon = 18.100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em relação a absorvidade em DMSO ($\epsilon = 10.450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (FIGURA 4.36). Em razão disso, provavelmente a redução da intensidade da

banda da díade RuPDI-Py em 440 nm foi compensada pelo aumento na intensidade do componente $\{[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}\}$ nesta região.

A razão entre as bandas de absorção das transições vibrônicas 0-0 e 0-1 (A_{0-0}/A_{0-1}) do estado S_1 , denominada como progressão de Franck-Condon, geralmente é utilizada como um indicador de agregação de derivados do PDI em solução.¹⁴⁶ Moléculas do PDI monoméricas exibem a progressão de Franck-Condon de aproximadamente 1,6 e valores abaixo de 1,0 são indícios de processos de agregação.¹⁴⁷ A díade RuPDI-Py apresentou a razão A_{720}/A_{664} igual a 1,72 em DMSO enquanto em água a razão A_{752}/A_{706} foi de 0,93. A redução da progressão de Franck-Condon e o deslocamento das bandas de absorção para a região do vermelho observados em água provavelmente indicam o empilhamento π - π das unidades do PDI-Py em agregados do tipo J.^{148,149}

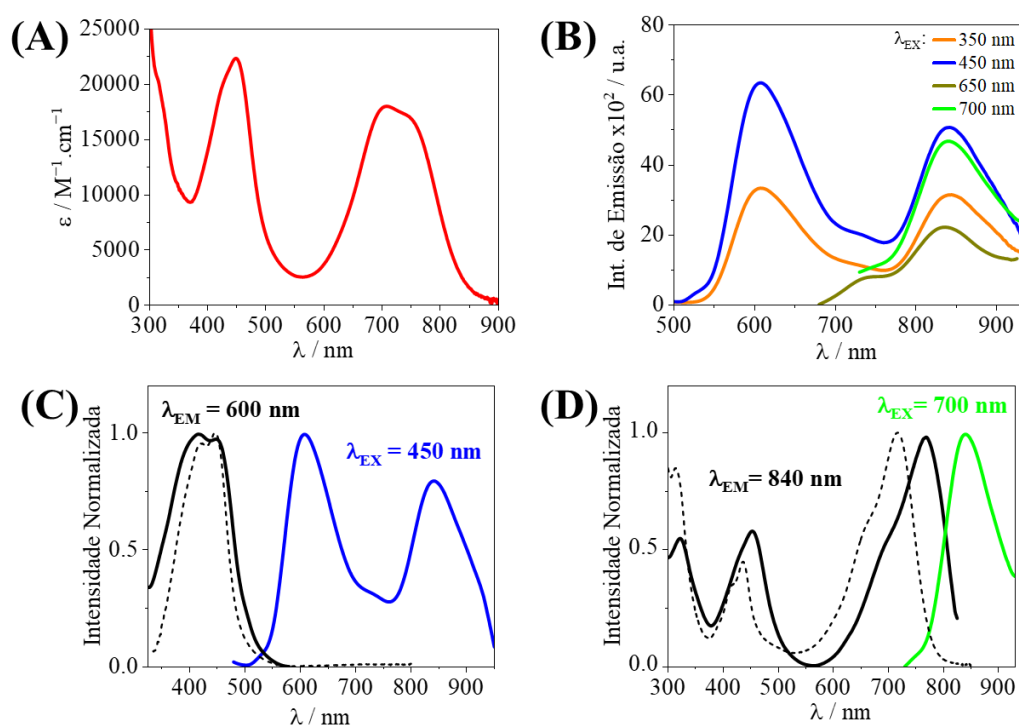


FIGURA 4.35 – Propriedades espectroscópicas da díade RuPDI-Py em água (solução desaerada, $c = 20 \mu\text{M}$). (A) espectro de absorção, (B) espectro de emissão em diferentes comprimentos de onda de excitação, (C) espectros de emissão

(verde) e de excitação (linha sólida em preto) da díade em comparação com o espectro de absorção do $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em água (linha tracejada), (D) espectros de emissão (azul) e de excitação (linha sólida em preto) da díade em comparação com o espectro de absorção do ligante PDI-Py em DMSO (linha tracejada)

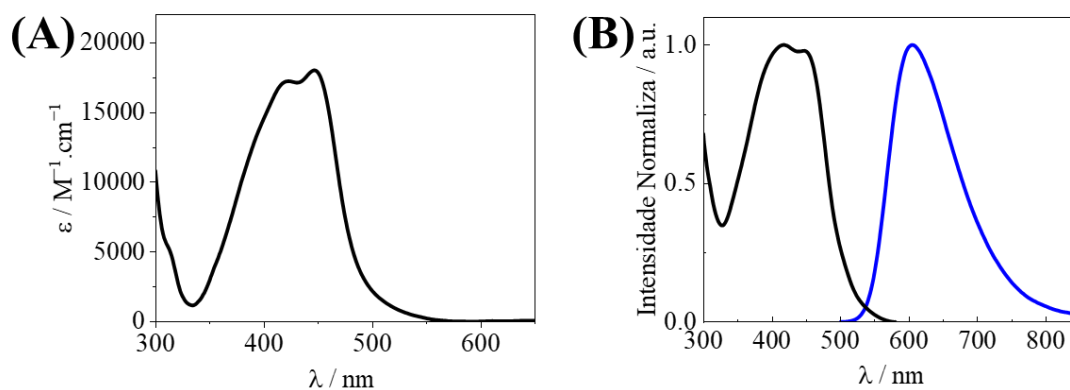


FIGURA 4.36 – Espectros de (A) absorção e de (B) emissão (azul, $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) e excitação (preto, $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em água ($c = 10 \mu\text{M}$, solução desaerada)

Moléculas de derivados do PDI podem se organizar em estruturas através de interações de empilhamento π - π para formar agregados do tipo H (lado a lado) ou do tipo J (cabeça-cauda) e as propriedades fotofísicas são alteradas dependendo do tipo de agregado.¹⁵⁰ O acoplamento eletrônico entre dois cromóforos próximos pode ocorrer através das interações entre dipolos de transição molecular e pela mistura direta dos seus orbitais π . O modelo de Kasha¹⁵¹ fornece uma estrutura básica para a compreensão das mudanças das propriedades de absorção e emissão nos agregados moleculares, conforme representado na FIGURA 4.37.

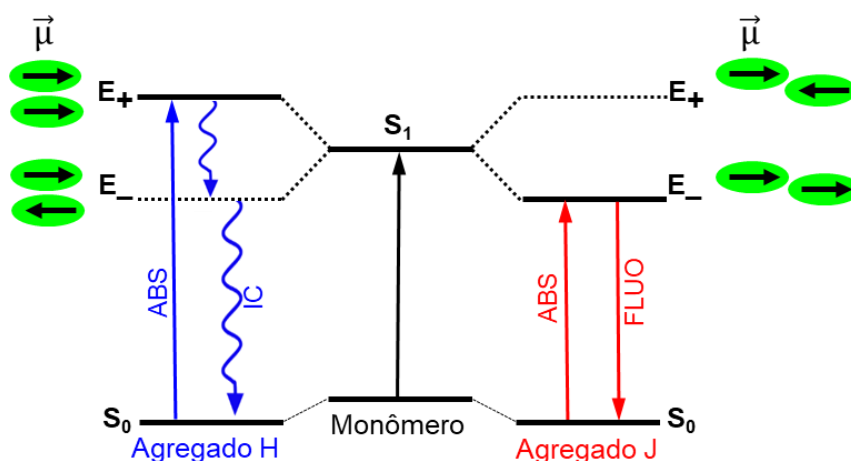


FIGURA 4.37 – Diagrama de energia qualitativo dos níveis de energia dos agregados do tipo H e J. Figura adaptada da referência Bayda et al. (2017).¹⁵²

Quando o acoplamento dos momentos de dipolo é forte, os níveis de energia do estado excitado singleto são divididos em estados éxciton de maior energia (E_+) e menor energia (E_-).¹⁵³ Moléculas dentro de um agregado sofrem acoplamento de múltiplos momentos de dipolo e as excitações eletrônicas se estendem sobre muitas moléculas para formar o éxciton de Frenkel deslocalizado, que referem-se a estados eletrônicos excitados que não estão localizados em uma molécula em particular.¹⁵⁴ Quando os momentos de dipolo estão alinhados paralelamente nos agregados do tipo H, o estado excitado opticamente ativo é o estado éxciton de maior energia (E_+), ou seja, a transição eletrônica permitida ocorre entre os estados fundamental e E_+ , resultando no deslocamento do espectro de absorção para energias mais altas (deslocamento hiposocrômico) e na supressão da fluorescência. Quando os momentos de dipolo estão alinhados no formato “cabeça-cauda” nos agregados do tipo J, a transição eletrônica permitida ocorre entre o estado fundamental e o estado éxciton de menor energia (E_-), resultando no deslocamento dos espectros de absorção e de emissão para menores energias (deslocamento batocrômico). Diferentemente dos agregados H, os agregados J são emissivos uma vez que a transição eletrônica permitida ocorre

para o estado E. e, de acordo com a regra de Kasha, a fluorescência ocorre do estado excitado de menor energia.¹⁵⁵

Os espectros de emissão e de excitação, assim como os perfis dos decaimentos dos tempos de vida de emissão da díade RuPDI-Py em água estão representados na FIGURA 4.35 e FIGURA 4.38. A formação de agregados afetou diretamente as propriedades fotofísicas da díade. Surpreendentemente, a emissão da díade em água mudou significativamente em função do comprimento de onda de excitação. Por exemplo, quando a díade foi excitada em comprimentos de onda abaixo de 600 nm, o espectro de emissão exibiu três bandas: uma banda com máximo em 840 nm, atribuída à fluorescência do estado $^1\text{PDI-Py}$ e caracterizada por um tempo de vida de emissão curto ($\tau_{fl} = 1,50$ ns); uma banda de menor intensidade em 745 nm ($\tau_{fl} = 1,60$ ns) e uma banda de maior intensidade com máximo em 610 nm, atribuída à fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$ da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ com um tempo de vida de emissão longo ($\tau_{ph} = 1,3$ μs), característico da $^3\text{MLCT}$ da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\tau_{ph} = 680$ ns).⁶⁴ Por outro lado, os espectros de emissão obtidos a partir da excitação com comprimentos de onda maiores que 650 nm, exibiram predominantemente as bandas em 745 nm e 840 nm. Nesses comprimentos de onda de excitação, a luz é absorvida exclusivamente pelo PDI-Py e ambas as emissões provavelmente se originaram da componente $\{\text{PDI-Py}\}$.

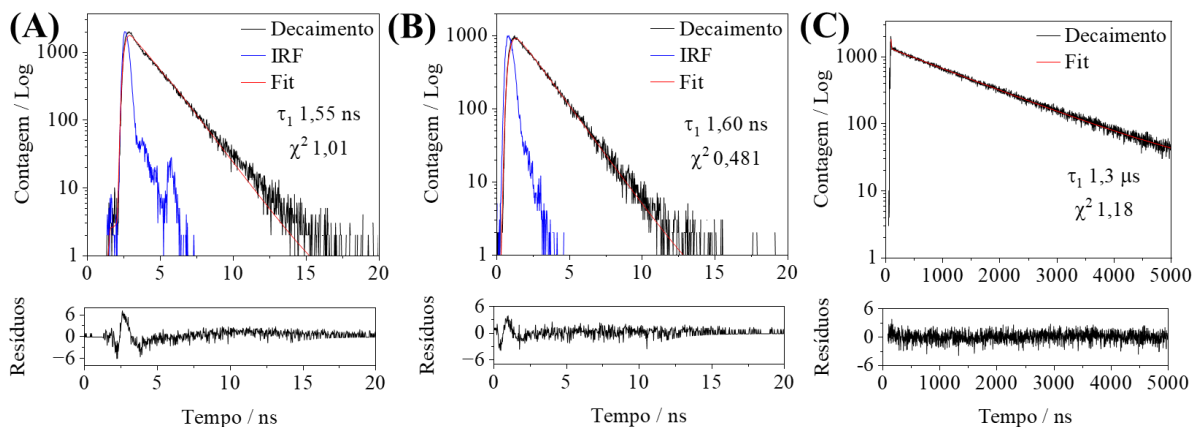


FIGURA 4.38 – Perfis dos decaimentos dos tempos de vida de emissão da díade RuPDI-Py em água ($c = 20 \mu\text{M}$, solução desaerada) com (A) $\lambda_{\text{EX}} = 640 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 745 \text{ nm}$, (B) $\lambda_{\text{EX}} = 640 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 780 \text{ nm}$ e (C) $\lambda_{\text{EX}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$.

O espectro de excitação da díade determinado no $\lambda_{\text{EM}} = 610 \text{ nm}$ (FIGURA 4.35C) demonstrou um perfil semelhante ao espectro de absorção do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em água, enquanto o espectro de excitação determinado no $\lambda_{\text{EM}} = 840 \text{ nm}$ (FIGURA 4.35D) exibiu o mesmo perfil que o espectro de absorção do ligante PDI-Py em solução de DMSO. A semelhança entre os espectros de excitação em água e os espectros de absorção da componente {PDI-Py} monomérica sugeriu que os agregados da díade são fracamente acoplados, provavelmente devido ao impedimento estérico introduzido pelos substituintes bay no núcleo perileno.¹⁵⁶

Estudos de dependência do solvente foram realizados utilizando uma mistura de DMSO/H₂O e a FIGURA 4.39 demonstra as mudanças nos espectros de absorção e de emissão da díade. O aumento da porcentagem de água em solução resultou na redução do coeficiente de absorvidade molar, seguido por mudanças nos máximos das intensidades e na inversão da razão das bandas de absorção na região de 600-800 nm. Além disso, a intensidade de emissão do ^{1*}PDI-Py diminuiu gradativamente com o aumento da porcentagem de água,

seguido pelo deslocamento do máximo de emissão para a região do vermelho. No espectro de emissão da díade em 100% H₂O a banda em 600 nm referente ao estado ³*MLCT apresentou menor intensidade em comparação com a banda do ¹*PDI-Py devido à presença de oxigênio em solução. Esses resultados demonstram que o aumento gradativo da porcentagem de água em solução induziu à formação de agregados moleculares da díade RuPDI-Py.

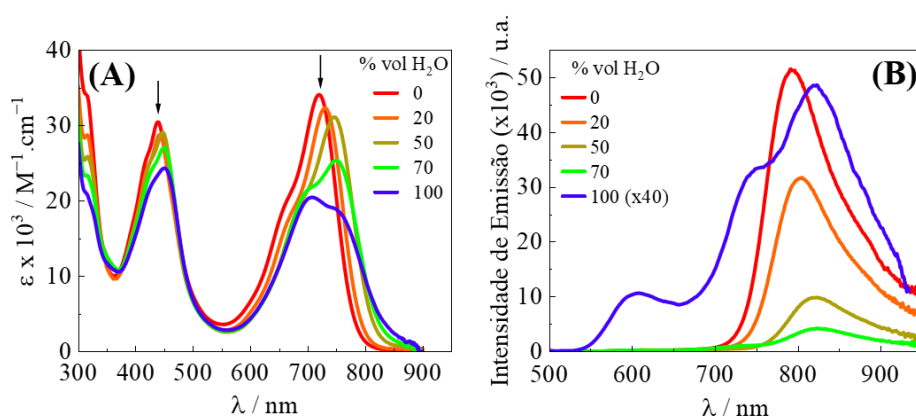


FIGURA 4.39 – Espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{EX} = 450$ nm) da díade RuPDI-Py na mistura de solventes DMSO/H₂O (v/v) ($c = 25$ μ M, solução aerada).

4.5.2 – Estabilidade dos agregados em solução

A estabilidade dos agregados da díade RuPDI-Py em solução aquosa foi avaliada através de experimentos espectroscópicos de absorção UV-Vis e luminescência dependentes da temperatura e da concentração. As mudanças espectrais dependentes da temperatura estão representadas na FIGURA 4.40. Os resultados demonstraram que em temperaturas acima de 50 °C, o espectro de absorção da díade exibiu uma inversão da razão dos picos da componente {PDI-Py} e apresentou um perfil semelhante ao observado na mistura DMSO/70% H₂O.

Além disso, o aumento da temperatura resultou no aumento da intensidade de emissão do $^1\text{PDI-Py}$ em 840 nm concomitante com a redução da intensidade da banda da emissão $^3\text{MLCT}$ em 600 nm.

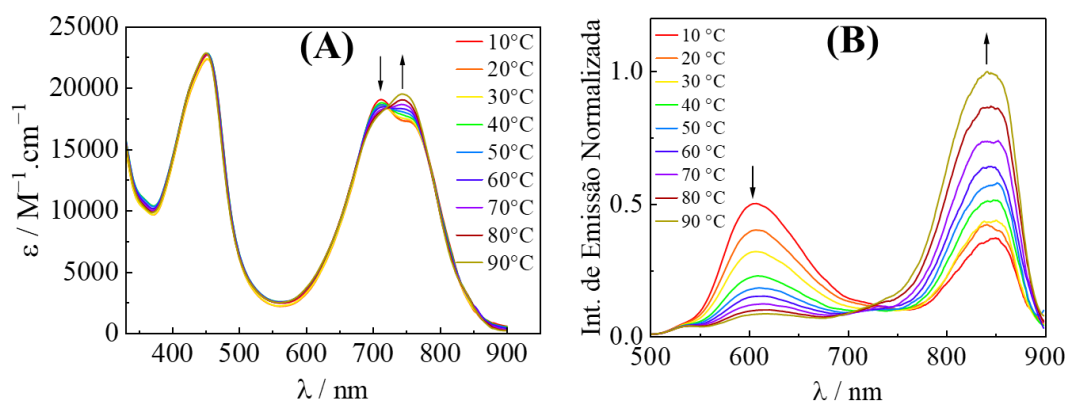


FIGURA 4.40 – Influência da temperatura (10-90 °C) nas propriedades fotofísicas da díade RuPDI-Py em água ($c = 10 \mu\text{M}$, solução desaerada). Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$).

A mudança nas intensidades das emissões pode ser atribuída à mudança de energia dos estados excitados, isto é, o aumento da temperatura resultou na separação parcial dos agregados e, como os estados $^3\text{MLCT}$ e $^1\text{PDI-Py}$ competem pela luz de excitação em 450 nm e provavelmente encontram-se razoavelmente próximos em energia, uma mudança no solvente e na temperatura pode inverter a ordem do estado excitado de menor energia, alterando o padrão fotofísico, como discutido detalhadamente nos próximos tópicos.

O aumento da temperatura também resultou na redução dos tempos de vida de emissão de ambos os estados, como demonstrado na FIGURA 4.41. Por exemplo, o tempo de vida do $^1\text{PDI-Py}$ diminuiu de 1,47 ns (10 °C) para 1,18 ns (90 °C), enquanto o $^3\text{MLCT}$ apresentou uma redução mais acentuada, de 1733

ns (10 °C) para 282 ns (90°C), provavelmente devido ao aumento dos processos de desativação não radiativos.

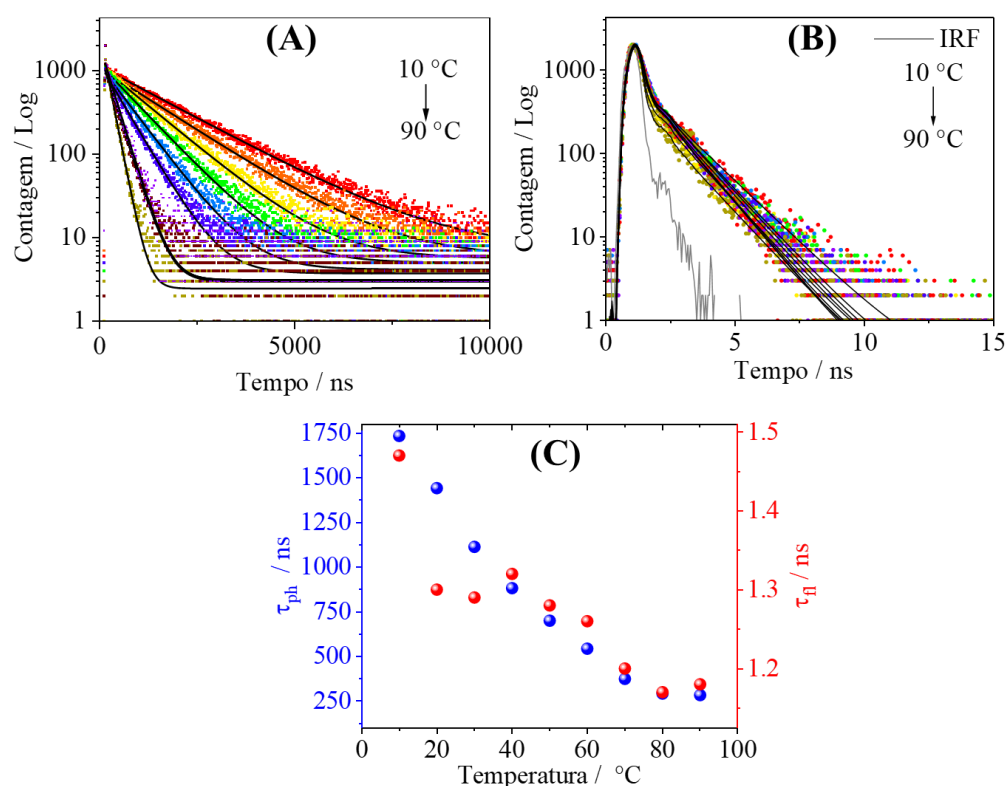


FIGURA 4.41 – Influência da temperatura (10-90 °C) nos tempos de vida de emissão da díade RuPDI-Py em água ($c = 10 \mu\text{M}$, solução desaezada). Perfis dos decaimentos dos estados (A) $^3\text{MLCT}$ ($\lambda_{\text{EX}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 610 \text{ nm}$) e (B) $^1\text{PDI-Py}$ ($\lambda_{\text{EX}} = 640 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 780 \text{ nm}$). (C) Valores dos tempos de vida de emissão dos estados $^3\text{MLCT}$ (● azul) e $^1\text{PDI-Py}$ (● vermelho) em função da temperatura.

A influência da temperatura nos processos fotofísicos da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ também foi avaliada e está representada na FIGURA 4.42. O espectro de absorção não sofreu alteração, no entanto, a intensidade de emissão e os tempos de vida de emissão do $^3\text{MLCT}$ diminuíram significativamente com o aumento da temperatura, como observado na díade RuPDI-Py.

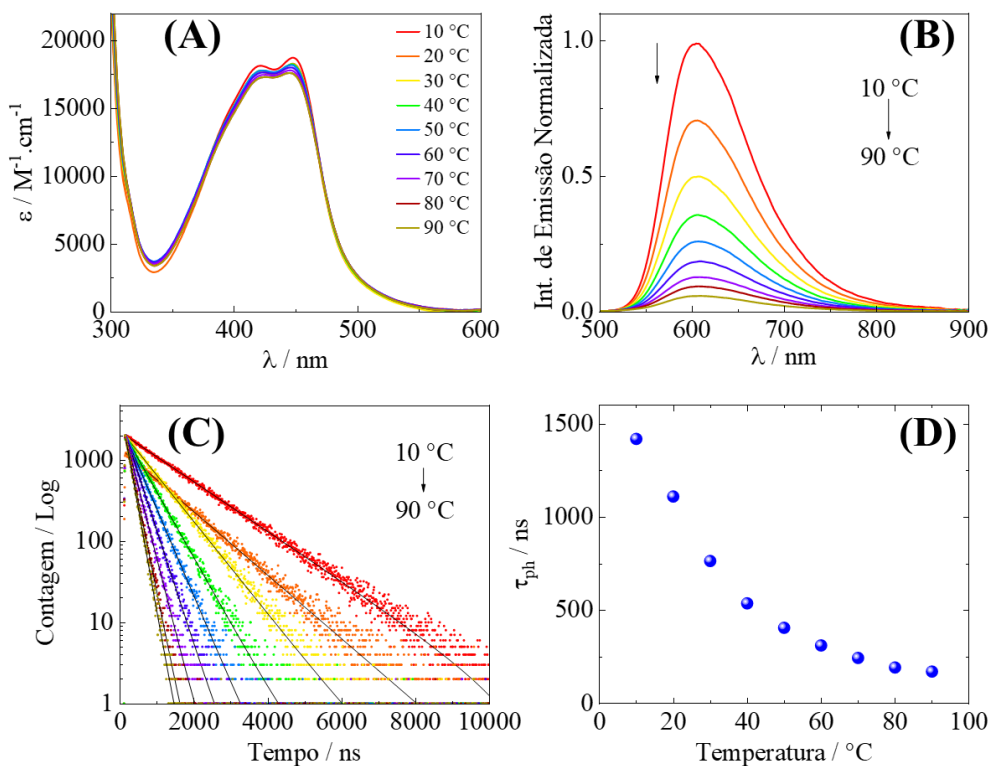


FIGURA 4.42 – Influência da temperatura (10-90 °C) nas propriedades fotofísicas da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em água ($c = 10 \mu\text{M}$, solução desaerada). Espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$). (C). Perfis dos decaimentos e (D) valores dos tempos de vida de emissão do estado $^3\text{MLCT}$ ($\lambda_{\text{EX}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 610 \text{ nm}$).

As mudanças espectrais dependentes da concentração foram monitoradas na faixa de concentração de 0,3 a 40 μM e são demonstradas na FIGURA 4.43. Nas maiores concentrações (40-20 μM) os espectros de absorção exibiram o perfil espectral característico dos agregados PDI em solução. Ao diminuir a concentração, gradualmente ocorreu a inversão das intensidades das absorções da banda de menor energia da componente $\{\text{PDI-Py}\}$. A inversão da razão entre as bandas pode indicar uma desagregação parcial em baixas concentrações. A intensidade de emissão diminuiu gradativamente com a concentração e nenhuma nova banda foi observada.

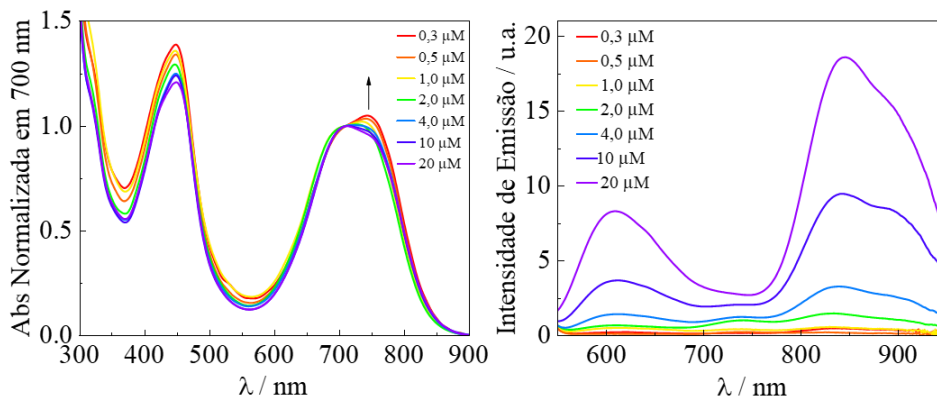


FIGURA 4.43 – Influência da concentração (0,3-20 μM) nos espectros de (A) absorção e (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$), da díade RuPDI-Py em água (solução aerada).

As mudanças na absorção dependentes da temperatura e da concentração não seguiram uma correlação linear (FIGURA 4.44) como é esperado para a lei de Lambert-Beer, indicando possivelmente a ausência de equilíbrio entre as espécies agregadas e monoméricas ou a presença de espécies agregadas com formatos distintos em solução.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

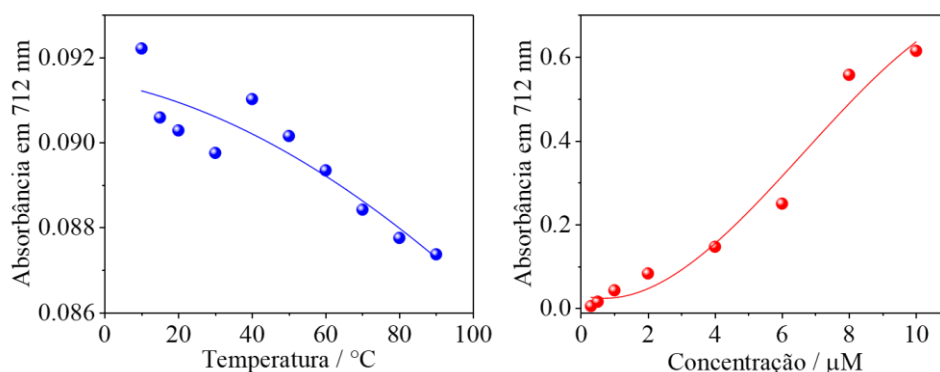


FIGURA 4.44 – Desvio da lei de Lambert-Beer: influência da mudança de temperatura e de concentração na banda de absorção em 712 nm da díade RuPDI-Py em água.

4.5.3 – Espectroscopia de absorção transiente

O efeito da agregação na dinâmica do estado excitado da díade RuPDI-Py foi analisado usando espectroscopia de absorção transiente de nanossegundos. Conforme mostrado na FIGURA 4.45, o espectro de TA da díade em água apresentou uma banda de absorção positiva estruturada entre 450 e 600 nm simultânea ao consumo do estado fundamental entre 600 e 700 nm, semelhante ao espectro de TA obtido para a díade em DMSO. Adicionalmente, o espectro da díade em água apresentou uma banda positiva em 350 nm e uma banda negativa em 440 nm. A cinética de decaimento foi caracterizada por um decaimento biexponencial em todas as regiões do espectro, com as constantes de tempo τ_1 de 700 ns e τ_2 de 15 μ s, que correspondem ao decaimento dos estados 3 *MLCT da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ e 3 *PDI-Py da componente $\{\text{PDI-Py}\}$, respectivamente. Esses resultados demonstraram que a agregação não suprimiu a população do estado 3 *PDI-Py na díade.

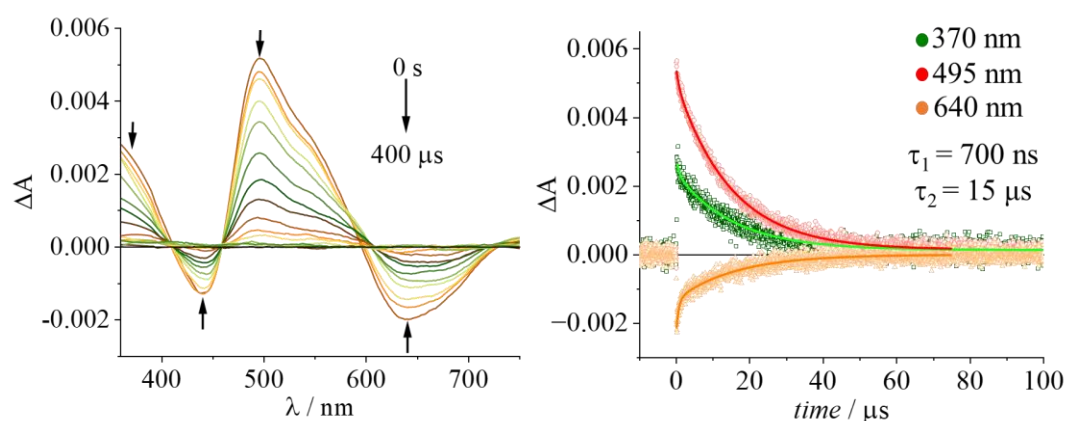


FIGURA 4.45 – Espectro de absorção transiente de ns da díade RuPDI-Py em água (solução des aerada) com λ_{EX} de 355 nm e a cinética de decaimento dos sinais de TA com os ajustes associado aos dados.

Os resultados obtidos em água indicaram que a díade RuPDI-Py se organizou em agregados moleculares do tipo J, conforme observado pelas mudanças no espectro de absorção e pela fluorescência preservada do $^1\text{PDI-Py}$ na região do NIR. Os agregados foram afetados pela mudança de temperatura e de concentração, indicando um fraco grau de agregação deste composto, provavelmente devido ao impedimento estérico ocasionado pelo substituinte bay e pela componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$, os quais dificultaram a automontagem do empilhamento π - π . Notavelmente, a formação de agregados foi observada somente na presença de água. Em solventes orgânicos de diferentes polaridades o espectro de absorção exibiu perfis semelhantes, enquanto o espectro de emissão do $^1\text{PDI-Py}$ apresentou desvio para maiores energias com a redução da polaridade do solvente devido à natureza CT do estado excitado da componente $\{\text{PDI-Py}\}$. Esses resultados demonstram o forte efeito hidrofóbico do ambiente aquoso nas interações π - π aromáticas, que levaram à automontagem do componente $\{\text{PDI-Py}\}$ em agregados moleculares.

Geralmente a agregação induz alterações nos níveis eletrônicos dos derivados de perileno.^{18,160,161} Na díade RuPDI-Py as energias dos estados fundamental e excitado da componente $\{\text{PDI-Py}\}$ foram ligeiramente reduzidas (deslocadas para o vermelho) em relação ao monômero em DMSO. Essa pequena mudança de energia dos estados eletrônicos decorrente da agregação associada ao baixo rendimento quântico de fluorescência do estado $^1\text{PDI-Py}$ em água provavelmente permitiram a visualização da fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$ da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$.

4.5.4 – Estabilidade química e fotoquímica da díade RuPDI-Py em água

As estabilidades química e fotoquímica da díade RuPDI-Py em água foram avaliadas através da técnica de espectroscopia de UV-vis. Como demonstrado na FIGURA 4.46, não houve alterações nos espectros de absorção do ligante e da díade após 24 h em solução ou sob irradiação com luz de 450 nm ou de 720 nm, demonstrando a estabilidade química e fotoquímica da díade em água.

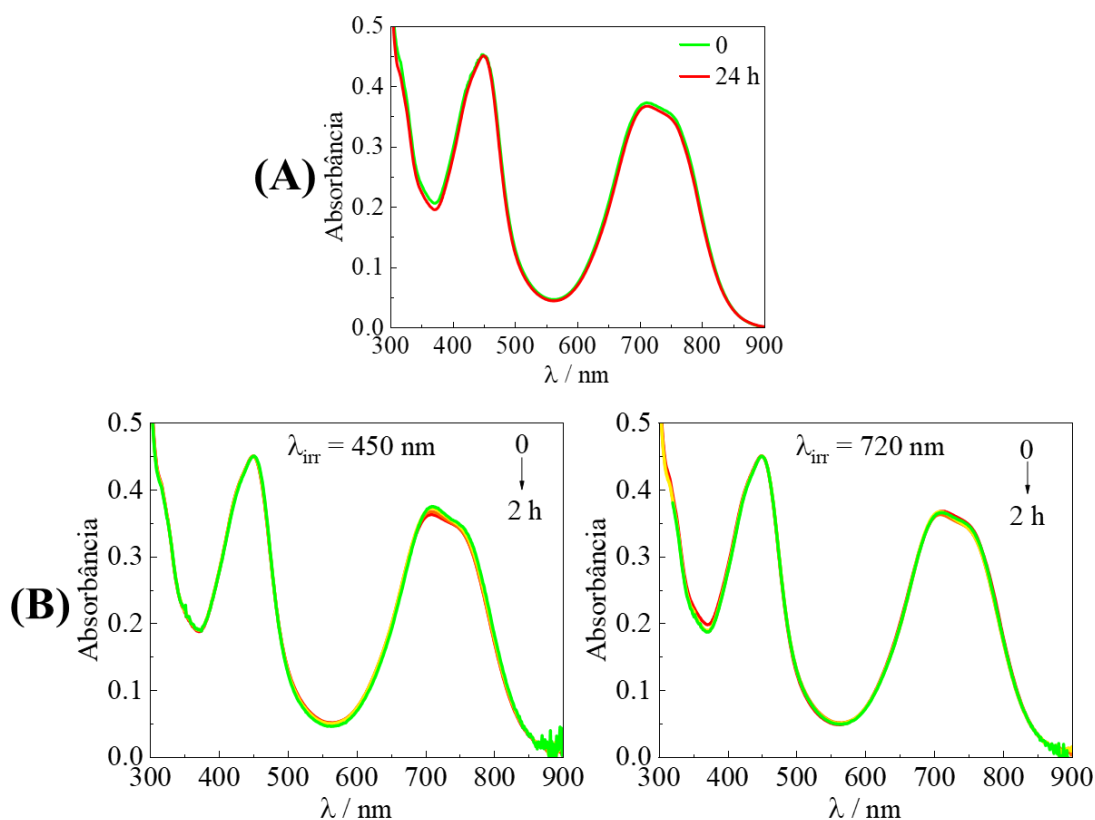


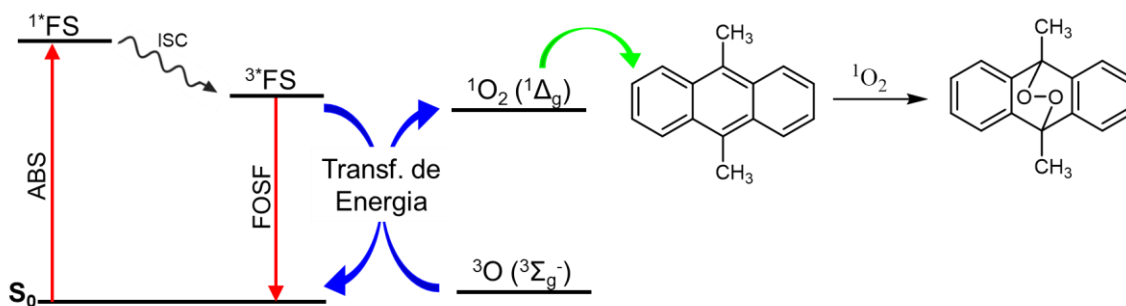
FIGURA 4.46 – (A) Estabilidade química da díade RuPDI-Py em água avaliada após 24 h em solução. (B) Estabilidade fotoquímica da díade RuPDI-Py em água sob irradiação com luz de 450 nm e de 720 nm (tempo total de irradiação = 2 h), $c = 20 \mu\text{M}$, solução aerada).

4.6 – Determinação das espécies reativas de oxigênio geradas em solução

A capacidade da díade RuPDI-Py em gerar as espécies reativas de oxigênio a partir dos estados excitados tripleto foi avaliada através dos métodos indiretos utilizando a espectroscopia de UV-vis e de ressonância paramagnética eletrônica EPR. A detecção direta do $^1\text{O}_2$ através da emissão em 1270 nm não foi possível devido a emissão da díade RuPDI-Py nessa região do NIR, a qual apresentou maior intensidade e se sobrepôs a banda de emissão do $^1\text{O}_2$.

4.6.1 – Determinação de oxigênio singlete por espectroscopia de UV-Vis

A capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ da díade RuPDI-Py, do ligante PDI-Py e da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foi avaliada em DMSO usando o 9,10-Dimetilantraceno (DMA) como um supressor de $^1\text{O}_2$. De acordo com a literatura^{162,163}, o DMA reage quimicamente com o $^1\text{O}_2$, resultando no produto 9,10-dimetil-9,10-dihidro-9,10-epidoxiantraceno (ESQUEMA 4.9). A taxa de fotobranqueamento do DMA é diretamente proporcional à quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada e pode ser monitorada através do consumo da banda de absorção do DMA em 380 nm.



ESQUEMA 4.9 – Reação de fotobranqueamento do DMA com o $^1\text{O}_2$.¹⁶²

As FIGURA 4.47 e FIGURA 4.48 demonstram os espectros de absorção UV-vis das soluções de DMA com os compostos analisados, obtidos durante a irradiação com luz de 450 nm ou 720 nm. O padrão Riboflavina ($\phi_{\Delta} = 0,22$ em DMSO) nas mesmas condições foi utilizado como referência.

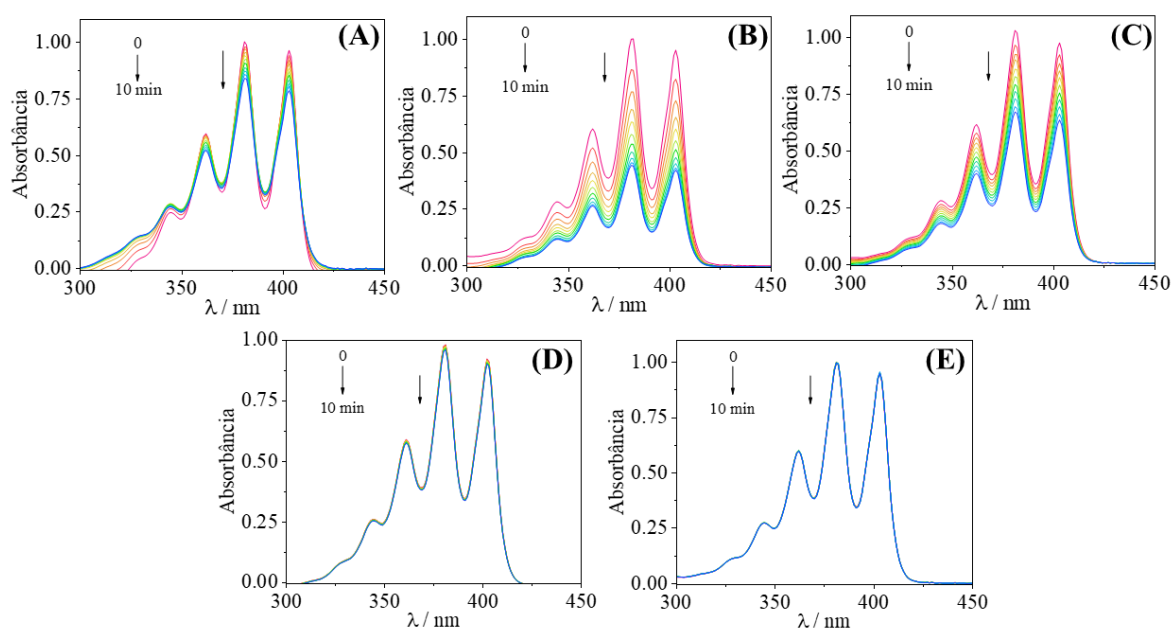


FIGURA 4.47 – Espectros de absorção do DMA em DMSO medidos durante a irradiação com luz de 450 nm na presença dos compostos (A) riboflavina, (B) $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, (C) RuPDI-Py e (D) PDI-Py. (E) Solução contendo somente o DMA irradiado utilizada como controle.

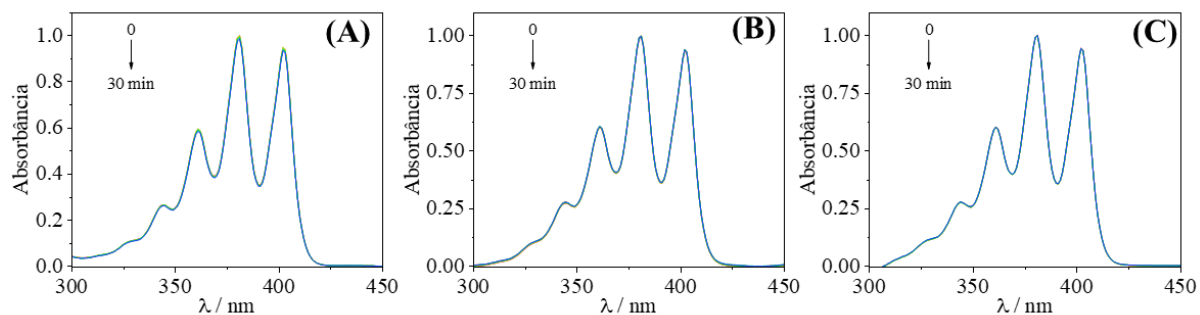


FIGURA 4.48 – Espectros de absorção do DMA em DMSO medidos durante a irradiação com luz de 720 nm na presença dos compostos (A) RuPDI-Py e (B) PDI-Py. (C) Solução contendo somente o DMA irradiado utilizada como controle.

Quando a mistura RuPDI-Py/DMA foi irradiada com luz de 450 nm, a absorção do DMA foi consumida, indicando a geração do $^1\text{O}_2$ pela díade. Em contraste, a irradiação com 720 nm não resultou em mudanças espectrais do DMA, demonstrando que com este comprimento de onda de irradiação a díade não foi capaz de gerar $^1\text{O}_2$. Esses resultados indicaram que o estado $^3\text{PDI-Py}$ é provavelmente o responsável pela fotossensibilização do $^1\text{O}_2$ por meio de um processo de transferência de energia (Equação 4.11) e corroboram com os resultados de espectroscopia de absorção transiente, onde a formação do estado tripleto só foi observada após excitação em 450 nm. A irradiação do ligante PDI-Py em 450 e 720 nm não causou alterações no espectro de absorção do DMA, demonstrando que o ligante livre não foi capaz de gerar $^1\text{O}_2$, uma vez que, de acordo com os resultados de absorção transiente, o ligante livre não atinge o estado excitado tripleto responsável pela sensibilização do $^1\text{O}_2$.



A FIGURA 4.49 fornece a relação entre o consumo da absorção do DMA (A_0/A) em função do tempo de irradiação dos compostos analisados. Os rendimentos quânticos de oxigênio singlete (ϕ_Δ) da díade RuPDI-Py e da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ em DMSO foram calculados de acordo com a literatura^{89,92} e estão representados na TABELA 4.8. A referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentou o maior valor de ϕ_Δ e está próximo ao relatado para esse composto em solventes orgânicos polares.¹⁶⁴ O ϕ_Δ da díade RuPDI-Py foi menor quando comparado com a $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, no entanto demonstrou maior eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ quando comparada a complexos de Ru(II)-perileno diimida.⁹²

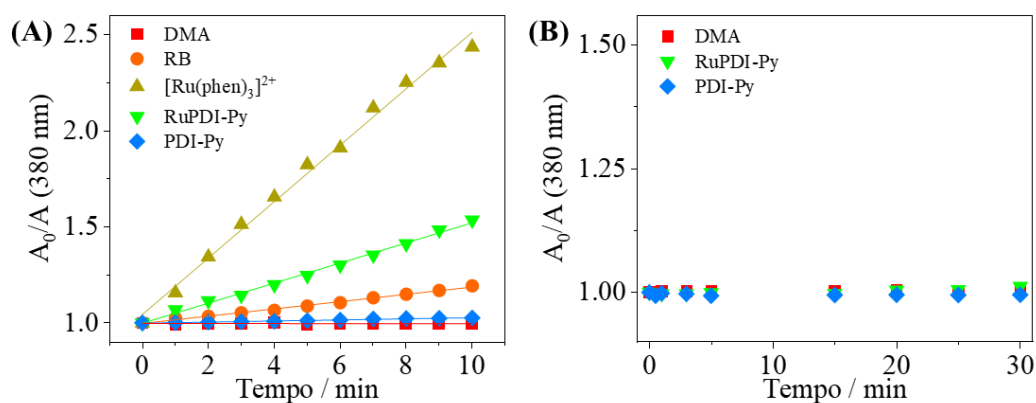


FIGURA 4.49 – Consumo da banda de absorção do DMA demonstrado através da correlação A_0/A vs tempo de irradiação, onde A_0 corresponde a absorbância do DMA em 380 nm no tempo = 0 e A corresponde a absorbância em diferentes tempos de irradiação. Irradiação com luz de (A) 450 nm e de (B) 720 nm. As inclinações das retas foram calculadas a partir do ajuste linear.

TABELA 4.8 – Rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) em DMSO sob irradiação com luz de 450 nm.

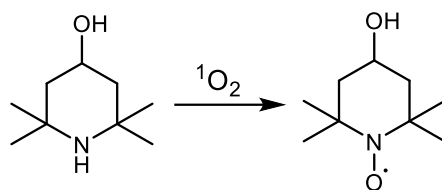
Composto	ϕ_{Δ}
Riboflavina	0,22 ¹²⁶
RuPDI-Py	0,40
[Ru(phen) ₃] ²⁺	0,63

4.6.2 – Determinação de oxigênio singlete por EPR

Espectroscopia de EPR com armadilhas de spin (do inglês, *spin trap*) é uma técnica eficaz e sensível para detectar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs não podem ser detectadas diretamente por EPR devido aos seus tempos de vida curtos, entretanto, reagem rapidamente com os compostos armadilhas de spin e formam adutos de spin estáveis que apresentam sinais característicos de EPR.¹⁶⁵

Neste trabalho utilizamos a técnica de EPR com a armadilha de spin 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) para detectar e quantificar o ¹O₂ gerado pela díade RuPDI-Py em solução aquosa. Apesar da técnica de UV-Vis ser eficiente para a determinação de ¹O₂, os compostos utilizados como supressores do ¹O₂ como o DMA ou o 1,3-difenil-p-benzofurano (DPBF) não são solúveis em meio aquoso.

De acordo com a literatura¹⁶⁵, o TMP-OH é uma espécie diamagnética e quando reage com o ¹O₂ gera o aduto paramagnético 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine *N*-oxil (TEMPO) (ESQUEMA 4.10), que possui um sinal de EPR caracterizado por três linhas com desdobramento hiperfino de mesma intensidade (1:1:1).



ESQUEMA 4.10 – Reação entre a armadilha de spin 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH) e o $^1\text{O}_2$ para gerar o aduto 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina *N*-oxil (TEMPO).¹⁶⁵

Como demonstrado na FIGURA 4.50, a mistura RuPDI-Py/TMP-OH em água após irradiação com luz de 450 nm apresentou um sinal com desdobramento hiperfino de mesma intensidade entre 3360-3420 Gauss, enquanto com a irradiação com luz de 650 nm, o sinal de EPR se manteve similar ao observado para o controle TMP-OH. Esses resultados foram similares aos resultados obtidos para a díade em DMSO, onde o $^1\text{O}_2$ só foi gerado após a irradiação na região de 450 nm.

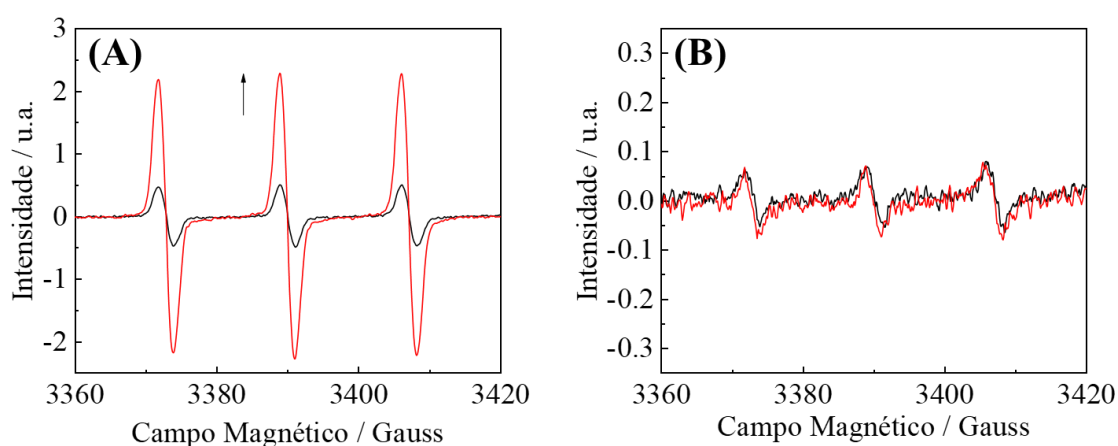


FIGURA 4.50 – Espectros de EPR da mistura TMP-OH (48 mM) e RuPDI-Py (150 μM) (vermelho) em água irradiada com luz de (A) 450 nm e de (B) 650 nm

durante 30 minutos. Uma solução contendo somente o TMP-OH irradiado foi utilizada como controle (preto).

A concentração de $^1\text{O}_2$ gerado a partir da irradiação da díade RuPDI-Py em tampão PBS (pH 7,4) foi determinada através de uma curva de calibração a partir da área dos espectros simulados do padrão TEMPO.¹⁶⁶ Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 4.51 e demonstraram que a concentração de $^1\text{O}_2$ depende do tempo de irradiação e da concentração da díade. A nova díade RuPDI-Py apresentou maior eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ quando comparada a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$. Por exemplo, sob as condições de 150 μM e 30 min de irradiação com luz de 450 nm, a díade RuPDI-Py gerou 1,2 μM de $^1\text{O}_2$, enquanto a díade $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ gerou apenas 0,5 μM de $^1\text{O}_2$.⁷⁴

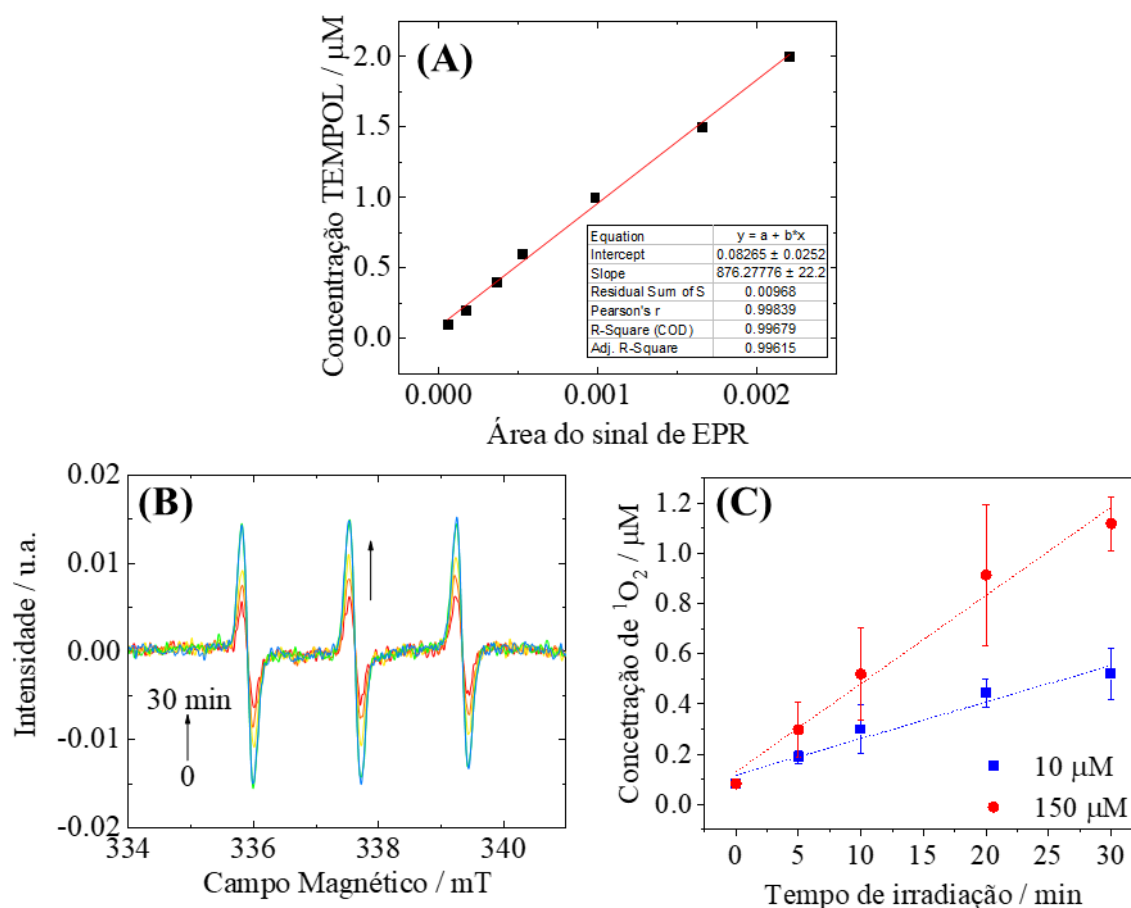


FIGURA 4.51 – Quantificação de $^1\text{O}_2$ por espectroscopia de EPR com armadilha de spin TMP-OH. (A) Curva de calibração obtida a partir dos espectros de EPR simulados do padrão TEMPO em tampão PBS (pH 7,4). (B) Espectro de EPR da mistura RuPDI-Py (150 μM) e TMP-OH (48 mM) irradiada com luz de 450 nm medidos em diferentes intervalos de tempo. (C) Concentração de $^1\text{O}_2$ gerado pela díade RuPDI-Py sob irradiação com luz de 450 nm.

4.6.3 – Determinação das demais EROs por EPR

A capacidade da díade RuPDI-Py em gerar as demais EROs como OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ em água foi avaliada utilizando a armadilha de spin e 5,5-Dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO). Como demonstrado na FIGURA 4.52, a irradiação da díade RuPDI-Py com luz de 450 nm não resultou na formação do

sinal de aduto do DMPO, indicando que nessas condições a díade não foi capaz de participar de reações de transferência de elétrons e gerar as demais EROs além do $^1\text{O}_2$.

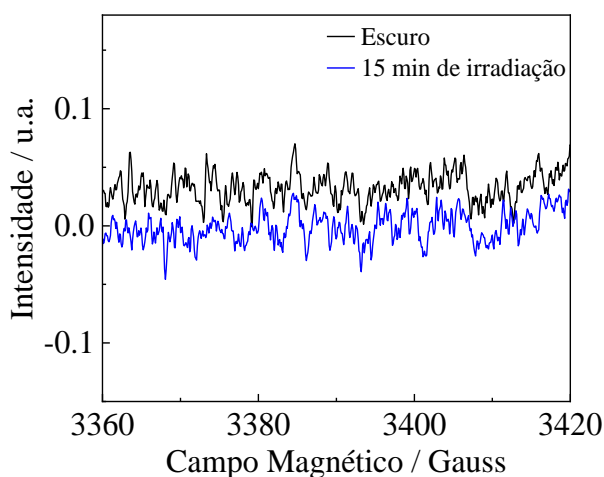
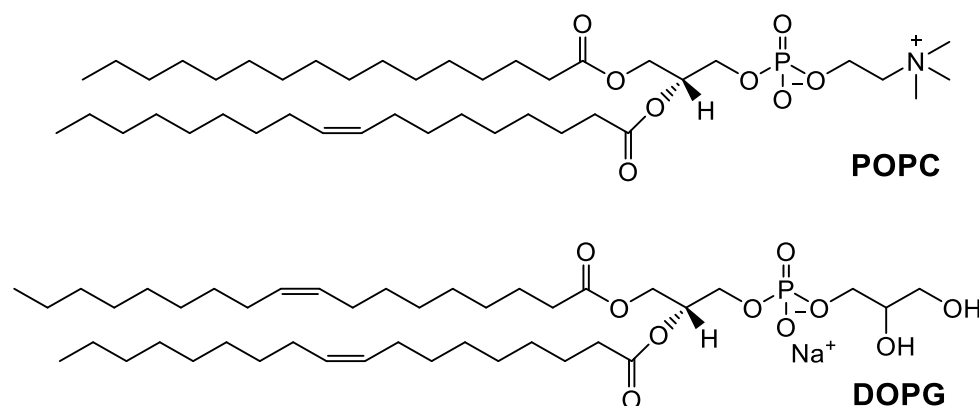


FIGURA 4.52 – Espectros de EPR da mistura DMPO ($0,03 \text{ mol.L}^{-1}$) e RuPDI-Py ($100 \mu\text{M}$) em água no escuro e irradiada com luz de 450 nm durante 15 minutos.

4.7 – Modelos de membrana fosfolipídicas

Diversos estudos vêm sendo realizados para analisar as interações entre moléculas fotossensibilizadoras e modelos miméticos de membranas lipídicas, uma vez que as membranas biológicas são alvos para a ação da terapia fotodinâmica.¹⁶⁷ Os fotossensibilizadores podem interagir com as bicamadas lipídicas ao redor da célula e de organelas e a ação da TFD nas membranas biológicas contribui diretamente para a morte celular devido a danos oxidativos locais e por vias secundárias de sinalização da morte. Os modelos de membrana lipídicas também podem auxiliar na avaliação do potencial de moléculas em atuarem como sondas luminescentes através da interação cromóforo-biomolécula.¹⁶⁸

Neste trabalho, utilizamos as vesículas unilamelares gigantes (GUVs) compostas pelos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-rac-glicerol) (DOPG) (ESQUEMA 4.11) como modelos de membranas lipídicas. O fosfolipídio POPC foi empregado como referência de membrana celular de mamíferos e a mistura POPC/DOPG 80:20 foi empregada como modelo simplificado de membrana bacteriana.¹⁶⁹ A interação com os modelos de membrana e a ação fotodinâmica da díade RuPDI-Py e da referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foram monitoradas por microscopia óptica de fluorescência.



ESQUEMA 4.11 – Estruturas moleculares dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo- (1'-rac-glicerol) (DOPG).

Inicialmente foi avaliada a interação da díade RuPDI-Py com as GUVs POPC/DOPG (80:20). Como apresentado na FIGURA 4.53 e FIGURA 4.54, a díade interagiu com a bicamada, evidenciado pelo sinal de fluorescência no contorno da membrana e, na ausência de irradiação, as vesículas mantiveram-se esféricas e estáveis.

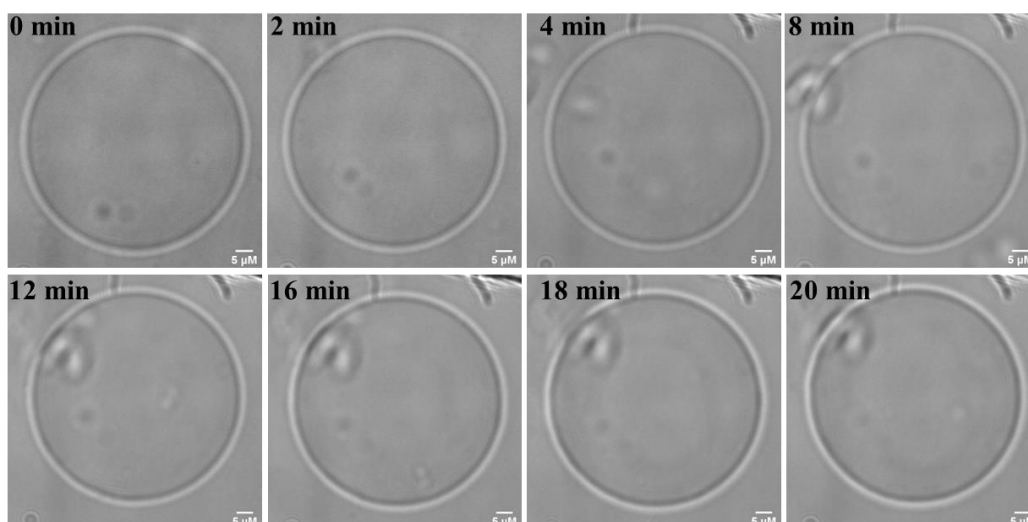


FIGURA 4.53 – Imagens de microscopia óptica de contraste de fase das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py ($2,4 \mu\text{M}$) durante 20 minutos no escuro.

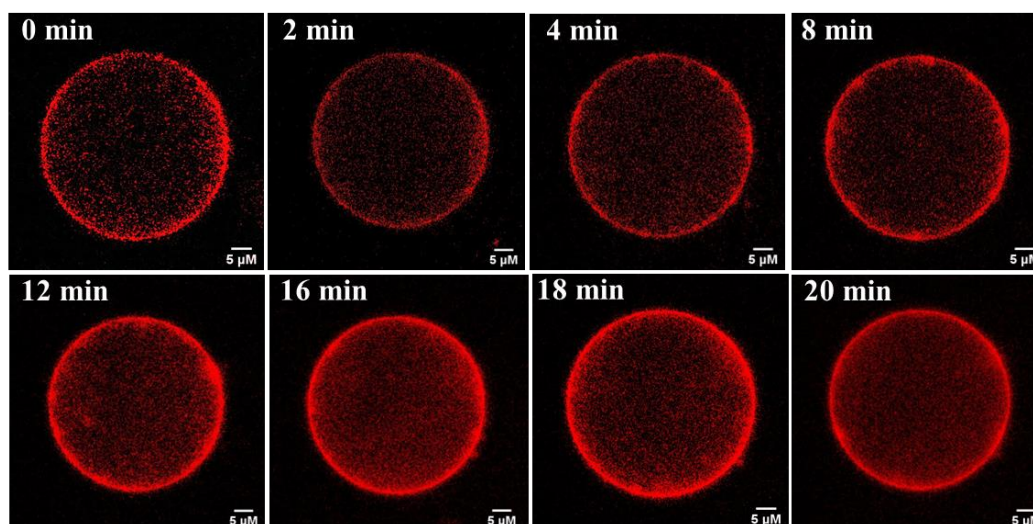


FIGURA 4.54 – Imagens de microscopia de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py ($2,4 \mu\text{M}$) durante 20 minutos no escuro.

Quando as GUVs incubadas com a díade foram submetidas a irradiação contínua com luz de 490 nm, o tratamento com a luz induziu a

alterações morfológicas nas GUVs. As alterações foram monitoradas em tempo real e estão demonstradas na FIGURA 4.55. No início as vesículas apresentaram estrutura esférica e estável, no entanto, após quatro minutos de irradiação, observou-se a formação de poros na membrana. Com o decorrer da irradiação, as vesículas progressivamente reduziram de tamanho e perderam o contraste óptico. Em comparação, as vesículas de controle sem a díade, não apresentaram alterações morfológicas após a irradiação (FIGURA 4.56).

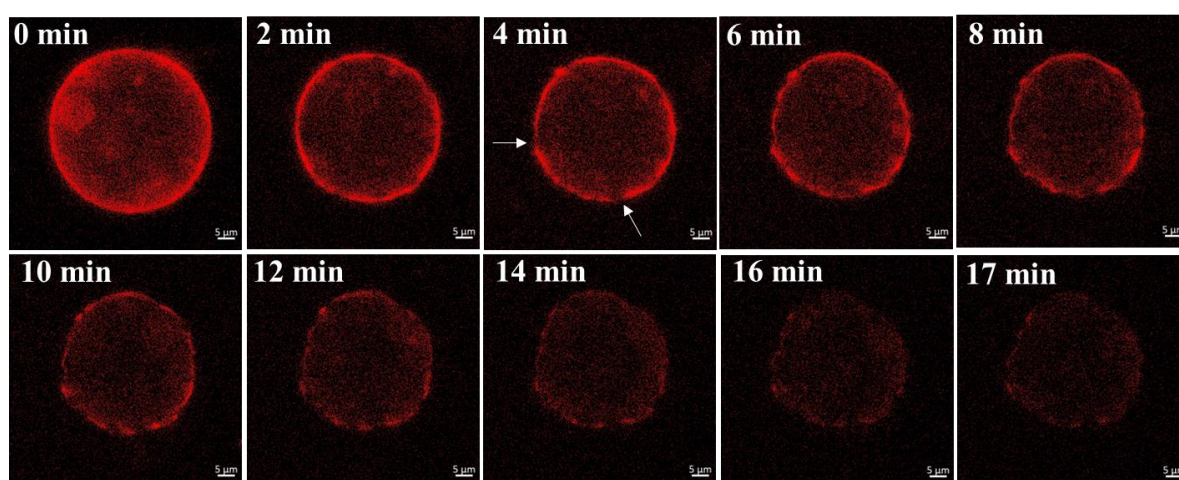


FIGURA 4.55 – Imagens de microscopia de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) monitoradas durante a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 17 min). As setas indicam a formação dos poros.

De acordo com a literatura¹⁷⁰⁻¹⁷², a formação de poros é resultante de alterações químicas nas moléculas lipídicas, como por exemplo a oxidação induzida pelo $^1\text{O}_2$. Devido à formação dos poros as vesículas liberam o líquido interno, resultando na redução do volume das GUVs. Além disso, a perda do contraste está relacionada a troca de sacarose/glicose entre o núcleo da vesícula e o meio externo devido à formação dos poros, pois o índice de refração da solução

de sacarose no núcleo das vesículas difere do da solução externa de glicose e, quando ocorre a perda de contraste, demonstra que tanto as soluções internas quanto as externas foram homogeneizadas. Desta forma, os resultados obtidos demonstraram que o dano físico causado na membrana que resultou na abertura dos poros é diretamente relacionado à presença da díade associada à irradiação e à geração de $^1\text{O}_2$. As alterações morfológicas observadas são consistentes com o relatado para vesículas lipídicas contendo compostos fotossensibilizadores como o azul de metileno e clorinas.^{171,173–175}

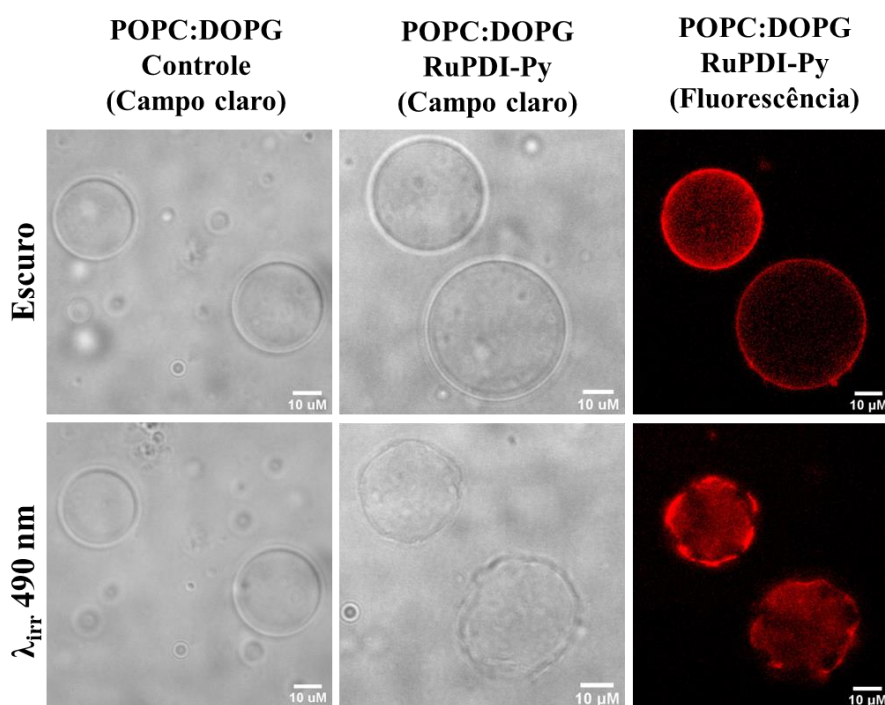


FIGURA 4.56 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) controle (sem a díade) e incubadas com a díade RuPDI-Py (2,4 μM) monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 15 min).

A referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ apresentou uma fraca interação com as GUVs POPC/DOPG (80:20) nas duas concentrações analisadas (2,4 ou 10 μM),

como observado pelo fraco sinal de fluorescência no contorno das vesículas (FIGURA 4.57). Além disso, após a irradiação com luz de 490 nm as vesículas permaneceram estáveis e não foram observadas alterações morfológicas e danos nas vesículas.

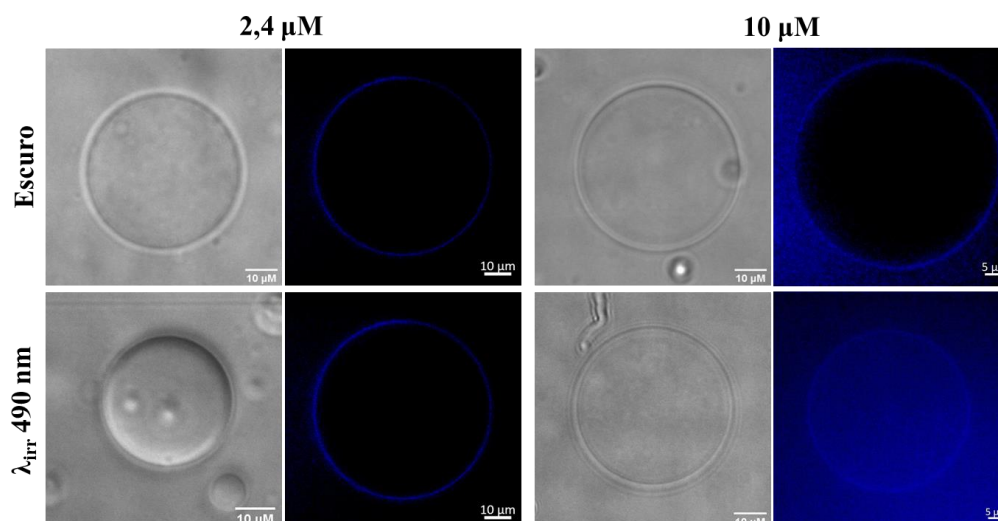


FIGURA 4.57 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC/DOPG (80:20) incubadas com a referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (2,4 e 10 μM), monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 20 min).

A interação da díade RuPDI-Py também foi avaliada com as GUVs compostas somente pelo fosfolipídio neutro POPC. Como demonstrado na FIGURA 4.58, mesmo em maiores concentrações (100 μM) a díade apresentou um fraco sinal de fluorescência no contorno da membrana e, após ao tratamento com a luz, o formato esférico e o tamanho das GUVs foram preservados. A baixa intensidade de fluorescência e a ausência de danos fotodinâmicos indicaram que a afinidade da díade pela membrana composta pelo fosfolipídeo POPC foi menor do que a observada na presença do fosfolipídio aniônico DOPG,

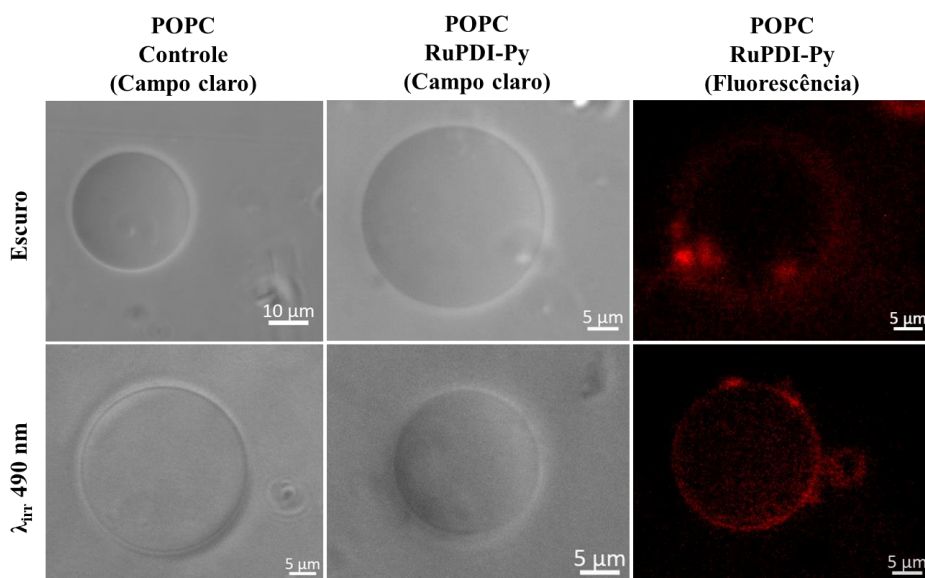


FIGURA 4.58 – Comparação entre as imagens de microscopia de contraste fase e de fluorescência das GUVs POPC controle e incubadas com a díade RuPDI-Py (100 μM) monitoradas no escuro e após a irradiação com luz de 490 nm (tempo total de irradiação = 15 min).

Em resumo, nossos resultados demonstraram que a díade RuPDI-Py apresentou maior interação com as membranas fosfolipídicas na presença do fosfolipídio aniônico DOPG quando comparado com as membranas compostas somente pelo fosfolipídio neutro POPC, provavelmente devido a presença de interações eletrostáticas entre a carga positiva do centro metálico Ru^{2+} e a carga negativa do grupo fosfato presente no fosfolipídeo. Além disso, quando comparado com a referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, a díade apresentou maior afinidade pelas membranas, provavelmente devido às interações hidrofóbicas entre o ligante PDI-Py e a cauda hidrofóbica dos fosfolipídeos. Os resultados acima indicam o uso potencial da díade RuPDI-Py como um biomarcador fluorescente com maior afinidade para membranas celulares aniônicas e, adicionalmente, sob irradiação contínua com luz visível pode ocasionar danos às membranas lipídicas devido à geração de $^1\text{O}_2$.

4.8 – Terapia Fotodinâmica Antibacteriana

Para investigar o potencial da díade RuPDI-Py para aplicação em terapia fotodinâmica antibacteriana (aTFD), sua citotoxicidade e fotocitotoxicidade foram avaliadas em relação a cepa bacteriana *E. Coli* (DH5 α) através do método descrito por Frei *et al.*¹¹⁰ Resumidamente, as soluções da cepa bacteriana foram incubadas com a díade RuPDI-Py em diferentes concentrações (0,5 – 50 μ M.) durante 15 minutos e, em seguida, as células foram irradiadas por 5 min com luz visível (450 nm) e a viabilidade celular foi determinada através do número de unidade de formação de colônia (CFU) por mL (Equação 4.12). Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 4.59 e FIGURA 4.60.

$$\text{CFU / mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado (mL)}} \quad (4.12)$$

No escuro a díade RuPDI-Py não apresentou redução do CFU/mL nas concentrações analisadas (0,5-50 μ M). No entanto, após o tratamento com a luz, houve a redução de 100% do CFU em concentrações da díade acima de 2,5 μ M. Como a viabilidade celular da *E. Coli* não foi afetada pelo tratamento com a díade no escuro, isso confirma que a inativação resultou do efeito fotodinâmico. Esses resultados tornam a díade RuPDI-Py particularmente um candidato promissor para aplicações em aTFD, onde a irradiação com luzes com comprimentos de onda na faixa de 400-500 nm podem ser utilizadas para aplicações tópicas sem causar danos secundários indesejados.

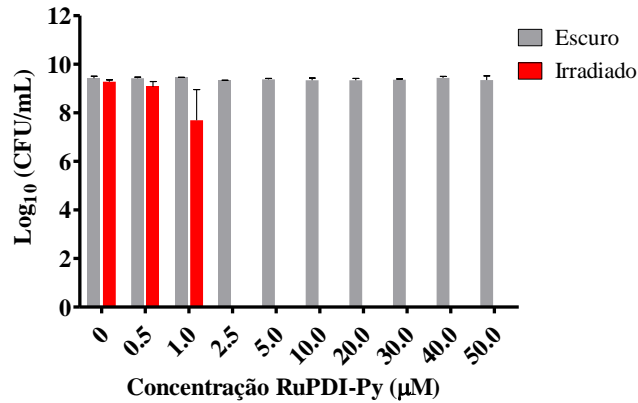


FIGURA 4.59 – Atividade antibacteriana da díade RuPDI-Py em relação a *E. Coli* (DH5α) avaliada após 24 h ao tratamento no escuro e sob irradiação com luz de 450 nm (5 min). Os valores são a média ± SD de n = 3 experimentos independentes.

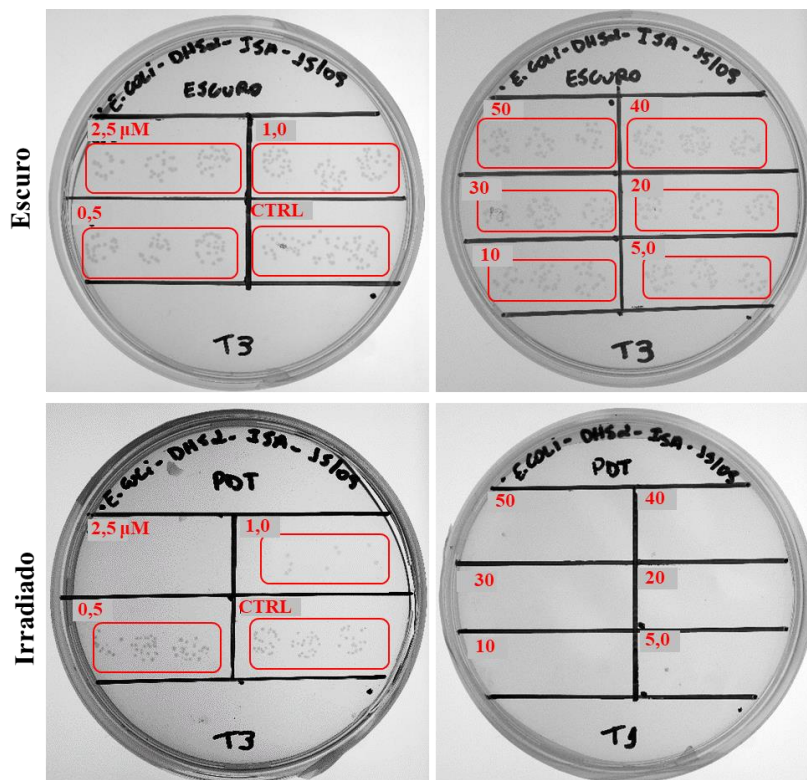


FIGURA 4.60 – Imagens das colônias de *E. Coli* incubadas com a díade RuPDI-Py (0,5 - 50 μM) obtidas 24 h após ao tratamento no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min).

Uma comparação direta da capacidade em inibir o crescimento bacteriano da díade RuPDI-Py com outros fotossensibilizadores descritos na literatura é limitada principalmente pela diferença entre as doses de luz e tipos de cepas de *E. Coli* utilizadas. Por exemplo, um estudo conduzido por Frei *et al.*¹¹⁰ demonstrou que uma série de complexos polipiridínicos de Ru(II) inibiu 100% do CFU/mL da *E. Coli* (ATCC 25922) na concentração de 50 μ M após o tratamento com luz de 450 nm (dose = 8 J.cm⁻²). Já o complexo polipiridínico de [Ru(bpy)₂(merocianina)]²⁺ reduziu em 3 ordens de grandeza o CFU/mL na concentração de 20 μ M após 20 min de irradiação com luz de 635 nm (1,5 mW/cm²).¹⁷⁶

4.9 – Terapia Fotodinâmica antitumoral

4.9.1 – Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade e a fotocitotoxicidade da díade RuPDI-Py e do complexo referência [Ru(phen)₃]²⁺ foram avaliadas *in vitro* em células de melanoma humano da linhagem tumoral MDA-MB-435 através do ensaio de viabilidade celular de MTT. Para comparação os mesmos ensaios foram realizados com o azul de metileno, uma vez que é um fotossensibilizador orgânico que vêm sendo amplamente utilizado como na TFD para o tratamento de diversos tipos de tumores¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, incluindo o tratamento *in vivo* de lesões de melanoma.¹⁸⁰

As células tumorais MDA-MB-435 foram incubadas com os compostos durante 4 h no escuro e posteriormente tratadas com luz de 450 nm durante 5 e 10 minutos para avaliar a fotocitotoxicidade ou mantidas no escuro para avaliar a citotoxicidade. A viabilidade celular foi determinada após 24 h aos

tratamentos. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 4.9 e na FIGURA 4.61.

TABELA 4.9 – Valores de IC₅₀ e do índice de fotocitotoxicidade (PI) dos compostos RuPDI-Py, [Ru(phen)₃]²⁺ e azul de metileno em relação as células tumorais da linhagem MDA-MB-435, determinados no escuro e após ao tratamento com luz de 450 nm durante 5 e 10 minutos de irradiação.

Compostos	Escuro	Luz (5 min)		Luz (10 min)	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	PI ^a	IC ₅₀ (μM)	PI
RuPDI-Py	>250,0	3,42	>73	2,30	>108
[Ru(phen) ₃] ²⁺	61,0	3,46	18	4,16	15
Azul de Metileno	65,0	49,0	1,4	11,0	5,9

^aPI = IC₅₀ escuro / IC₅₀ irradiado

A díade RuPDI-Py não apresentou citotoxicidade no escuro em concentrações até 250 μM. Por outro lado, após o tratamento com luz de 450nm, a díade apresentou um efeito fotocitotóxico dependente do tempo de irradiação e reduziu significativamente a viabilidade celular. Os valores de IC₅₀ obtidos (que corresponde à concentração inibitória necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%) foram de 3,42 μM e 2,30 μM, após 5 e 10 minutos de irradiação, respectivamente.

Diferentemente da díade, a referência [Ru(phen)₃]²⁺ apresentou certa citotoxicidade no escuro (IC₅₀ = 61 μM). No entanto, o efeito citotóxico foi potencializado com o tratamento com a luz e os valores de IC₅₀ obtidos foram

próximos aos valores observados para a díade RuPDI-Py. O azul de metileno também apresentou alguma citotoxicidade no escuro ($IC_{50} = 65 \mu M$) e um efeito fotocitotóxico dependente do tempo de irradiação, porém os valores de IC_{50} após o tratamento com a luz foram maiores em comparação com os compostos de Ru(II).

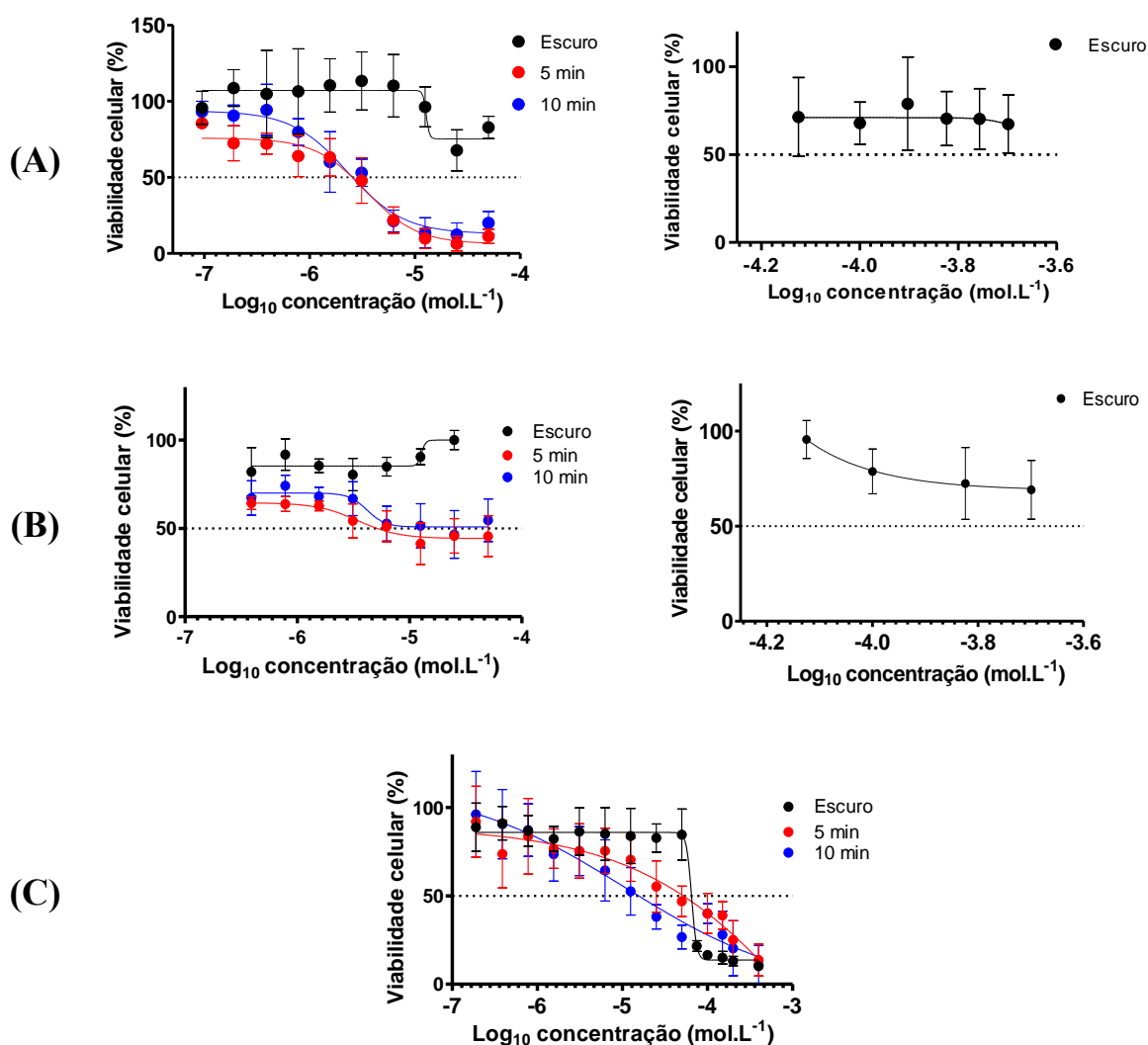


FIGURA 4.61 – Viabilidade celular das células tumorais da linhagem MDA-MB-435 após ao tratamento com os compostos (A) RuPDI-Py, (B) $[Ru(\text{phen})_3]^{2+}$ e (C) azul de metileno, determinada no escuro e após ao tratamento com luz de 450 nm durante 5 e 10 minutos de irradiação.

O índice de fototoxicidade PI (do inglês, *phototoxicity index*) obtido a partir da razão entre os valores de IC₅₀ no escuro e irradiado indica o potencial para a aplicação terapêutica na TFD.¹⁸¹ Um valor de PI mais alto é frequentemente correlacionado com toxicidade externa mínima na dose terapêutica usada para tratamento. Entre os compostos analisados a díade RuPDI-Py apresentou o maior PI (>108) após 10 minutos de irradiação. O baixo valor de PI do azul de metileno demonstrou que a fotoativação não amplificou sua citotoxicidade.

Quando comparado com trabalhos anteriores, o PI da díade RuPDI-Py foi maior do que o relatado para a díade referência [Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺ em relação às células tumorais de melanoma murino B16-F10-Nex2 (PI = 56).⁷⁴ Além disso, os valores de PI do fotossensibilizador TLD-1433, o qual atualmente encontra-se em estudos clínicos de Fase II, relatados para outras linhagens celulares de melanoma foram >102 μM e >100 μM para as células A431 e A375¹⁸² respectivamente, similares ao valor de PI obtido para a díade RuPDI-Py, demonstrando seu potencial para novos estudos para aplicações como fotossensibilizador em TFD.

Apesar da díade RuPDI-Py apresentar absorção na região do NIR, seu efeito fotocitotóxico somente foi alcançado utilizando luz azul de 450 nm, fora da janela fototerapêutica (750 – 800 nm). Como a profundidade de penetração da luz no tecido é baixa nesse comprimento de onda, a aplicação da díade para tratar tumores profundos ou grandes pode tornar-se limitada. Atualmente a estratégia que vêm sendo utilizada para superar essas limitações de diversos compostos de Ru(II) candidatos à fotossensibilizadores é a TFD de absorção de dois fótons.^{183–186} Nesta técnica, a absorção de dois fótons de comprimentos de onda na região do NIR leva a população do estado excitado que normalmente seria preenchido pela absorção de um fóton com cerca do dobro da energia, resultando na ativação do fotossensibilizador com luz dentro da janela fototerapêutica e tornando-o adequado para aplicações terapêuticas. Dessa forma, estudos futuros

para avaliar a eficiência fotodinâmica da díade RuPDI-Py através do processo de absorção de dois fótons pode ser uma estratégia para contornar essa desvantagem.

4.9.2 – Microscopia de fluorescência e FLIM

As técnicas de microscopia de fluorescência e de microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM) foram utilizadas para verificar os efeitos da díade RuPDI-Py sobre a morfologia celular antes e depois do tratamento com a luz e para caracterizar a localização celular da díade RuPDI-Py. As imagens de fluorescência foram obtidas após a marcação das organelas celulares da linhagem MDA-MB-435. As células foram coradas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol(DAPI) para marcação do núcleo e com *Alexa 488 Fluor® Phalloidin* (Faloidina, Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific). A Faloidina é um marcador celular que possui alta seletividade por filamentos de actina F (uma proteína abundante do citoesqueleto) enquanto o Alexa Fluor 488 fornece uma intensa fluorescência verde ($\lambda_{EX/EM}$ 495/518 nm). O marcador *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG, Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific) foi utilizado como sonda para oxigênio singlete e a luminescência da díade RuPDI-Py foi utilizada para visualizar o acúmulo celular após ao tratamento com a luz.

Como demonstrado na FIGURA 4.62 os resultados obtidos com a marcação com o DAPI e com a Faloidina indicaram que, no escuro, a díade RuPDI-Py não foi capaz de alterar a estrutura do citoesqueleto em comparação com o controle sem a díade, mantendo a morfologia em forma de um fuso, isto é, com um corpo aproximadamente cilíndrico, mas cujas extremidades são alongadas e afiladas. Por outro lado, o tratamento com luz de 450 nm na presença da díade RuPDI-Py induziu a alterações significativas na estrutura do citoesqueleto, caracterizadas pela redução do volume celular e mudança da

morfologia para um formato arredondado quando comparado com o controle irradiado. Os resultados também indicaram que o tratamento com a díade no escuro não induziu alterações na morfologia no núcleo.

A propriedade de luminescência da díade RuPDI-Py foi explorada para utilizá-la como uma ferramenta de diagnóstico para imagens celulares e para investigar sua distribuição subcelular. As imagens de FLIM obtidas utilizando o comprimento de onda de excitação de 640 nm (FIGURA 4.63), no qual somente a díade absorve, demonstraram a fluorescência da díade com um tempo de vida mais longo (3,45 ns) na mesma região em que a fluorescência da sonda específica Faloidina foi observada e indicando as mesmas alterações na estrutura do citoesqueleto. Adicionalmente, quando as células foram marcadas apenas com a díade e o DAPI (FIGURA 4.64), a fluorescência da díade foi observada em regiões ao redor do núcleo. Esses resultados indicaram que a díade RuPDI-Py parece acumular-se preferencialmente no citoplasma e pode atuar como um marcador celular, monitorando a luminescência com diferentes comprimentos de onda de excitação.

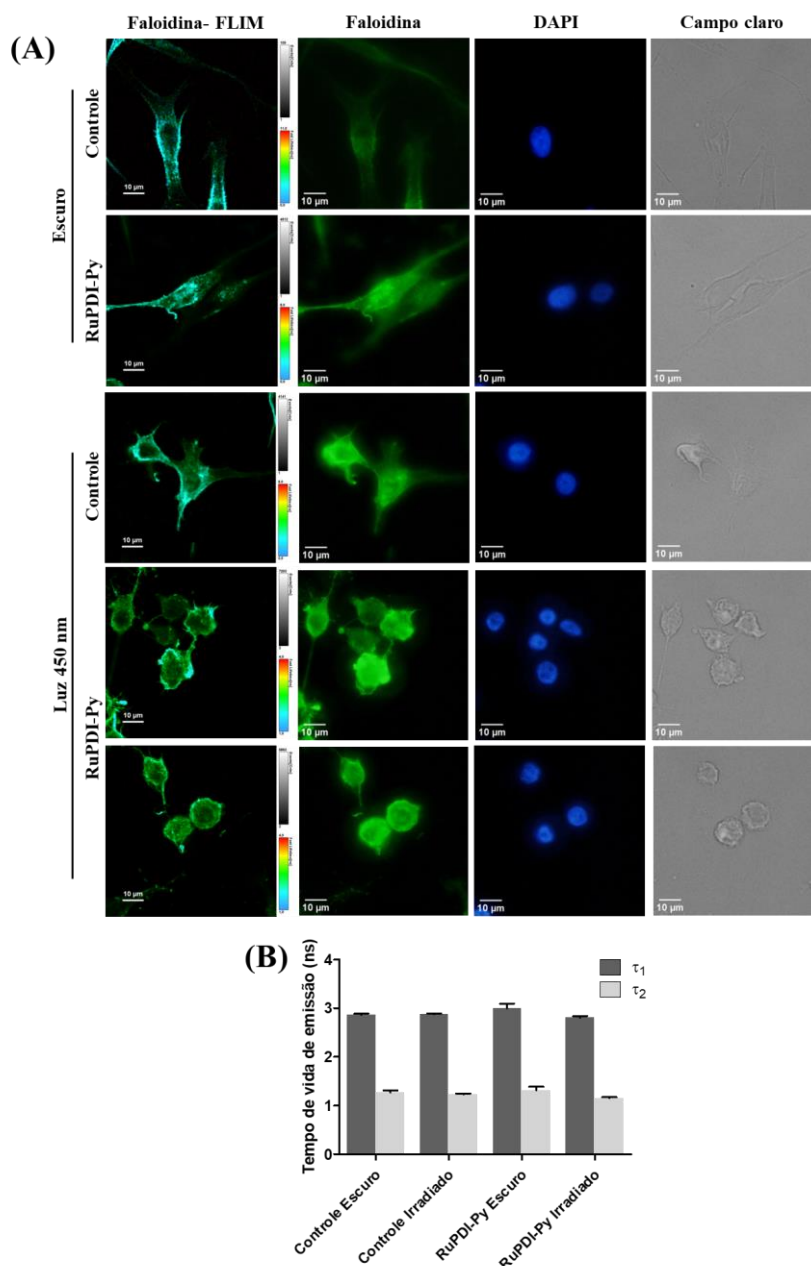


FIGURA 4.62 – (A) Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μ M) durante 4 h no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 350/450 nm) e Alexa 488 Fluor® Faloidina (Fluorescência = λ_{EX}/EM 470/560 nm; FLIM = λ_{EX}/EM 470/490 nm). Células sem a díade RuPDI-Py e mantidas sob as mesmas condições foram utilizadas como controle. (B) Tempos de vida de emissão das imagens obtidas por microscopia FLIM.

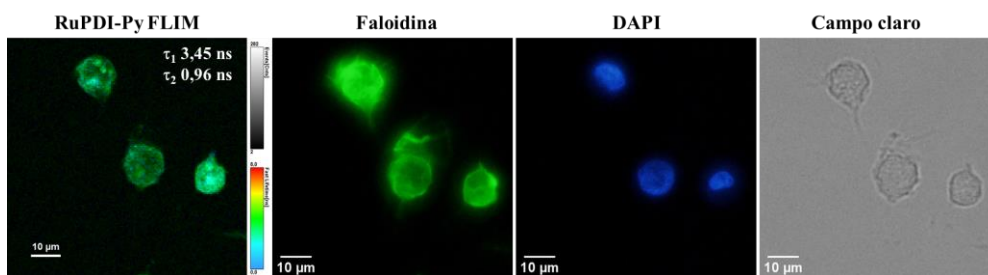


FIGURA 4.63 - Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μM) durante 4 h e tratadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{\text{EX/EM}}$ 350/450 nm) e Alexa 488 Fluor® Faloidina (fluorescência = $\lambda_{\text{EX/EM}}$ 470/560 nm) e a luminescência da díade RuPDI-Py (FLIM = $\lambda_{\text{EX/EM}}$ 640/690 nm).

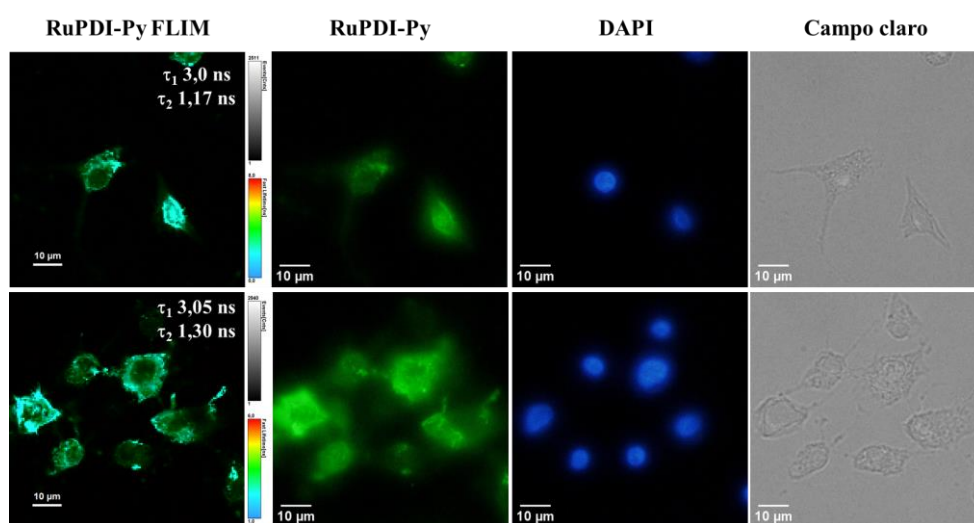


FIGURA 4.64 – Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μM) durante 4 h e tratadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando o marcador DAPI ($\lambda_{\text{EX/EM}}$ 350/450 nm) e a luminescência da díade RuPDI-Py (fluorescência = $\lambda_{\text{EX/EM}}$ 470/560 nm; FLIM = $\lambda_{\text{EX/EM}}$ 640/690 nm).

Para obter evidências de geração de oxigênio singlete nas células MDA-MB-435 após o tratamento com a díade RuPDI-Py, usamos o marcador SOSG, que é uma sonda fluorescente comercial para imagens de $^1\text{O}_2$.^{187,188} Inicialmente as células foram incubadas com a díade RuPDI-Py por 4 h no escuro e, em seguida, o meio foi removido e as células foram incubadas com o SOSG durante 10 min. Após esse período, o SOSG foi removido e um meio novo foi adicionado. Então, as células foram tratadas com luz de 450 nm durante 5 minutos. As células foram fixadas após 24 h ao tratamento com luz. Células sem a díade foram mantidas como controle. A fluorescência do SOSG foi monitorada por microscopia de fluorescência e por FLIM e os resultados estão apresentados na FIGURA 4.65. A fluorescência do SOSG foi detectada tanto nas células controle como nas células tratadas com a díade RuPDI-Py no escuro e após o tratamento com a luz. Quando comparado com o marcador DAPI a fluorescência do SOSG foi localizada preferencialmente no citoplasma. Assim como observado anteriormente com a Falodina, a tratamento com a luz na presença da díade resultou em alterações na morfologia celular, como o encolhimento do citoesqueleto, perda de adesão celular, redução da área ocupada pelas células e morfologia arredondada.

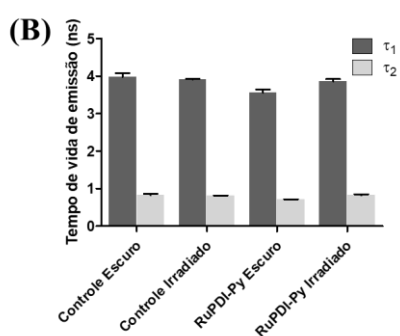
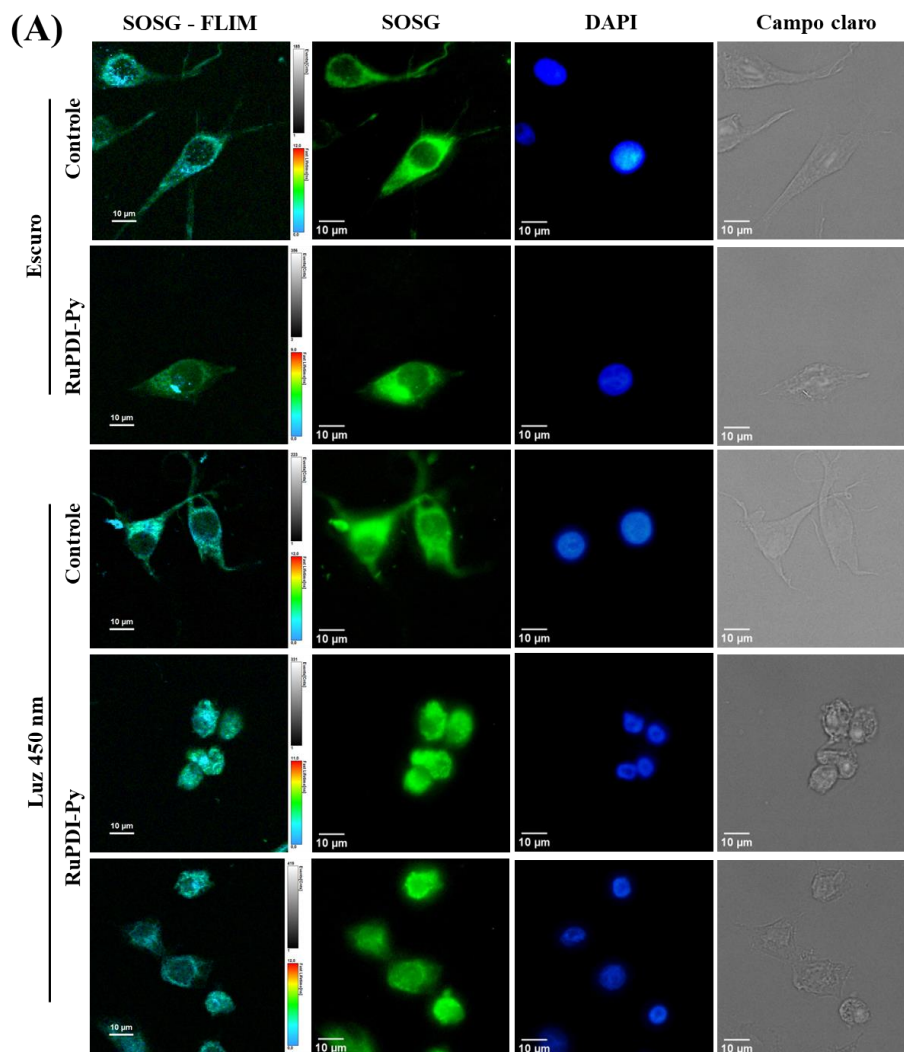


FIGURA 4.65 – (A) Imagens de microscopia de fluorescência, FLIM e de contraste de fases das células MDA-MB-435 incubadas com a díade RuPDI-Py (10 μ M) durante 4 h no escuro e irradiadas com luz de 450 nm (5 min). As imagens foram avaliadas após 24 h ao tratamento, utilizando os marcadores DAPI ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 350/450 nm) e SOSG (Fluorescência = λ_{EX}/EM 470/560 nm; FLIM = λ_{EX}/EM 470/490). Células sem a díade RuPDI-Py e mantidas sob as mesmas condições

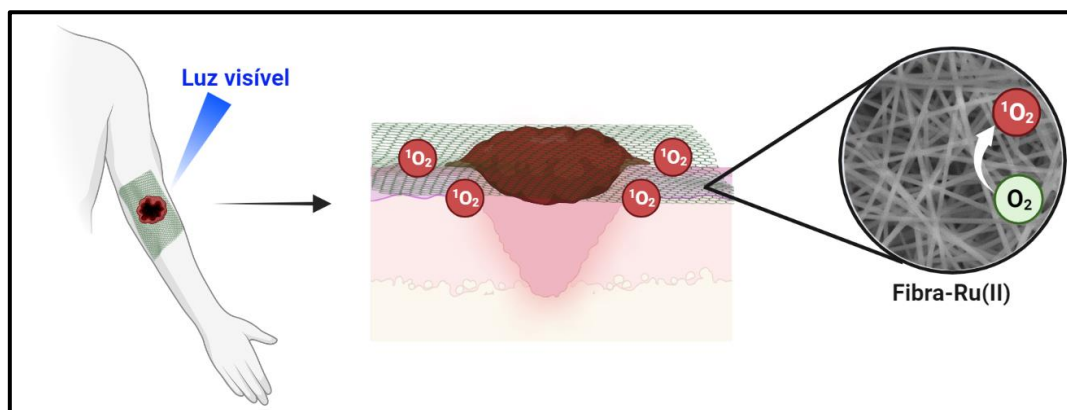
foram utilizadas como controle. (B) Tempos de vida de emissão das imagens obtidas por microscopia FLIM.

Os resultados obtidos a partir das imagens de microscopia de fluorescência demonstraram que as propriedades luminescentes da díade na região do NIR podem ser utilizadas como um biomarcador, uma vez que a díade é capaz de acumular-se preferencialmente no citoplasma. Por outro lado, a excitação da díade com luz visível, além de permitir a observação da fluorescência é capaz de gerar o oxigênio singlete e induzir danos citotóxicos significativos. Esses resultados demonstram que a díade RuPDI-Py pode ser aplicada como um potencial agente teranóstico, devido às suas propriedades luminescentes em combinação com os efeitos da TFD. Além disso, a orientação por imagem óptica na TFD tem um alto potencial na clínica, pois permite o monitoramento não invasivo em tempo real da TFD, permitindo a determinação da localização e da absorção do fotossensibilizador em tecidos tumorais bem como a avaliação do resultado pós-tratamento.

4.10 – Desenvolvimento de nanofibras poliméricas fotoativas para o tratamento tópico de câncer de pele melanoma

Um dos objetivos deste projeto de pesquisa consistiu no desenvolvimento de nanofibras poliméricas funcionalizadas com a díade RuPDI-Py para a foto-geração de $^1\text{O}_2$ para aplicações no tratamento tópico de câncer de pele melanoma. Nosso conceito para alcançar o efeito da terapia fotodinâmica é que o $^1\text{O}_2$ gerado na superfície da nanofibra polimérica funcionalizada utilizando luz visível seja difundido para o alvo biológico, no caso as células tumorais de melanoma, resultando em danos citotóxicos no tecido local da aplicação sem que

ocorra a liberação da díade, como exemplificado no ESQUEMA 4.12. Dessa maneira, a fibra polimérica atua como um suporte sólido para a díade RuPDI-Py capaz de fotossensibilizar o $^1\text{O}_2$.



ESQUEMA 4.12 – Aplicação tópica das nanofibras poliméricas fotoativas funcionalizadas com a díade RuPDI-Py para o tratamento de câncer de pele melanoma.

4.10.1 – Preparação das nanofibras poliméricas por eletrofiação

As nanofibras poliméricas foram preparadas utilizando a técnica de eletrofiação. Selecionamos a eletrofiação por ser uma técnica que permite o preparado de fibras com diâmetro na escala nanométrica a micrométrica que possuem propriedades importantes para aplicações tópicas, incluindo a grande relação área superficial/volume, alta porosidade e permeabilidade de gases através da matriz polimérica possibilitando a difusão do $^1\text{O}_2$, flexibilidade mecânica permitindo a adaptabilidade dessas nanofibras ao contorno das lesões, a possibilidade do uso de diferentes tipos de polímeros, além da flexibilidade na

funcionalização da superfície o que permite a incorporação de diferentes moléculas.^{189–191} As nanofibras poliméricas vêm sendo utilizadas como suportes sólidos para compostos fotossensibilizadores de $^1\text{O}_2$ para diversas aplicações, incluindo terapia fotodinâmica antibacteriana^{189,192–198} e antitumoral.^{191,199,200}

Um sistema convencional de eletrofiação está representado na FIGURA 4.66 e é constituído por uma fonte de alta tensão, uma seringa com agulha metálica acoplada a uma bomba para ejeção da solução e um coletor metálico condutor. O processo de eletrofiação consiste em três etapas sequenciais. Inicialmente ocorre a passagem da solução polimérica da seringa para a agulha para formar uma gota na ponta da agulha. Em seguida, um campo elétrico é aplicado e a repulsão eletrostática entre as cargas da superfície leva à distorção da gota para uma forma cônica, conhecida como cone de Taylor. Quando as forças eletrostáticas repulsivas superam a tensão superficial da gota, um jato da solução polimérica é ejetado da ponta do cone de Taylor. Devido à influência de um campo elétrico, este jato com formato alongado e distorcido se move em direção ao coletor aterrado. Por fim, ocorre a evaporação do solvente e o material polimérico é depositado no coletor.^{201–204}

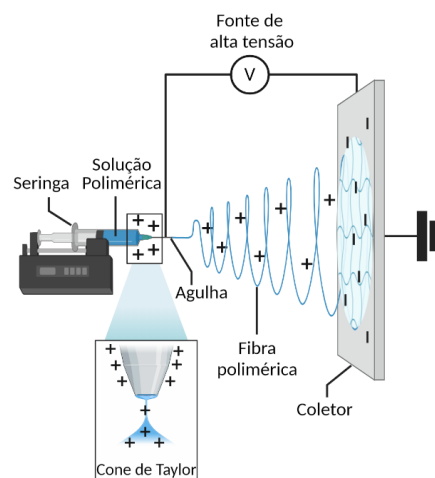


FIGURA 4.66 – Representação esquemática do processo de eletrofiação das nanofibras poliméricas. Figura adaptada da referência Mercante et al. (2017).²⁰⁴

Para o preparo das nanofibras poliméricas selecionamos o polímero poliacrilonitrila (PAN) que vêm sendo amplamente utilizado no preparo de nanofibras poliméricas para aplicações como filtros de água e como curativos devido às suas características únicas, como caráter hidrofóbico, alta resistência mecânica, excelente estabilidade térmica e química, resistência à luz e não toxicidade.²⁰⁵

As nanofibras de PAN foram funcionalizadas adicionando a díade RuPDI-Py no *core*, isto é, a díade foi incorporada na solução polimérica antes do processo de eletrofiação. Optamos por esse processo de funcionalização devido aos testes preliminares que demonstraram que as nanofibras funcionalizadas por adsorção (pós-tratamento) rapidamente liberavam a díade quando em contato com uma solução aquosa. As nanofibras de PAN funcionalizadas no *core* com a díade RuPDI-Py (PAN/RuPDI-Py) obtidas estão demonstradas na FIGURA 4.67.

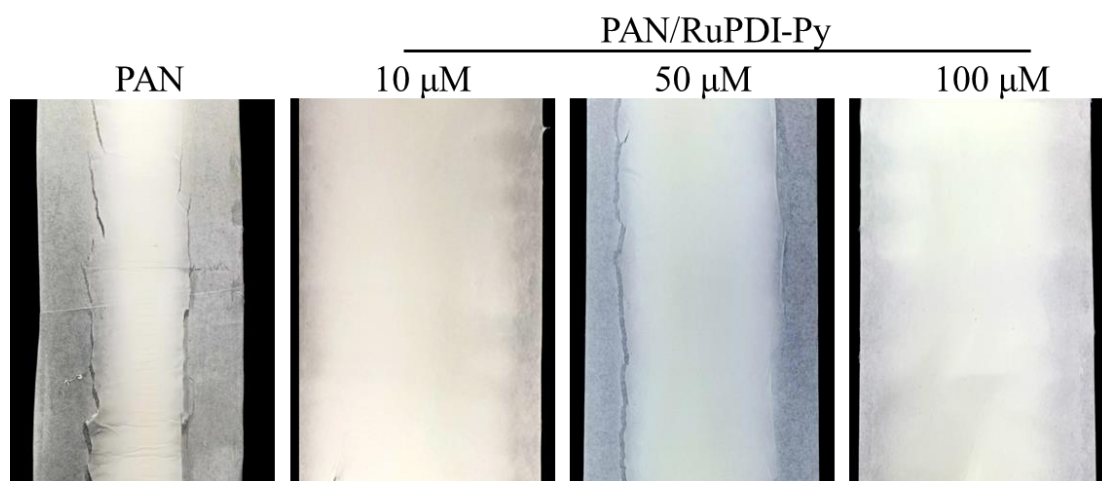


FIGURA 4.67 – Imagens das nanofibras poliméricas PAN e PAN/RuPDI-Py obtidas por eletrofiação.

4.10.2 – Caracterização morfológica das nanofibras poliméricas

A morfologia das mantas de nanofibras e o diâmetro das nanofibras foram caracterizados usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens de MEV e o diâmetro médio das nanofibras estão representados na FIGURA 4.68 e na TABELA 4.10.

As nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com as concentrações de 10 a 100 μM da díade exibiram morfologia semelhante à observada para as nanofibras controle PAN, com estrutura uniforme, orientada aleatoriamente e sem a presença de *beads*, com diâmetros aproximadamente 17% maiores em relação ao diâmetro médio da nanofibra de PAN nas concentrações de 10 e 50 μM . No entanto, as nanofibras PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com 250 μM exibiram uma redução no diâmetro das nanofibras de 66% em relação às nanofibras de PAN e, adicionalmente, apresentaram estruturas não-uniformes e com a presença de *beads*, provavelmente devido à mudança na viscosidade da solução devido a maior concentração da díade RuPDI-Py.

TABELA 4.10 – Diâmetro médio das nanofibras de PAN e de PAN-RuPDI-Py calculados a partir das imagens de MEV (n = 100).

Nanofibra	Diâmetro médio, μm (Desvio Padrão)
PAN	0,742 (\pm 0,112)
PAN/RuPDI-Py (10 μM)	0,873 (\pm 0,064)
PAN/RuPDI-Py (50 μM)	0,843 (\pm 0,090)
PAN/RuPDI-Py (100 μM)	0,743 (\pm 0,097)
PAN/RuPDI-Py (250 μM)	0,256 (\pm 0,060)

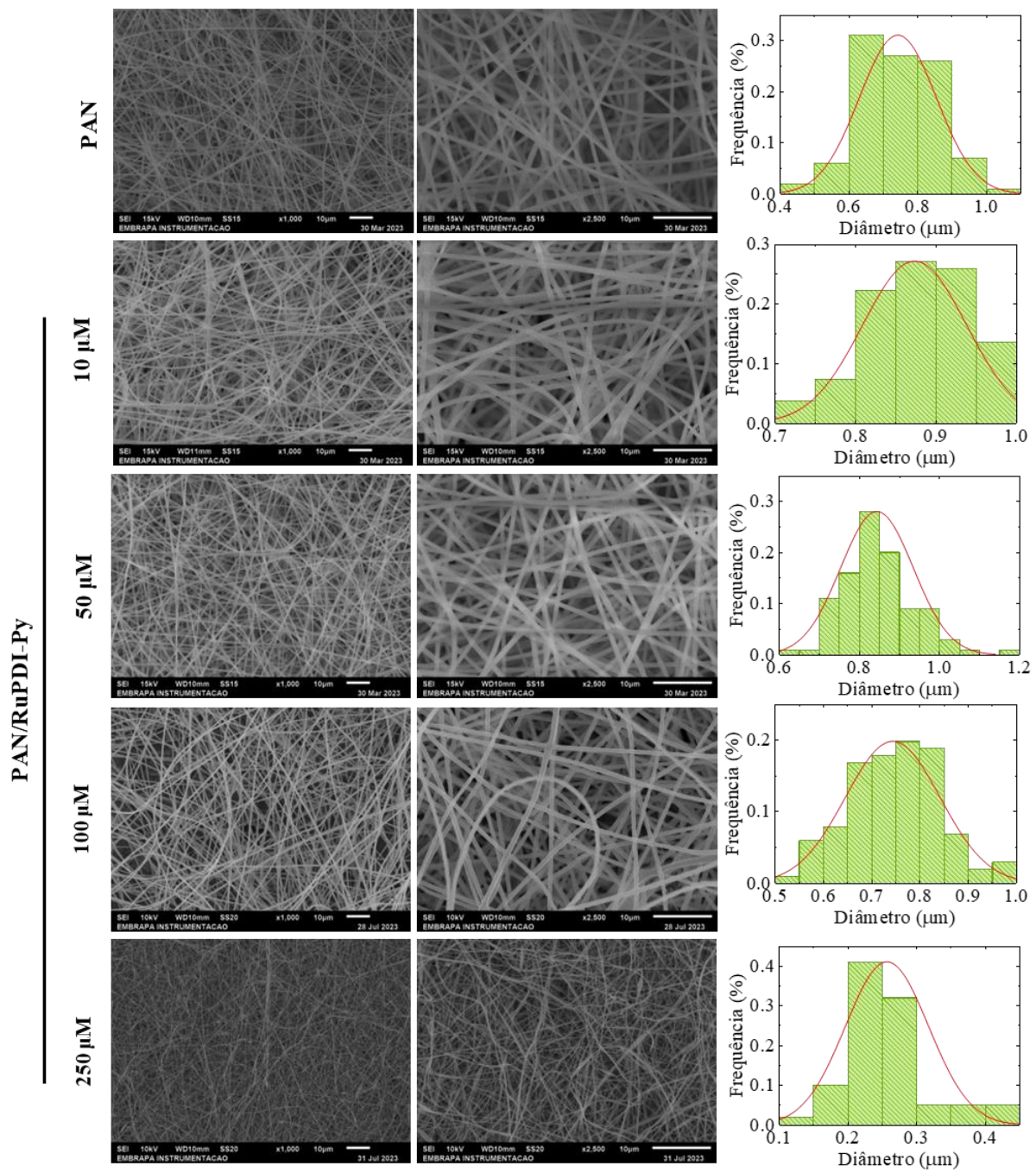


FIGURA 4.68 – Imagens de MEV e diâmetro médio das nanofibras de PAN e de PAN/RuPDI-Py (10-250 μM).

4.9.3 – Propriedades luminescentes das nanofibras poliméricas

O efeito da imobilização no polímero nas propriedades luminescentes dos compostos de Ru(II) foi avaliada por espectroscopia de luminescência. Inicialmente analisamos as nanofibras de PAN funcionalizadas com o complexo referência $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (PAN/Ruphen) e os resultados são mostrados na FIGURA 4.69.

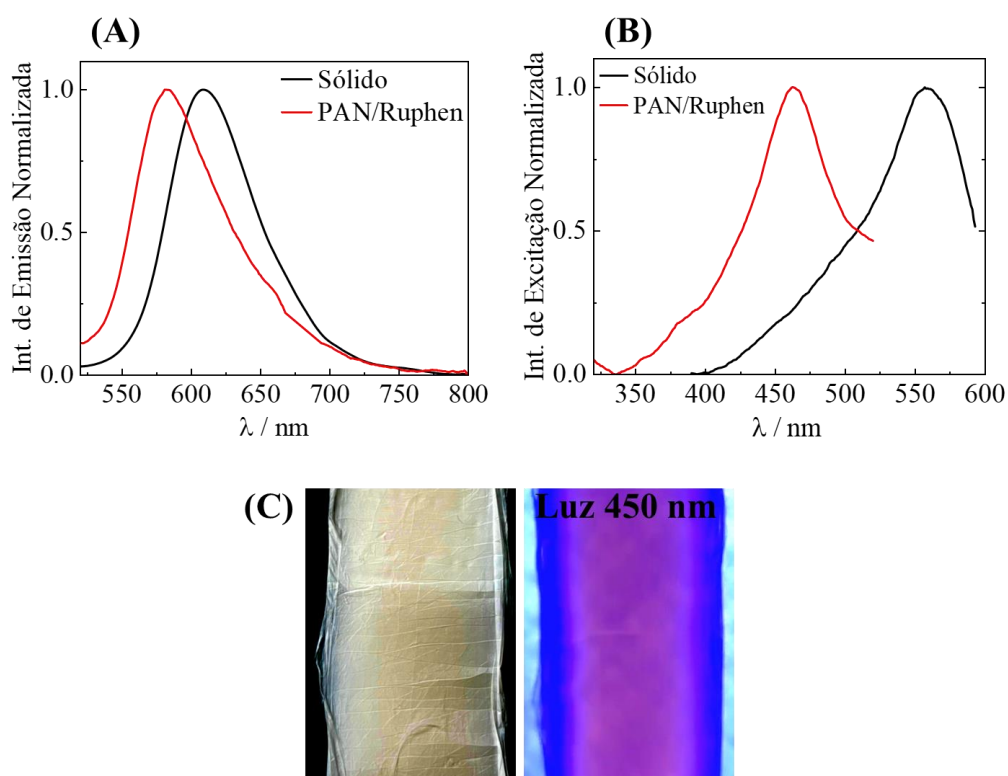


FIGURA 4.69 – Comparação entre os espectros de (A) emissão e de (B) excitação com $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$, respectivamente, da nanofibras de PAN/Ruphen (100 mM) e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ no estado sólido. (C) Imagens da nanofibra de PAN/Ruphen no escuro e da luminescência observada com a irradiação com luz azul de 450 nm.

O espectro de emissão da nanofibra de PAN/Ruphen (FIGURA 4.69A) foi caracterizado por uma banda com máximo em 583 nm, típica da emissão da fosforescência do estado $^3\text{MLCT}$. Quando comparado com a emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ no estado sólido, a emissão do estado $^3\text{MLCT}$ na nanofibra foi deslocada 27 nm para o azul, indicando que a imobilização no polímero resultou em um pequeno aumento da energia do estado excitado emissivo $^3\text{MLCT}$. O espectro de excitação da nanofibra de PAN/Ruphen (FIGURA 4.69B) foi caracterizado por uma banda com máximo em 467 nm e também apresentou um deslocamento para maiores energias em comparação com o espectro de excitação no estado sólido ($\lambda_{\text{max}} = 557 \text{ nm}$). Comportamentos similares foram previamente observados para outras nanofibras poliméricas funcionalizadas com complexos de metais de transição luminescentes.^{206,207}

Conforme demonstrado na FIGURA 4.69C, a manta de nanofibras de PAN/Ruphen apresentou coloração amarela, no entanto, ao iluminá-lo com uma fonte de luz azul (450 nm) foi possível observar a luminescência alaranjada característica do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, distribuída homogênea no centro da manta de nanofibras, indicando que as moléculas do complexo estão dispersas na estrutura da manta de forma homogênea.

Apesar do aumento de energia do estado excitado $^3\text{MLCT}$ não foram observados mudanças significativas no formato da banda de emissão e nenhuma nova banda foi observada. Esses resultados indicam que não houve uma forte interação entre as moléculas do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ e as nanofibras poliméricas de PAN, isto é, o complexo foi simplesmente imobilizadas na matriz polimérica e suas propriedades luminescentes foram preservadas. Não foi possível detectar a luminescência das nanofibras de PAN funcionalizadas com a díade RuPDI-Py nas concentrações de 10 a 250 μM , provavelmente devido aos baixos valores de rendimento quântico de emissão da díade.

4.10.4 – Cinética de liberação dos compostos imobilizados nas nanofibras poliméricas

A cinética de liberação da díade RuPDI-Py das nanofibras de PAN/RuPDI-Py em solução tampão PBS (pH 7,4) foi avaliada pelas técnicas de espectroscopia de UV-Vis e de luminescência. Conforme demonstrado na FIGURA 4.70 e FIGURA 4.71, a absorbância e a luminescência da díade não foram detectadas em solução após 4 h de incubação no escuro e após 30 min de irradiação com luz azul de 450 nm, demonstrando que não houve a liberação da díade da superfície das nanofibras nessas condições. Esses resultados sugerem que provavelmente as moléculas díade RuPDI-Py estão fortemente ligadas ou adsorvidas nas nanofibras.

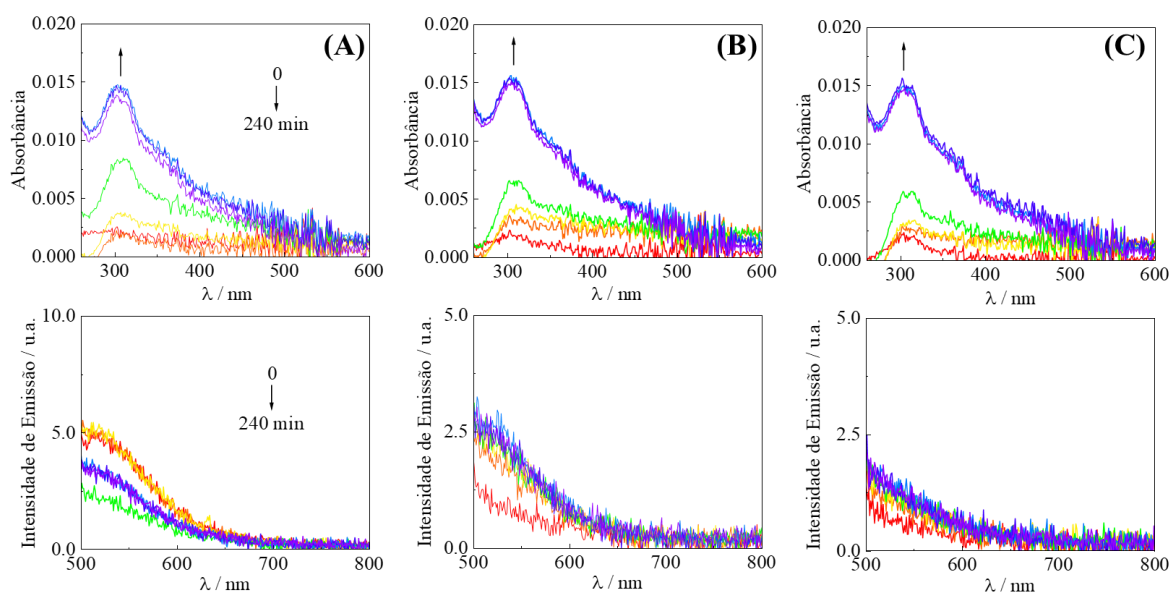


FIGURA 4.70 – Cinética de liberação das nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com a díade RuPDI-Py nas concentrações de (A) 10 μM , (B) 50 μM e (C) 100 μM , incubadas no escuro em solução tampão PBS (pH 7,4) e

monitorada por espectroscopia de UV-Vis e de luminescência ($\lambda_{EX} = 450 \text{ nm}$) (tempo total de incubação = 4 h).

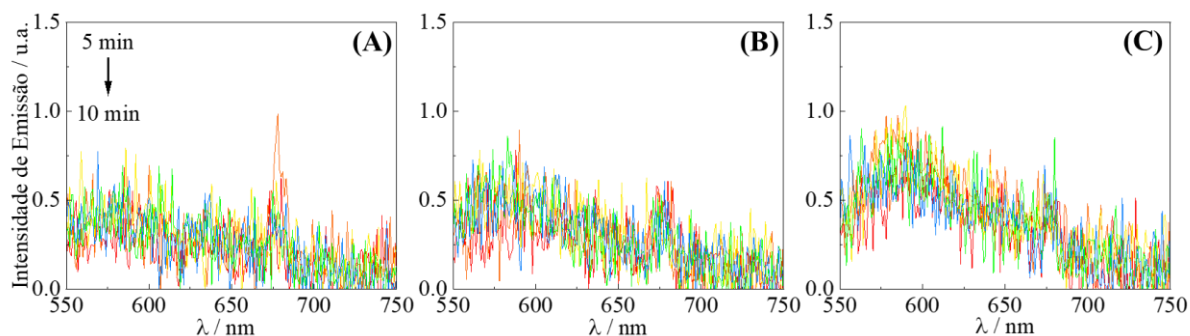


FIGURA 4.71 – Cinética de liberação das nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com a díade RuPDI-Py nas concentrações de (A) 10 μM , (B) 50 μM e (C) 100 μM , incubadas em solução tampão PBS (pH 7,4) e irradiadas com luz azul de 450 nm durante 30 min, monitorada por espectroscopia de luminescência ($\lambda_{EX} = 450 \text{ nm}$).

4.10.5 – Geração de oxigênio singlete pelas nanofibras poliméricas

A capacidade das nanofibras poliméricas em fotossensibilizar o $^1\text{O}_2$ foi avaliada pelas técnicas de EPR e de UV-Vis utilizando as sondas para o $^1\text{O}_2$ TMP-OH e DMA, respectivamente, conforme descrito nas seções 4.5.1 e 4.5.2.

Nos ensaios de EPR as amostras das mantas de nanofibras de PAN/RuPDI-Py e do controle PAN (discos com 2 cm de diâmetro) foram imersas em uma solução contendo o TMP-OH (48 mM) em tampão PBS (pH 7,4) e irradiadas com luz azul de 450 nm. Conforme ilustrado na FIGURA 4.72, após a irradiação das nanofibras de PAN e de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com as concentrações da díade de 50 e 100 μM , resultou no sinal de EPR com intensidade

e área idênticas, demonstrando que a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada foi similar em todas as nanofibras analisadas. Esses resultados indicaram que não houve diferença no desempenho de geração de $^1\text{O}_2$ entre a nanofibra controle PAN e as nanofibras funcionalizadas com essas concentrações da díade RuPDI-Py, provavelmente devido à baixa concentração da díade imobilizada na nanofibra associada ao baixo valor de rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ em solução aquosa. Por exemplo, como descrito na seção 4.5.2, 150 μM da díade em solução aquosa foi capaz de gerar 1,2 μM de $^1\text{O}_2$ após 30 min de irradiação com luz de 450 nm.

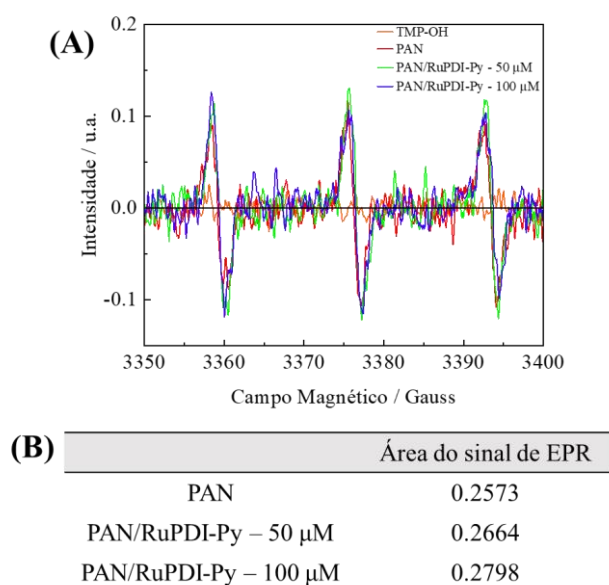


FIGURA 4.72 – (A) Espectros de EPR da mistura TMP-OH (48 mM) e nanofibras de PAN, PAN/RuPDI-Py (50 μM) e PAN/RuPDI-Py (100 μM) irradiadas com luz de 450 nm durante 30 min. Uma solução contendo somente o TMP-OH irradiado foi utilizada como controle. (B) Comparação entre as áreas dos sinais de EPR calculadas a partir do sinal em 3375 Gauss.

Para otimizar a geração de $^1\text{O}_2$, preparamos as nanofibras de PAN/RuPDI-Py funcionalizadas com uma concentração maior da díade (250 μM)

e avaliamos pela técnica de UV-Vis. As amostras das mantas de nanofibras de PAN/RuPDI-Py e do controle PAN (discos com 2 cm de diâmetro) foram imersas em uma solução contendo DMA ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em uma mistura de PBS/EtOH 1/1 (v/v) e irradiadas com luz azul de 450 nm. Como demonstrado na FIGURA 4.73, a irradiação da nanofibra de PAN/RuPDI-Py ($250 \mu\text{M}$) resultou no consumo de 26% da banda de absorção do DMA enquanto a nanofibra de PAN consumiu 16%. Esses resultados demonstraram que maiores concentrações da díade RuPDI-Py potencializou a geração de $^1\text{O}_2$ pelas nanofibras funcionalizadas, uma vez que o consumo da absorção do DMA é diretamente proporcional à quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada. Além disso, esses resultados também demonstraram que o $^1\text{O}_2$ gerado foi capaz de se difundir das nanofibras para a solução aquosa e reagir com o substrato ao redor.

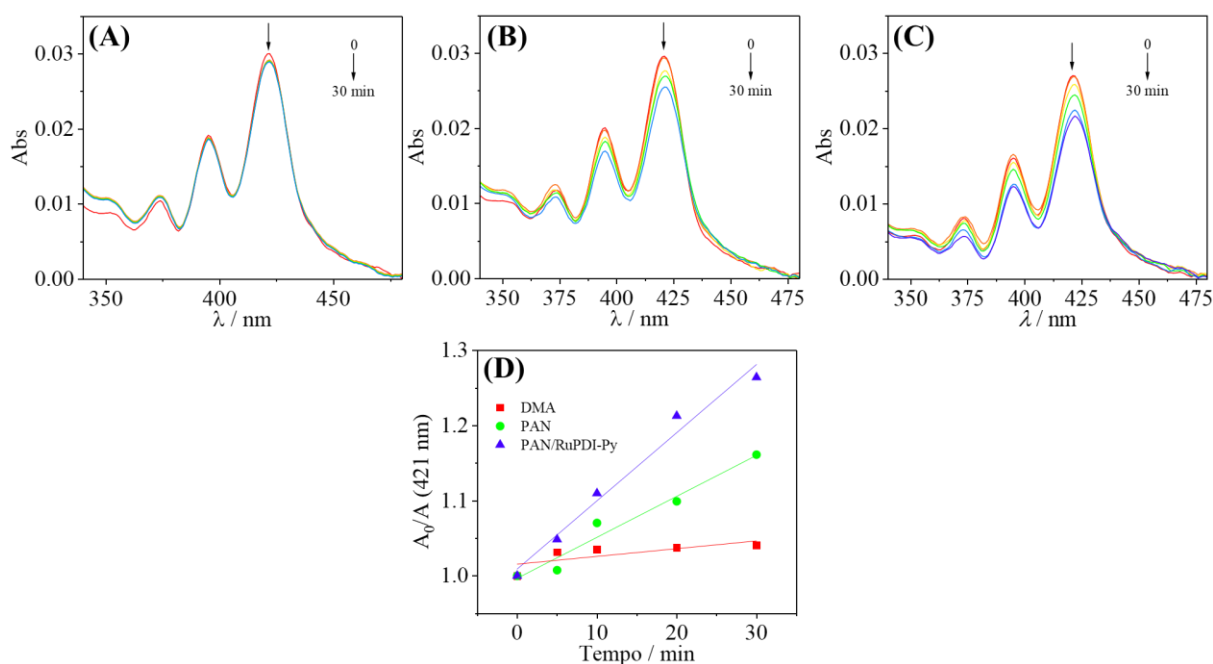


FIGURA 4.73 – Espectros de absorção do DMA na mistura de PBS/EtOH 1/1 (v/v), (A) controle (somente o DMA irradiado) e na presença das nanofibras de (B) PAN e de (C) PAN/RuPDI-Py ($250 \mu\text{M}$), irradiada com luz azul de 450 nm durante 30 min. (D) Consumo da banda de absorção do DMA demonstrado através

da correlação A_0/A vs tempo de irradiação, onde A_0 corresponde a absorbância do DMA em 421 nm no tempo = 0 e A corresponde a absorbância em diferentes tempos de irradiação.

A partir desses resultados que a imobilização da díade RuPDI-Py nas nanofibras de PAN não alterou sua capacidade em fotossensibilizar o 1O_2 , no entanto para estudos futuros recomenda-se a funcionalização das nanofibras com concentrações da díade maiores que 250 μM para otimizar o desempenho de geração de 1O_2 .

5 – Conclusões

As propriedades fotofísicas e a dinâmica dos estados excitados da díade RuPDI-Py sugeriram que o caráter doador de elétrons da pirrolidina na posição bay e as substituições nas posições imida com fenantrolina do perileno diimida em conjunto com a coordenação ao centro metálico $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}$ influenciaram significativamente a fotofísica de ambos os cromóforos PDI-Py e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. A presença da pirrolidina no ligante PDI-Py induziu ao deslocamento da absorção e da fluorescência para a região do infravermelho-próximo. No entanto, a coordenação do PDI-Py ao cromóforo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foi crucial para permitir sua solubilidade em água e estabelecer um processo de transferência de cargas fotoinduzido entre os cromóforos, gerando o estado excitado intermediário de separação de cargas $\{\text{Ru}^{3+}\text{-PDI-Py}^{\bullet-}\}$, que subsequentemente decaiu para o estado $^3\text{PDI-Py}$ de longa duração e sensibilizou a geração do $^1\text{O}_2$. Geralmente as propriedades fotofísicas dos derivados do PDI geralmente são alteradas em solução aquosa. Apesar disso, nossos resultados demonstraram que mesmo com a formação dos agregados moleculares do tipo-J da díade RuPDI-Py, obtivemos um composto luminescente próximo ao infravermelho, solúvel em água e que exibiu propriedades fotofísicas únicas dependentes do comprimento de onda de excitação.

A díade RuPDI-Py apresentou propriedades multifuncionais para potenciais aplicações em fotomedicina. A modulação das suas propriedades fotofísicas em função do comprimento de onda da luz de excitação permitiu a possibilidade de selecionar o efeito terapêutico desejado, podendo atuar como um fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana e antitumoral através da fotossensibilização do $^1\text{O}_2$ ou como um biomarcador luminescente monitorando a fluorescência da díade na região do infravermelho-próximo. Dessa

forma, a díade RuPDI-Py é um candidato promissor para utilizar a energia da luz absorvida para executar as funções desejadas em aplicações teranósticas.

A combinação das propriedades das nanofibras eletrofiadas e das propriedades fotofísicas da díade RuPDI-Py permitiu o desenvolvimento de um material capaz de fotossensibilizar o $^1\text{O}_2$ utilizando luz visível como fonte de irradiação, com características ideais para aplicações como um adesivo para o tratamento tópico de câncer de pele melanoma em terapia fotodinâmica. A aplicação tópica permite maior eficácia terapêutica e efeitos toxicológicos mínimos em tecidos saudáveis. As vantagens incluem que as nanofibras de Ru(II) podem ser ativadas com luz visível, incluindo luz solar e é um material reutilizável. Esta descoberta será útil para projetos futuros de nanoestruturas para aplicações fotoquímicas.

6 – Referências

1. WÜRTHNER, F. "Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures". *Chemical Communications*, 4, 1564–1579, 2004.
2. HUANG, C., BARLOW, S. & MARDER, S. R. "Perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic Acid Diimides: Synthesis, Physical Properties, and Use in Organic Electronics". *J Org Chem*, 76, 2386–2407, 2011.
3. NOWAK-KRÓL, A. & WÜRTHNER, F. "Progress in the synthesis of perylene bisimide dyes". *Organic Chemistry Frontiers*, 6, 1272–1318, 2019.
4. MACEDO, A. G., CHRISTOPHOLI, L. P., GAVIM, A. E. X., DE DEUS, J. F., TERIDI, M. A. M., YUSOFF, ABD. R. BIN M. & DA SILVA, W. J. "Perylene derivatives for solar cells and energy harvesting: a review of materials, challenges and advances". *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30, 15803–15824, 2019.
5. LI, C. & WONNEBERGER, H. "Perylene Imides for Organic Photovoltaics: Yesterday, Today, and Tomorrow". *Advanced Materials*, 24, 613–636, 2012.
6. KEUM, C., BECKER, D., ARCHER, E., BOCK, H., KITZEROW, H., GATHER, M. C. & MURAWSKI, C. "Organic Light-Emitting Diodes Based on a Columnar Liquid-Crystalline Perylene Emitter". *Adv Opt Mater*, 8, 2000414, 2020.
7. GUPTA, R. K. & SUDHAKAR, A. A. "Perylene-Based Liquid Crystals as Materials for Organic Electronics Applications". *Langmuir*, 35, 2455–2479, 2019.
8. SINGH, P., HIRSCH, A. & KUMAR, S. "Perylene diimide-based chemosensors emerging in recent years: From design to sensing". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116237, 2021.

9. WU, J., PENG, M., MU, M., LI, J. & YIN, M. "Perylene diimide supramolecular aggregates: Constructions and sensing applications". *Supramolecular Materials*, 2, 100031, 2023.
10. ZHOU, W., LIU, G., YANG, B., JI, Q., XIANG, W., HE, H., XU, Z., QI, C., LI, S., YANG, S. & XU, C. "Review on application of perylene diimide (PDI)-based materials in environment: Pollutant detection and degradation". *Science of The Total Environment*, 780, 146483, 2021.
11. LI, Y., ZHANG, X. L. & LIU, D. "Recent developments of perylene diimide (PDI) supramolecular photocatalysts: A review". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 48, 100436, 2021.
12. KRUPKA, O. & HUDHOMME, P. "Recent Advances in Applications of Fluorescent Perylenediimide and Perylenemonoimide Dyes in Bioimaging, Photothermal and Photodynamic Therapy". *Int J Mol Sci*, 24, 6308, 2023.
13. HECK, T., FASTING, C., REST, C., ZHANG, X., WÜRTHNER, F. & HAAG, R. "Highly fluorescent water-soluble polyglycerol-dendronized perylene bisimide dyes". *Chemical Communications*, 46, 1884–1886, 2010.
14. GAO, B., LI, H., LIU, H., ZHANG, L., BAI, Q. & BA, X. "Water-soluble and fluorescent dendritic perylene bisimides for live-cell imaging". *Chemical Communications*, 47, 3894–3896, 2011.
15. LIU, Y., WANG, K. R., CUO, D. S. & JIANG, B. P. "Supramolecular Assembly of Perylene Bisimide with β -Cyclodextrin Grafts as a Solid-State Fluorescence Sensor for Vapor Detection". *Adv Funct Mater*, 19, 2230–2235, 2009.
16. SUN, M., MÜLLEN, K. & YIN, M. "Water-soluble perylenediimides: design concepts and biological applications". *Chem Soc Rev*, 45, 1513–1528, 2016.

17. XU, Z., CHENG, W., GUO, K., YU, J., SHEN, J., TANG, J., YANG, W. & YIN, M. "Molecular Size, Shape, and Electric Charges: Essential for Perylene Bisimide-Based DNA Intercalator to Localize in Cell Nuclei and Inhibit Cancer Cell Growth". *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, 9784–9791, 2015.
18. WÜRTHNER, F., SAHA-MÖLLER, C. R., FIMMEL, B., OGI, S., LEOWANAWAT, P. & SCHMIDT, D. "Perylene Bisimide Dye Assemblies as Archetype Functional Supramolecular Materials". *Chem Rev*, 116, 962–1052, 2016.
19. OZSER, M. E., SARKODIE, S. A., MOHIUDDIN, O. & OZESME, G. "Novel derivatives of regioisomerically pure 1,7-disubstituted perylene diimide dyes bearing phenoxy and pyrrolidinyl substituents: Synthesis, photophysical, thermal, and structural properties". *J Lumin*, 192, 414–423, 2017.
20. LANGHALS, H., KAROLIN, J. & JOHANSSON, L. B. Å. "Spectroscopic properties of new and convenient standards for measuring fluorescence quantum yields". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 94, 2919–2922, 1998.
21. FORD, W. E. & KAMAT, P. V. "Photochemistry of 3, 4, 9, 10-perylenetetracarboxylic dianhydride dyes. 3. Singlet and triplet excited-state properties of the bis (2, 5-di-tert-butylphenyl) imide derivative.". *J. Phys. Chem*, 91, 67–56, 1987.
22. WÜRTHNER, F. "Preparation and Characterization of Regioisomerically Pure 1,7-Disubstituted Perylene Bisimide Dyes". *Journal of Organic Chemistry*, 69, 7933–7939, 2004.
23. BATTAGLIARIN, G., LI, C., ENKELMANN, V. & MÜLLEN, K. "2,5,8,11-tetraboronic ester perylenediimides: A next generation building block for dye-stuff synthesis". *Org Lett*, 13, 3012–3015, 2011.

24. FENG, J., WANG, D., WANG, H., ZHANG, D., ZHANG, L. & LI, X. "Structural and property comparison between the di-piperidinyl- and di-pyrrolidinyl-substituted perylene tetracarboxylic diimides". *J Phys Org Chem*, 24, 621–629, 2011.
25. SHIBANO, Y., UMEYAMA, T., MATANO, Y., TKACHENKO, N. V., LEMMETYINEN, H., ARAKI, Y., ITO, O. & IMAHORI, H. "Large reorganization energy of pyrrolidine-substituted perylenediimide in electron transfer". *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 6133–6142, 2007.
26. ZHAO, Y. & WASIELEWSKI, M. R. "3,4:9,10-Perylenebis(dicarboximide) chromophores that function as both electron donors and acceptors". *Tetrahedron Lett*, 40, 7047–7050, 1999.
27. ZHAO, C., ZHANG, Y., LI, R., LI, X. & JIANG, J. "Di(alkoxy)- and Di(alkylthio)-Substituted Perylene-3,4;9,10-tetracarboxy Diimides with Tunable Electrochemical and Photophysical Properties". *J Org Chem*, 72, 2402–2410, 2007.
28. CAO, H., KURGANSKII, I., PANG, J., DUAN, R., ZHAO, J., FEDIN, M., LI, M.-D. & LI, C. "Charge Transfer, Intersystem Crossing, and Electron Spin Dynamics in a Compact Perylenemonoimide-Phenoxazine Electron Donor–Acceptor Dyad". *J. Phys. Chem. B*, 125, 12859–12875, 2021.
29. TURRO, J., RAMAMURTHY, V. & SCAIANO, J. C. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules. Article in ChemPhysChem* vol. 188 (Sausalito, CA: University Science Books, 201AD).
30. ZHAO, J., WU, W., SUN, J. & GUO, S. "Triplet photosensitizers: from molecular design to applications". *Chem. Soc. Rev*, 42, 5323, 2013.
31. BALZANI, V., CERONI, P. & JURIS, A. *Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications*. (2014).

32. KARUNAKARAN, C. & BALAMURUGAN, M. "Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy". *Spin Resonance Spectroscopy: Principles and applications*, 169–228, 2018 doi:10.1016/B978-0-12-813608-9.00004-6.
33. PENFOLD, T. J., GINDENSPERGER, E., DANIEL, C. & MARIAN, C. M. "Spin-Vibronic Mechanism for Intersystem Crossing". *Chem Rev*, 118, 6975–7025, 2018.
34. ZHAO, X., HOU, Y., LIU, L. & ZHAO, J. "Triplet Photosensitizers Showing Strong Absorption of Visible Light and Long-Lived Triplet Excited States and Application in Photocatalysis: A Mini Review". *Energy and Fuels*, 35, 18942–18956, 2021.
35. HARIHARAN, M., SOC REV, C., SASIKUMAR, D., JOHN, A. T. & SUNNY, J. "Access to the triplet excited states of organic chromophores Access to the triplet excited states of organic chromophores". *Chem. Soc. Rev*, 49, 6122, 2020.
36. CHEN, K., DONG, Y., ZHAO, X., IMRAN, M., TANG, G., ZHAO, J. & LIU, Q. "Bodipy Derivatives as Triplet Photosensitizers and the Related Intersystem Crossing Mechanisms". *Front Chem*, 7, 821, 2019.
37. DECKERS, J., CARDEYNAELS, T., LUTSEN, L., CHAMPAGNE, B. & MAES, W. "Heavy-Atom-Free Bay-Substituted Perylene Diimide Donor-Acceptor Photosensitizers.". *Chemphyschem*, 22, 1488–1496, 2021.
38. LI, C., GAO, Y., HUANG, R., FANG, L., SUN, Y., YANG, Y., GOU, S. & ZHAO, J. "An Effective Supramolecular Approach to Boost the Photodynamic Therapy Efficacy of a Near-Infrared Activating Perylene Diimide-Based Photosensitizer". *ACS Mater Lett*, 4, 657–664, 2022.
39. SPENST, P., YOUNG, R. M., WASIELEWSKI, M. R. & WÜRTHNER, F. "Guest and solvent modulated photo-driven charge separation and triplet generation in a perylene bisimide cyclophane". *Chem Sci*, 7, 5428–5434, 2016.

40. COLVIN, M. T., RICKS, A. B., SCOTT, A. M., CO, D. T. & WASIELEWSKI, M. R. "Intersystem Crossing Involving Strongly Spin Exchange-Coupled Radical Ion Pairs in Donor–bridge–Acceptor Molecules". 2012 doi:10.1021/jp212546w.
41. WASIELEWSKI, M. R., DYAR, S. M., SMEIGH, A. L., KARLEN, S. D. & YOUNG, R. M. "Photo-initiated multi-step electron transfer in donor–acceptor systems using a novel bi-functionalized perylene chromophore". *Chem Phys Lett*, 629, 23–28, 2015.
42. SCHULZE, M., STEFFEN, A. & WÜRTHNER, F. "Near-IR Phosphorescent Ruthenium(II) and Iridium(III) Perylene Bisimide Metal Complexes". *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 1570–1573, 2015.
43. DANILOV, E. O., RACHFORD, A. A., GOEB, S. & CASTELLANO, F. N. "Evolution of the Triplet Excited State in PtII Perylenediimides". *J Phys Chem A*, 113, 5763–5768, 2009.
44. ESCUDERO, D. "Revising Intramolecular Photoinduced Electron Transfer (PET) from First-Principles". *Acc Chem Res*, 49, 1816–1824, 2016.
45. FILATOV, M. A. "Heavy-atom-free BODIPY photosensitizers with intersystem crossing mediated by intramolecular photoinduced electron transfer". *Org Biomol Chem*, 18, 10–27, 2019.
46. HOU, Y., ZHANG, X., CHEN, K., LIU, D., WANG, Z., LIU, Q., ZHAO, J. & BARBON, A. "Charge separation, charge recombination, long-lived charge transfer state formation and intersystem crossing in organic electron donor/acceptor dyads". *J Mater Chem C Mater*, 7, 12048–12074, 2019.
47. GIBBONS, D. J., FARAWAR, A., MAZZELLA, P., LEROY-LHEZ, S. & WILLIAMS, R. M. "Making triplets from photo-generated charges: Observations, mechanisms and theory". *Photochemical and Photobiological Sciences*, 19, 136–158, 2020.

48. IMRAN, M., EL-ZOHRY, A. M., MATT, C., TADDEI, M., DORIA, S., BUSSOTTI, L., FOGGI, P., ZHAO, J., DI DONATO, M., MOHAMMED, O. F. & WEBER, S. "Intersystem crossing *via* charge recombination in a perylene–naphthalimide compact electron donor/acceptor dyad". *J Mater Chem C Mater*, 8, 8305–8319, 2020.
49. LEVANON, H., NORRIS, J. R., LEVANON, H. & NORRIS, J. R. "The Photoexcited Triplet State and Photosynthesis". *Chem Rev*, 78, 185–198, 1978.
50. DANCE, Z. E. X., MI, Q., MCCAMANT, D. W., AHRENS, M. J., RATNER, M. A. & WASIELEWSKI, M. R. "Time-resolved EPR studies of photogenerated radical ion pairs separated by p-phenylene oligomers and of triplet states resulting from charge recombination". *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 25163–25173, 2006.
51. BASSAN, E., GUALANDI, A., COZZI, P. G. & CERONI, P. "Design of BODIPY dyes as triplet photosensitizers: electronic properties tailored for solar energy conversion, photoredox catalysis and photodynamic therapy". *Chem Sci*, 12, 6607–6628, 2021.
52. IMRAN, M., EL-ZOHRY, A. M., MATT, C., TADDEI, M., DORIA, S., BUSSOTTI, L., FOGGI, P., ZHAO, J., DI DONATO, M., MOHAMMED, O. F. & WEBER, S. "Intersystem crossing *via* charge recombination in a perylene–naphthalimide compact electron donor/acceptor dyad". *J Mater Chem C Mater*, 8, 8305–8319, 2020.
53. HU, M., SUKHANOV, A. A., ZHANG, X., ELMALI, A., ZHAO, J., JI, S., KARATAY, A. & VORONKOVA, V. K. "Spiro Rhodamine-Perylene Compact Electron Donor-Acceptor Dyads: Conformation Restriction, Charge Separation, and Spin-Orbit Charge Transfer Intersystem Crossing". *Journal of Physical Chemistry B*, 125, 4187–4203, 2021.

54. ZHAO, Y., DUAN, R., ZHAO, J., LI, C., LI, R., CHEMCOMM, / & COMMUNICATION, C. "Spin-orbit charge transfer intersystem crossing in perylenemonoimide-phenothiazine compact electron donor-acceptor dyads †". *Chem. Commun*, 54, 12329, 2018.
55. LEFLER, K. M., BROWN, K. E., SALAMANT, W. A., DYAR, S. M., KNOWLES, K. E. & WASIELEWSKI, M. R. "Triplet state formation in photoexcited slip-stacked perylene-3,4:9,10- bis(dicarboximide) dimers on a xanthene scaffold". *Journal of Physical Chemistry A*, 117, 10333–10345, 2013.
56. LV, M., YU, Y., SANDOVAL-SALINAS, M. E., XU, J., LEI, Z., CASANOVA, D., YANG, Y. & CHEN, J. "Engineering the Charge-Transfer State to Facilitate Spin–Orbit Charge Transfer Intersystem Crossing in Spirobis[anthracene]diones". *Angewandte Chemie*, 132, 22363–22368, 2020.
57. LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, 2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
58. JIANG, X., PENG, J., WANG, J., GUO, X., ZHAO, D. & MA, Y. "Iridium-Based High-Sensitivity Oxygen Sensors and Photosensitizers with Ultralong Triplet Lifetimes". *ACS Appl Mater Interfaces*, 8, 3591–3600, 2016.
59. YU, S., ZENG, Y., CHEN, J., YU, T., ZHANG, X., YANG, G. & LI, Y. "Intramolecular triplet–triplet energy transfer enhanced triplet–triplet annihilation upconversion with a short-lived triplet state platinum(II) terpyridyl acetylide photosensitizer". *RSC Adv*, 5, 70640–70648, 2015.
60. PRODI, A., CHIORBOLI, C., SCANDOLA, F., IENGO, E., ALESSIO, E., DOBRAWA, R. & WÜRTHNER, F. "Wavelength-Dependent Electron and Energy Transfer Pathways in a Side-to-Face Ruthenium Porphyrin/Perylene Bisimide Assembly". *J Am Chem Soc*, 127, 1454–1462, 2005.

61. ZHANG, X., HOU, Y., XIAO, X., CHEN, X., HU, M., GENG, X., WANG, Z. & ZHAO, J. "Recent development of the transition metal complexes showing strong absorption of visible light and long-lived triplet excited state: From molecular structure design to photophysical properties and applications". *Coord Chem Rev*, 417, 213371, 2020.
62. SUN, Q., MOSQUERA-VAZQUEZ, S., SUFFREN, Y., HANKACHE, J., AMSTUTZ, N., LAWSON DAKU, L. M., VAUTHEY, E. & HAUSER, A. "On the role of ligand-field states for the photophysical properties of ruthenium(II) polypyridyl complexes". *Coord Chem Rev*, 282–283, 87–99, 2015.
63. SHUM, J., LEUNG, P. K. K. & LO, K. K. W. "Luminescent Ruthenium(II) Polypyridine Complexes for a Wide Variety of Biomolecular and Cellular Applications". *Inorg Chem*, 58, 2231–2247, 2019.
64. MONTALTI, M., CREDI, A., PRODI, L., GANDOLFI, M. T., MICHL, J. & BALZANI, V. *Handbook of photochemistry*. (CRC Press).
65. HERGUETA-BRAVO, A., JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, M. E., MONTERO, F., OLIVEROS, E. & ORELLANA, G. "Singlet oxygen-mediated DNA photocleavage with Ru(II) polypyridyl complexes". *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 4010–4017, 2002.
66. POURTOIS, G., BELJONNE, D., MOUCHERON, C., SCHUMM, S., KIRSCH-DE MESMAEKER, A., LAZZARONI, R. & BRÉDAS, J.-L. "Photophysical Properties of Ruthenium(II) Polyazaaromatic Compounds: A Theoretical Insight". *J Am Chem Soc*, 126, 683–692, 2004.
67. SASAKI, Y., YANAI, N. & KIMIZUKA, N. "Osmium Complex-Chromophore Conjugates with Both Singlet-to-Triplet Absorption and Long Triplet Lifetime through Tuning of the Heavy-Atom Effect". *Inorg Chem*, 61, 5982–5990, 2022.

68. DUBEY, R. K., NIEMI, M., KAUNISTO, K., STRANIUS, K., EFIMOV, A., TKACHENKO, N. V. & LEMMETYINEN, H. "Excited-state interaction of red and green perylene diimides with luminescent Ru(II) polypyridine complex". *Inorg Chem*, 52, 9761–9773, 2013.
69. SALOMÉ RODRÍGUEZ-MORGADE, M., TORRES, T., ATIENZA-CASTELLANOS, C. & GULDI, D. M. "Supramolecular bis(rutheniumphthalocyanine)-perylene diimide ensembles: Simple complexation as a powerful tool toward long-lived radical ion pair states". *J Am Chem Soc*, 128, 15145–15154, 2006.
70. NASTASI, F., GANGA, G. LA, CAMPAGNA, S., SYRGIANNIS, Z., RIGODANZA, F., VITALE, S., LICCIARDELLO, A. & PRATO, M. "Multichromophoric hybrid species made of perylene bisimide derivatives and Ru(II) and Os(II) polypyridine subunits †". *Phys. Chem. Chem. Phys*, 19, 14055, 2017.
71. TERESA INDELLI, M., CHIORBOLI, C., SCANDOLA, F., IENGO, E., OSSWALD, P. & WÜRTHNER, F. "Photoinduced processes in self-assembled porphyrin/peryrene bisimide metallosupramolecular boxes". *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 14495–14504, 2010.
72. GUNDERSON, V. L., KRIEG, E., VAGNINI, M. T., IRON, M. A., RYBTCHINSKI, B. & WASIELEWSKI, M. R. "Photoinduced Singlet Charge Transfer in a Ruthenium(II) Perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) Complex". *J Phys Chem B*, 115, 7533–7540, 2011.
73. SANTOS, E. R. D., PINA, J., VENÂNCIO, T., SERPA, C., MARTINHO, J. M. G. & CARLOS, R. M. "Photoinduced Energy and Electron-Transfer Reactions by Polypyridine Ruthenium(II) Complexes Containing a Derivatized Perylene Diimide". *Journal of Physical Chemistry C*, 120, 22831–22843, 2016.
74. DE CAMPOS, I. A. S., DOS SANTOS, E. R., SELLANI, T. A., HERBOZO, C. C. A., RODRIGUES, E. G., ROVEDA, A. C., PAZIN, W. M., ITO, A. S., SANTANA, V. T.,

- NASCIMENTO, O. R. & CARLOS, R. M. "Influence of the Medium on the Photochemical and Photophysical Properties of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ ". *ChemPhotoChem*, 2, 757–764, 2018.
75. GARCÍA-FRESNADILLO, D. "Singlet Oxygen Photosensitizing Materials for Point-of-Use Water Disinfection with Solar Reactors". *ChemPhotoChem*, 2, 512–534, 2018.
76. ZHAO, Y., YU, L., SONG, C., CHEN, Z., MENG, F. & SONG, M. "Selective Degradation of Electron-Rich Organic Pollutants Induced by $\text{CuO}@$ Biochar: The Key Role of Outer-Sphere Interaction and Singlet Oxygen". *Environ Sci Technol*, 56, 10710–10720, 2022.
77. HAO, X., WANG, G., CHEN, S., YU, H. & QUAN, X. "Enhanced activation of peroxymonosulfate by CNT-TiO₂ under UV-light assistance for efficient degradation of organic pollutants". *Front Environ Sci Eng*, 13, 1–11, 2019.
78. GHOGARE, A. A. & GREER, A. "Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs". *Chem Rev*, 116, 9994–10034, 2016.
79. NOSAKA, Y. & NOSAKA, A. Y. "Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis". *Chem Rev*, 117, 11302–11336, 2017.
80. LI, X., LOVELL, J. F., YOON, J. & CHEN, X. "Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer". *Nat Rev Clin Oncol*, 17, 657–674, 2020.
81. LI, B., LIN, L., LIN, H. & WILSON, B. C. "Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy". *J Biophotonics*, 9, 1314–1325, 2016.
82. KLAUSEN, M., UCUNCU, M. & BRADLEY, M. "Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy". *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 5239, 25, 5239, 2020.

83. RAGÀS, X., AGUT, M. & NONELL, S. "Singlet oxygen in Escherichia coli: New insights for antimicrobial photodynamic therapy". *Free Radic Biol Med*, 49, 770–776, 2010.
84. DEROSA, M. "Photosensitized singlet oxygen and its applications". *Coord Chem Rev*, 233–234, 351–371, 2002.
85. MAHARJAN, P. S. & BHATTARAI, H. K. "Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death". *J Oncol*, 2022, 1–20, 2022.
86. 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.
87. OGILBY, P. R. "Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun". *Chem Soc Rev*, 39, 3181–3209, 2010.
88. CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. "Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 1, 279–293, 2004.
89. BLACHA-GRZECHNIK, A., DREWNIAK, A., WALCZAK, K. Z., SZINDLER, M. & LEDWON, P. "Efficient generation of singlet oxygen by perylene diimide photosensitizers covalently bound to conjugate polymers". *J Photochem Photobiol A Chem*, 388, 112161, 2020.
90. YU, Z., WU, Y., PENG, Q., SUN, C., CHEN, J., YAO, J. & FU, H. "Accessing the Triplet State in Heavy-Atom-Free Perylene Diimides". *Chemistry - A European Journal*, 22, 4717–4722, 2016.
91. MARI, C., HUANG, H., RUBBIANI, R., SCHULZE, M., WÜRTHNER, F., CHAO, H. & GASSER, G. "Evaluation of Perylene Bisimide-Based Ru^{II} and Ir^{III}

- Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy". *Eur J Inorg Chem*, 2017, 1745–1752, 2017.
92. AKSAKAL, N. E., KAZAN, H. H., EÇIK, E. T. & YUKSEL, F. "A novel photosensitizer based on a ruthenium(ii) phenanthroline bis(perylene-diimide) dyad: synthesis, generation of singlet oxygen and in vitro photodynamic therapy". *New Journal of Chemistry*, 42, 17538–17545, 2018.
 93. LI, R., DALTON, /, YARNELL, J. E., CHAKRABORTY, A., MYAHKOSTUPOV, M., WRIGHT, K. M. & CASTELLANO, F. N. "Long-lived triplet excited state in a platinum(II) perylene monoimide complex". *Dalton Transactions*, 47, 15071, 2018.
 94. 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.
 95. YOUNG, R., MÜLLER, M., BALASINI, A., THÉTIOT, F., MÜLLER, M., HASCOËT, A., JONAS, U., SCHÖNHERR, H., LEMERCIER, G., MONTIER, T. & LE GALL, T. "Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies". *Pharmaceutics*, 13, 1995, 2021.
 96. LI, X., LOVELL, J. F., YOON, J. & CHEN, X. "Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer". *Nat Rev Clin Oncol*, 17, 657–674, 2020.
 97. LAN, M., ZHAO, S., LIU, W., LEE, C. S., ZHANG, W. & WANG, P. "Photosensitizers for Photodynamic Therapy". *Adv Healthc Mater*, 8, 1900132, 2019.
 98. CORREIA, J. H., RODRIGUES, J. A., PIMENTA, S., DONG, T. & YANG, Z. "Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions". *Pharmaceutics*, 13, 1332, 2021.

99. KARGES, J. "Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer". *Angewandte Chemie International Edition*, 61, e202112236, 2022.
100. CHETTRI, A., YANG, T., COLE, H. D., SHI, G., CAMERON, C. G., MCFARLAND, S. A. & DIETZEK-IVANŠIĆ, B. "Using Biological Photophysics to Map the Excited-State Topology of Molecular Photosensitizers for Photodynamic Therapy". *Angewandte Chemie*, 135, e202301452, 2023.
101. CHAMBERLAIN, S., COLE, H. D., ROQUE, J., BELLNIER, D., MCFARLAND, S. A. & SHAFIRSTEIN, G. "TLD1433-Mediated Photodynamic Therapy with an Optical Surface Applicator in the Treatment of Lung Cancer Cells In Vitro". *Pharmaceuticals*, 13, 1–9, 2020.
102. MONRO, S., COLÓN, K. L., YIN, H., ROQUE, J., KONDA, P., GUJAR, S., THUMMEL, R. P., LILGE, L., CAMERON, C. G. & MCFARLAND, S. A. "Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433". *Chem Rev*, 119, 797–828, 2019.
103. MONRO, S., COLÓN, K. L., YIN, H., ROQUE, J., KONDA, P., GUJAR, S., THUMMEL, R. P., LILGE, L., CAMERON, C. G. & MCFARLAND, S. A. "Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433". *Chem Rev*, 119, 797–828, 2019.
104. LIU, J., ZHANG, C., REES, T. W., KE, L., JI, L. & CHAO, H. "Harnessing ruthenium(II) as photodynamic agents: Encouraging advances in cancer therapy". *Coord Chem Rev*, 363, 17–28, 2018.
105. WU, Y., LI, S., CHEN, Y., HE, W. & GUO, Z. "Recent advances in noble metal complex based photodynamic therapy". *Chem Sci*, 13, 5085–5106, 2022.

106. BAHNEMANN, D. & PATROCINIO, A. O. T. (ED.). *Springer Handbook of Inorganic Photochemistry*. (Springer International Publishing, 2022). doi:10.1007/978-3-030-63713-2.
107. LEE, S. Y., KIM, C. Y. & NAM, T. G. "Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives". *Drug Des Devel Ther*, 14, 5375–5392, 2020.
108. JAIN, A., GARRETT, N. T. & MALONE, Z. P. "Ruthenium-based Photoactive Metalloantibiotics†". *Photochem Photobiol*, 98, 6–16, 2022.
109. LEI, W., ZHOU, Q., JIANG, G., ZHANG, B. & WANG, X. "Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by Ru(II) complexes". *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10, 887–890, 2011.
110. FREI, A., RUBBIANI, R., TUBAFARD, S., BLACQUE, O., ANSTAETT, P., FELGENTRÄGER, A., MAISCH, T., SPICCIA, L. & GASSER, G. "Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of New Ru(II) Polypyridyl Photosensitizers for Photodynamic Therapy". *J Med Chem*, 57, 7280–7292, 2014.
111. LAMCH, Ł., PUCEK, A., KULBACKA, J., CHUDY, M., JASTRZĘBSKA, E., TOKARSKA, K., BUŁKA, M., BRZÓZKA, Z. & WILK, K. A. "Recent progress in the engineering of multifunctional colloidal nanoparticles for enhanced photodynamic therapy and bioimaging". *Adv Colloid Interface Sci*, 261, 62–81, 2018.
112. XU, J., SHI, R., CHEN, G., DONG, S., YANG, P., ZHANG, Z., NIU, N., GAI, S., HE, F., FU, Y. & LIN, J. "All-in-One Theranostic Nanomedicine with Ultrabright Second Near-Infrared Emission for Tumor-Modulated Bioimaging and Chemodynamic/Photodynamic Therapy". *ACS Nano*, 14, 9613–9625, 2020.

113. TAVAKKOLI YARAKI, M., PAN, Y., HU, F., YU, Y., LIU, B. & TAN, Y. N. "Nanosilver-enhanced AIE photosensitizer for simultaneous bioimaging and photodynamic therapy". *Mater Chem Front*, 4, 3074–3085, 2020.
114. LIN, K., ZHAO, Z. Z., BO, H. BEN, HAO, X. J. & WANG, J. Q. "Applications of ruthenium complex in tumor diagnosis and therapy". *Front Pharmacol*, 9, 1323, 2018.
115. PEREIRA, L. M. B., CALI, M. P., MARCHI, R. C., PAZIN, W. M. & CARLOS, R. M. "Luminescent imaging of insulin amyloid aggregation using a sensitive ruthenium-based probe in the red region". *J Inorg Biochem*, 224, 111585, 2021.
116. CALI, M. P., PEREIRA, L. M. B., TEODORO, M. D., SELLANI, T. A., RODRIGUES, E. G. & CARLOS, R. M. "Comparison of A β (1–40, 1–28, 11–22, and 29–40) aggregation processes and inhibition of toxic species generated in early stages of aggregation by a water-soluble ruthenium complex". *J Inorg Biochem*, 215, 111314, 2021.
117. SILVA, D. E. S., CALI, M. P., PAZIN, W. M., CARLOS-LIMA, E., SALLES TREVISAN, M. T., VENÂNCIO, T., ARCISIO-MIRANDA, M., ITO, A. S. & CARLOS, R. M. "Luminescent Ru(II) Phenanthroline Complexes as a Probe for Real-Time Imaging of A β Self-Aggregation and Therapeutic Applications in Alzheimer's Disease". *J Med Chem*, 59, 9215–9227, 2016.
118. ALMEIDA, M. P., KOCK, F. V. C., DE JESUS, H. C. R., CARLOS, R. M. & VENÂNCIO, T. "Probing the acetylcholinesterase inhibitory activity of a novel Ru(II) polypyridyl complex and the supramolecular interaction by (STD)-NMR". *J Inorg Biochem*, 224, 111560, 2021.
119. OLIVEIRA, R. M. M., DE SOUZA DANIEL, J. F. & CARLOS, R. M. "Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of cis-

- [Ru(hesperidin)(1,10'-phenanthroline)₂](PF₆) complex". *J Mol Struct*, 1031, 269–274, 2013.
120. CARDOSO, C. R., LIMA, M. V. S., CHELESKI, J., PETERSON, E. J., VENÂNCIO, T., FARRELL, N. P. & CARLOS, R. M. "Luminescent ruthenium complexes for theranostic applications". *J Med Chem*, 57, 4906–4915, 2014.
121. CARDOSO, C. R., DE AGUIAR, I., CAMILO, M. R., LIMA, M. V. S., ITO, A. S., BAPTISTA, M. S., PAVANI, C., VENÂNCIO, T. & CARLOS, R. M. "Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bi-dentate histamine ligand". *Dalton Transactions*, 41, 6726–6734, 2012.
122. TIBURCIO, M. A., ROCHA, A. R., ROMANO, R. A., INADA, N. M., BAGNATO, V. S., CARLOS, R. M. & BUZZÁ, H. H. "In vitro evaluation of the cis-[Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺ complex for antimicrobial photodynamic therapy against *Sporothrix brasiliensis* and *Candida albicans*". *J Photochem Photobiol B*, 229, 112414, 2022.
123. LUKAS, A. S., ZHAO, Y., MILLER, S. E. & WASIELEWSKI, M. R. "Biomimetic electron transfer using low energy excited states: A green perylene-based analogue of chlorophyll a". *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 1299–1306, 2002.
124. AMATI, A., NATALI, M., INDELLI, M. T., IENGO, E. & WÜRTHNER, F. "Photoinduced Energy- and Electron-Transfer Processes in a Side-to-Face RuII-Porphyrin/Perylene-bisimide Array". *ChemPhysChem*, 20, 2195–2203, 2019.
125. CONNELLY, N. G. & GEIGER, W. E. "Chemical Redox Agents for Organometallic Chemistry". *Chem Rev*, 96, 877–910, 1996.
126. CROCKER, L. B., LEE, J. H., MITAL, S., MILLS, G. C., SCHACK, S., BISTROVIĆ-POPOV, A., FRANCK, C. O., MELA, I., KAMINSKI, C. F., CHRISTIE, G. & FRUK,

- L. "Tuning riboflavin derivatives for photodynamic inactivation of pathogens". *Sci Rep*, 12, 6580, 2022.
127. WEINBERGER, A., TSAI, F. C., KOENDERINK, G. H., SCHMIDT, T. F., ITRI, R., MEIER, W., SCHMATKO, T., SCHRÖDER, A. & MARQUES, C. "Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles". *Biophys J*, 105, 154–164, 2013.
128. MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J Immunol Methods*, 65, 55–63, 1983.
129. TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., DE OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TADA, D. B., SEVERINO, D., DE FÁTIMA TURCHIELLO, R. & BAPTISTA, M. S. "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2, 175–191, 2005.
130. IŞIK BÜYÜKEKŞİ, S., ŞENGÜL, A., ERDÖNMEZ, S., ALTINDAL, A., ORMAN, E. B. & ÖZKAYA, A. R. "Spectroscopic, electrochemical and photovoltaic properties of Pt(II) and Pd(II) complexes of a chelating 1,10-phenanthroline appended perylene diimide". *Dalton Transactions*, 47, 2549–2560, 2018.
131. TERRIER, F. *Modern Nucleophilic Aromatic Substitution. Modern Nucleophilic Aromatic Substitution* (Wiley, 2013). doi:10.1002/9783527656141.
132. DUBEY, R. K., EFIMOV, A. & LEMMETYINEN, H. "1,7-And 1,6-regioisomers of diphenoxy and dipyrrolidinyI substituted perylene diimides: Synthesis, separation, characterization, and comparison of electrochemical and optical properties". *Chemistry of Materials*, 23, 778–788, 2011.
133. PAZDERSKI, L., PAWLAK, T., SITKOWSKI, J., KOZERSKI, L. & EDWARD SZŁYK. "1H NMR assignment corrections and 1H, 13C, 15N NMR coordination shifts structural correlations in Fe(II), Ru(II) and Os(II) cationic complexes

- with 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline". *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48, 450–457, 2010.
134. SOLTZBERG, L. J., SLINKER, J. D., FLORES-TORRES, S., BERNARDS, D. A., MALLIARAS, G. G., ABRUÑA, H. D., KIM, J. S., FRIEND, R. H., KAPLAN, M. D. & GOLDBERG, V. "Identification of a quenching species in ruthenium tris-bipyridine electroluminescent devices". *J Am Chem Soc*, 128, 7761–7764, 2006.
135. TSAI, H.-Y., CHANG, C.-W. & CHEN, K.-Y. "1,6- and 1,7-Regioisomers of Asymmetric and Symmetric Perylene Bisimides: Synthesis, Characterization and Optical Properties". *Molecules*, 19, 327–341, 2013.
136. IŞIK BÜYÜKEKŞİ, S., KARATAY, A., ACAR, N., KÜÇÜKÖZ, B., ELMALI, A. & ŞENGÜL, A. "Syntheses and studies of electron/energy transfer of new dyads based on an unsymmetrical perylene diimide incorporating chelating 1,10-phenanthroline and its corresponding square-planar complexes with dichloroplatinum(II) and dichloropalladium(II)". *Dalton Transactions*, 47, 7422–7430, 2018.
137. ZHAN, Y., PENG, J., YE, K., XUE, P. & LU, R. "Pyrene functionalized triphenylamine-based dyes: synthesis, photophysical properties and applications in OLEDs". *Org Biomol Chem*, 11, 6814, 2013.
138. SUPUR, M., EL-KHOULY, M. E., SEOK, J. H., KIM, J. H., KAY, K.-Y. & FUKUZUMI, S. "Efficient Electron Transfer Processes of the Covalently Linked Perylenediimide–Ferrocene Systems: Femtosecond and Nanosecond Transient Absorption Studies". *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 10969–10977, 2010.
139. DUBEY, R. K., INAN, D., SENGUPTA, S., SUDHÖLTER, E. J. R., GROZEMA, F. C. & JAGER, W. F. "Tunable and highly efficient light-harvesting antenna

- systems based on 1,7-perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic acid derivatives". *Chem Sci*, 7, 3517–3532, 2016.
140. BERERA, R., VAN GRONDELLE, R. & KENNIS, J. T. M. "Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems". *Photosynth Res*, 101, 105, 2009.
 141. RUCKEBUSCH, C., SLIWA, M., PERNOT, P., DE JUAN, A. & TAULER, R. "Comprehensive data analysis of femtosecond transient absorption spectra: A review". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13, 1–27, 2012.
 142. DUBEY, R. K., NIEMI, M., KAUNISTO, K., EFIMOV, A., TKACHENKO, N. V. & LEMMETYINEN, H. "Direct evidence of significantly different chemical behavior and excited-state dynamics of 1,7- and 1,6-regioisomers of pyrrolidinyl-substituted perylene diimide". *Chemistry - A European Journal*, 19, 6791–6806, 2013.
 143. SUPUR, M., EL-KHOULY, M. E., SEOK, J. H., KIM, J. H., KAY, K. Y. & FUKUZUMI, S. "Efficient electron transfer processes of the covalently linked perylenediimide-ferrocene systems: Femtosecond and nanosecond transient absorption studies". *Journal of Physical Chemistry C*, 114, 10969–10977, 2010.
 144. STARK, C. W., SCHREIER, W. J., LUCON, J., EDWARDS, E., DOUGLAS, T. & KOHLER, B. "Interligand electron transfer in heteroleptic ruthenium(II) complexes occurs on multiple time scales". *Journal of Physical Chemistry A*, 119, 4813–4824, 2015.
 145. AHN, M., KIM, M.-J., CHO, D. W. & WEE, K.-R. "Electron Push–Pull Effects on Intramolecular Charge Transfer in Perylene-Based Donor–Acceptor Compounds". *J Org Chem*, 86, 403–413, 2021.

146. DWIVEDI, A. K., PANDEESWAR, M. & GOVINDARAJU, T. "Assembly modulation of PDI derivative as a supramolecular fluorescence switching probe for detection of cationic surfactant and metal ions in aqueous media". *ACS Appl Mater Interfaces*, 6, 21369–21379, 2014.
147. ECHUE, G., LLOYD-JONES, G. C. & FAUL, C. F. J. "Chiral Perylene Diimides: Building Blocks for Ionic Self-Assembly". *Chemistry – A European Journal*, 21, 5118–5128, 2015.
148. HECHT, M. & WÜRTHNER, F. "Supramolecularly Engineered J-Aggregates Based on Perylene Bisimide Dyes". *Acc Chem Res*, 54, 642–653, 2021.
149. ZHAO, J., HUANG, R., GAO, Y., XU, J., SUN, Y., BAO, J., FANG, L. & GOU, S. "Realizing Near-Infrared (NIR)-Triggered Type-I PDT and PTT by Maximizing the Electronic Exchange Energy of Perylene Diimide-Based Photosensitizers". *ACS Mater Lett*, 5, 1752–1759, 2023.
150. OLESON, A., ZHU, T., DUNN, I. S., BIALAS, D., BAI, Y., ZHANG, W., DAI, M., REICHMAN, D. R., TEMPELAAR, R., HUANG, L. & SPANO, F. C. "Perylene Diimide-Based H_j- And h_J-Aggregates- And Prospect of Exciton Band Shape Engineering in Organic Materials". *Journal of Physical Chemistry C*, 123, 20567–20578, 2019.
151. KASHA, M., RAWLS, H. R. & EL-BAYOUMI, M. A. "The Exciton Model In Molecular Spectroscopy". *Pure and Applied Chemistry*, 11, 371–392, 1965.
152. BAYDA, M., DUMOULIN, F., HUG, G. L., KOPUT, J., GORNIK, R. & WOJCIK, A. "Fluorescent H-aggregates of an asymmetrically substituted mono-amino Zn(II) phthalocyanine". *Dalton Transactions*, 46, 1914–1926, 2017.
153. BRIXNER, T., HILDNER, R., KÖHLER, J., LAMBERT, C. & WÜRTHNER, F. "Exciton Transport in Molecular Aggregates - From Natural Antennas to Synthetic Chromophore Systems". *Adv Energy Mater*, 7, 1700236, 2017.

154. SCHOLES, G. D. "Limits of exciton delocalization in molecular aggregates". *Faraday Discuss*, 221, 265–280, 2019.
155. LEFLER, K. M., BROWN, K. E., SALAMANT, W. A., DYAR, S. M., KNOWLES, K. E. & WASIELEWSKI, M. R. "Triplet state formation in photoexcited slip-stacked perylene-3,4:9,10- bis(dicarboximide) dimers on a xanthene scaffold". *Journal of Physical Chemistry A*, 117, 10333–10345, 2013.
156. GÖRL, D., ZHANG, X., STEPANENKO, V. & WÜRTHNER, F. "Supramolecular block copolymers by kinetically controlled co-self-assembly of planar and core-twisted perylene bisimides". *Nat Commun*, 6, 7009, 2015.
157. WÜRTHNER, F., KAISER, T. E. & SAHA-MÖLLER, C. R. "J-Aggregates: From Serendipitous Discovery to Supramolecular Engineering of Functional Dye Materials". *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 3376–3410, 2011.
158. KANO, K., FUKUDA, K., WAKAMI, H., NISHIYABU, R. & PASTERNAK, R. F. "Factors Influencing Self-Aggregation Tendencies of Cationic Porphyrins in Aqueous Solution". *J Am Chem Soc*, 122, 7494–7502, 2000.
159. GEORGES, J. "Deviations from Beer's law due to dimerization equilibria: theoretical comparison of absorbance, fluorescence and thermal lens measurements". *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 51, 985–994, 1995.
160. WALTER, C., KRÄMER, V. & ENGELS, B. "On the applicability of time-dependent density functional theory (TDDFT) and semiempirical methods to the computation of excited-state potential energy surfaces of perylene-based dye-aggregates". *Int J Quantum Chem*, 117, e25337, 2017.
161. FURUBE, A., MURAI, M., TAMAKI, Y., WATANABE, S. & KATOH, R. "Effect of Aggregation on the Excited-State Electronic Structure of Perylene Studied

- by Transient Absorption Spectroscopy". *J Phys Chem A*, 110, 6465–6471, 2006.
162. ČERNÝ, J., KARÁSKOVÁ, M., RAKUŠAN, J. & NEŠPŮREK, S. "Reactive oxygen species produced by irradiation of some phthalocyanine derivatives". *J Photochem Photobiol A Chem*, 210, 82–88, 2010.
163. HONG, X.-L., LI, H. & PENG, C.-H. "Synthesis, DNA-binding, DNA-photocleavage and antioxidant activity of ruthenium(II) complex containing triazine ring ligand: [Ru(dmb)₂(pdta)](ClO₄)₂". *J Mol Struct*, 990, 197–203, 2011.
164. WILKINSON, F., HELMAN, W. P. & ROSS, A. B. "Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution". *J Phys Chem Ref Data*, 22, 113–262, 1993.
165. MARCHI, R. C., CAMPOS, I. A. S., SANTANA, V. T. & CARLOS, R. M. "Chemical implications and considerations on techniques used to assess the in vitro antioxidant activity of coordination compounds". *Coord Chem Rev*, 451, 214275, 2022.
166. PRASAD, A., FERRETTI, U., SEDLÁŘOVÁ, M. & POSPÍŠIL, P. "Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress.". *Sci Rep*, 6, 20094, 2016.
167. BACELLAR, I. O. L. & BAPTISTA, M. S. "Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization". *ACS Omega*, 4, 21636–21646, 2019.
168. PICK, H., ALVES, A. C. & VOGEL, H. "Single-Vesicle Assays Using Liposomes and Cell-Derived Vesicles: From Modeling Complex Membrane Processes to Synthetic Biology and Biomedical Applications". *Chem Rev*, 118, 8598–8654, 2018.

169. MALANOVIC, N., LEBER, R., SCHMUCK, M., KRIECHBAUM, M., CORDFUNKE, R. A., DRIJFHOUT, J. W., DE BREIJ, A., NIBBERING, P. H., KOLB, D. & LOHNER, K. "Phospholipid-driven differences determine the action of the synthetic antimicrobial peptide OP-145 on Gram-positive bacterial and mammalian membrane model systems". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, 2437–2447, 2015.
170. SANKHAGOWIT, S., WU, S.-H., BISWAS, R., RICHE, C. T., POVINELLI, M. L. & MALMSTADT, N. "The dynamics of giant unilamellar vesicle oxidation probed by morphological transitions". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838, 2615–2624, 2014.
171. MERTINS, O., BACELLAR, I. O. L., THALMANN, F., MARQUES, C. M., BAPTISTA, M. S. & ITRI, R. "Physical Damage on Giant Vesicles Membrane as a Result of Methylene Blue Photoirradiation". *Biophys J*, 106, 162–171, 2014.
172. VIGNONI, M., URRUTIA, M. N., JUNQUEIRA, H. C., GREER, A., REIS, A., BAPTISTA, M. S., ITRI, R. & THOMAS, A. H. "Photo-Oxidation of Unilamellar Vesicles by a Lipophilic Pterin: Deciphering Biomembrane Photodamage.". *Langmuir*, 34, 15578–15586, 2018.
173. SCHMIDT, T. F., CASELI, L., OLIVEIRA, O. N. & ITRI, R. "Binding of Methylene Blue onto Langmuir Monolayers Representing Cell Membranes May Explain Its Efficiency as Photosensitizer in Photodynamic Therapy". *Langmuir*, 31, 4205–4212, 2015.
174. WEBER, G., CHARITAT, T., BAPTISTA, M. S., UCHOA, A. F., PAVANI, C., JUNQUEIRA, H. C., GUO, Y., BAULIN, V. A., ITRI, R., MARQUES, C. M. & SCHRODER, A. P. "Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes". *Soft Matter*, 10, 4241, 2014.

175. SANKHAGOWIT, S., WU, S.-H., BISWAS, R., RICHE, C. T., POVINELLI, M. L. & MALMSTADT, N. "The dynamics of giant unilamellar vesicle oxidation probed by morphological transitions". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838, 2615–2624, 2014.
176. ZHANG, Y., ZHOU, Q., TIAN, N., LI, C. & WANG, X. "Ru(II)-Complex-Based DNA Photocleaver Having Intense Absorption in the Phototherapeutic Window". *Inorg Chem*, 56, 1865–1873, 2017.
177. TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., DE OLIVEIRA, C. S., GABRIELLI, D. S., JUNQUEIRA, H. C., TADA, D. B., SEVERINO, D., DE FÁTIMA TURCHIELLO, R. & BAPTISTA, M. S. "Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2, 175–191, 2005.
178. KHORSANDI, K., HOSSEINZADEH, R. & CHAMANI, E. "Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells: an in vitro study". *Cancer Cell Int*, 20, 525, 2020.
179. GRANDE, M. P. DEL, MIYAKE, A. M., NAGAMINE, M. K., LEITE, J. V. P., DA FONSECA, I. I. M., MASSOCO, C. DE O. & DAGLI, M. L. Z. "Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 37, 102635, 2022.
180. TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., PASCHOAL, L. H. C., ITO, A. S. & BAPTISTA, M. S. "Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 1, 345–346, 2004.
181. PAUL, S., SAHOO, S., SAHOO, S., JAYABASKARAN, C. & CHAKRAVARTY, A. R. "Bichromophoric BODIPY and Biotin Tagged Terpyridyl Ruthenium(II)

- Complexes for Cellular Imaging and Photodynamic Therapy". *Eur J Inorg Chem*, 2022, e202200487, 2022.
182. CHEN, Q., RAMU, V., AYDAR, Y., GROENEWOUD, A., ZHOU, X.-Q., JAGER, M. J., COLE, H., CAMERON, C. G., MCFARLAND, S. A., BONNET, S. & SNAAR-JAGALSKA, B. E. "TLD1433 Photosensitizer Inhibits Conjunctival Melanoma Cells in Zebrafish Ectopic and Orthotopic Tumour Models". *Cancers (Basel)*, 12, 587, 2020.
183. TANG, S.-J., WANG, M.-F., YANG, R., LIU, M., LI, Q.-F. & GAO, F. "More-Is-Better Strategy for Constructing Homoligand Polypyridyl Ruthenium Complexes as Photosensitizers for Infrared Two-Photon Photodynamic Therapy". *Inorg Chem*, 62, 8210–8218, 2023.
184. HEINEMANN, F., KARGES, J. & GASSER, G. "Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy". *Acc Chem Res*, 50, 2727–2736, 2017.
185. MCKENZIE, L. K., BRYANT, H. E. & WEINSTEIN, J. A. "Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy". *Coord Chem Rev*, 379, 2–29, 2019.
186. KARGES, J., KUANG, S., MASCHIETTO, F., BLACQUE, O., CIOFINI, I., CHAO, H. & GASSER, G. "Rationally designed ruthenium complexes for 1- and 2-photon photodynamic therapy". *Nat Commun*, 11, 3262, 2020.
187. PRASAD, A., SEDLÁŘOVÁ, M. & POSPÍŠIL, P. "Singlet oxygen imaging using fluorescent probe Singlet Oxygen Sensor Green in photosynthetic organisms". *Sci Rep*, 8, 13685, 2018.
188. GOLLMER, A., ARNBJERG, J., BLAIKIE, F. H., PEDERSEN, B. W., BREITENBACH, T., DAASBJERG, K., GLASIUS, M. & OGILBY, P. R. "Singlet Oxygen Sensor Green®: Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell". *Photochem Photobiol*, 87, 671–679, 2011.

189. STOLL, K. R., SCHOLLE, F., ZHU, J., ZHANG, X. & GHILADI, R. A. "BODIPY-embedded electrospun materials in antimicrobial photodynamic inactivation". *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18, 1923–1932, 2019.
190. CHAGAS, P. A. M., SCHNEIDER, R., DOS SANTOS, D. M., OTUKA, A. J. G., MENDONÇA, C. R. & CORREA, D. S. "Bilayered electrospun membranes composed of poly(lactic-acid)/natural rubber: A strategy against curcumin photodegradation for wound dressing application". *React Funct Polym*, 163, 104889, 2021.
191. COSTA, S. M., FANGUEIRO, R. & FERREIRA, D. P. "Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy: The Potentiality and Versatility of Electrospun Nanofibers". *Macromol Biosci*, 22, 2100512, 2022.
192. LIŠKA, V., KUBÁT, P., KŘTĚNOVÁ, P. & MOSINGER, J. "Magnetically Separable Photoactive Nanofiber Membranes for Photocatalytic and Antibacterial Applications". *ACS Omega*, 7, 47986–47995, 2022.
193. MOSINGER, J., JIRSÁK, O., KUBÁT, P., LANG, K. & MOSINGER, B. "Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen". *J. Mater. Chem.*, 17, 164–166, 2007.
194. CONTRERAS, A., RAXWORTHY, M. J., WOOD, S., SCHIFFMAN, J. D. & TRONCI, G. "Photodynamically Active Electrospun Fibers for Antibiotic-Free Infection Control". *ACS Appl Bio Mater*, 2, 4258–4270, 2019.
195. NIE, X., WU, S., MENSAH, A., LU, K. & WEI, Q. "Carbon quantum dots embedded electrospun nanofibers for efficient antibacterial photodynamic inactivation". *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110377, 2020.
196. NIE, X., WU, S., HUSSAIN, T. & WEI, Q. "PCN-224 Nanoparticle/Polyacrylonitrile Nanofiber Membrane for Light-Driven Bacterial Inactivation". *Nanomaterials*, 11, 3162, 2021.

197. SINDELO, A., MAFUKIDZE, D. M. & NYOKONG, T. "Fabrication of asymmetrical morpholine phthalocyanines conjugated chitosan-polyacrylonitrile nanofibers for improved photodynamic antimicrobial chemotherapy activity". *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 38, 102760, 2022.
198. SUN, L., SONG, L., ZHANG, X., ZHOU, R., YIN, J. & LUAN, S. "Poly(γ -glutamic acid)-based electrospun nanofibrous mats with photodynamic therapy for effectively combating wound infection". *Materials Science and Engineering: C*, 113, 110936, 2020.
199. SEVERYUKHINA, A. N., PETROVA, N. V., SMUDA, K., TERENCEYUK, G. S., KLEBTSOV, B. N., GEORGIEVA, R., BÄUMLER, H. & GORIN, D. A. "Photosensitizer-loaded electrospun chitosan-based scaffolds for photodynamic therapy and tissue engineering". *Colloids Surf B Biointerfaces*, 144, 57–64, 2016.
200. FU, Y., LI, X., REN, Z., MAO, C. & HAN, G. "Multifunctional Electrospun Nanofibers for Enhancing Localized Cancer Treatment". *Small*, 14, 1801183, 2018.
201. SCHNEIDER, R., FACURE, M. H. M., CHAGAS, P. A. M., ANDRE, R. S., DOS SANTOS, D. M. & CORREA, D. S. "Tailoring the Surface Properties of Micro/Nanofibers Using 0D, 1D, 2D, and 3D Nanostructures: A Review on Post-Modification Methods". *Adv Mater Interfaces*, 8, 2100430, 2021.
202. MALISZEWSKA, I. & CZAPKA, T. "Electrospun Polymer Nanofibers with Antimicrobial Activity". *Polymers (Basel)*, 14, 1661, 2022.
203. SILVA, C., PAULA, D. & BORGES, K. "Eletrofiação aplicada ao desenvolvimento de nanofibras adsorventes visando o aprimoramento de técnicas de (micro)extração em fase sólida". *Quim Nova*, 44, 1137–1150, 2021.

204. MERCANTE, L. A., SCAGION, V. P., MIGLIORINI, F. L., MATTOSO, L. H. C. & CORREA, D. S. "Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 91–103, 2017.
205. DONG, X., MITCHELL, D. G., GARCIA CERVANTES, M. Y., CHITARA, B., YANG, L. & YAN, F. "Rose bengal-integrated electrospun polyacrylonitrile nanofibers for photodynamic inactivation of bacteria". *Environmental Science: Advances*, 1, 736–745, 2022.
206. WANG, Y., LI, S., WANG, L., QU, S. & LIU, K. "Geometric relaxation in a copper complex and its limitation by polymer immobilization: Structure, characterization and photophysical analysis". *J Lumin*, 192, 269–276, 2017.
207. LI, J. & LIU, L. "On the synthesis and characterization of Ru(II)-doped polymer fibers: Polymer immobilization effect on Ru(II) emitter photophysical performance and singlet oxygen generation". *J Lumin*, 238, 118224, 2021.