

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

SARAH SANTANA FAUSTINO SILVA

**AGREGAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX E SUA ANISOTROPIA
DIAMAGNÉTICA: IMPLICAÇÕES PARA TERAPIA
FOTODINÂMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, fevereiro/2026

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

SARAH SANTANA FAUSTINO SILVA

**AGREGAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX E SUA ANISOTROPIA
DIAMAGNÉTICA: IMPLICAÇÕES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

São José dos Campos, fevereiro/2026

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

SARAH SANTANA FAUSTINO SILVA

**AGREGAÇÃO DA PROTOPORFIRINA IX E SUA ANISOTROPIA
DIAMAGNÉTICA: IMPLICAÇÕES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Milton Beltrame Junior (externo)

Universidade do Vale do Paraíba

Prof. Dr. Landulfo Silveira Junior (interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Renato Amaro Zangaro (coordenação)

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Egberto Munin (Suplente interno)

Universidade Anhembi Morumbi

Dra. Giovana Cássia de Freitas Lemeszenski (Suplente externo)

Universidade de São Paulo

São José dos Campos, fevereiro/2026

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

SARAH SANTANA FAUSTINO SILVA

Bacharel em Química pela Universidade do Vale do Paraíba.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca AMO
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578a	Silva, Sarah Santana Faustino Agregação de Porfirinas: Análise do estado agregado da Protoporfirina IX por Anisotropia Diamagnética utilizando Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear / Sarah Santana Faustino Silva- 2025 92; 30 cm. Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campo - 2025. Bibliografia: f. 52 - 56. 1. Engenharia Biomédica 2. Protoporfirina IX dimetil éster 3. Ressonância magnética nuclear 4. Agregação I. Silva, Sarah Santana Faustino II. Título CDD 610.28
-------	---

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor doutor Adjaci Uchôa Fernandes por todo o conhecimento compartilhado e auxílio durante o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada por me ajudar a crescer.

A minha mãe, Cleide de Andrade Santana da Silva, pelo imenso amor e por todo o sacrifício que fez para que eu chegasse até aqui. A você, toda a minha admiração.

Aos meus amigos Ana Carolina, Luana, Lucas, Melissa, Stepherson e Yasmin que me apoiam, são meu suporte emocional e torcem pelo meu sucesso. A amizade de vocês é meu abrigo.

À Bianca, Carol, Christmas, Jéssica, Pedro Augusto, Pedro Luiz e Raíssa com quem compartilhei os desafios e as conquistas do cotidiano acadêmico. A convivência com vocês foi marcada por empatia, companheirismo e gentileza — e isso fez toda a diferença.

Aos colegas do programa de pós-graduação, estagiários e alunos de iniciação científica que tive o privilégio de conhecer. A dedicação de vocês pela pesquisa é encantadora.

À empresa Resix Invent, pelo apoio à minha pesquisa, ao disponibilizar o laboratório para a realização dos experimentos. Eu sou profundamente grata por essa parceria.

À doutora Giovana Cássia de Freitas Lemeszenski da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo suporte técnico e pela disponibilização das análises que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

À direção e aos docentes do curso de pós-graduação da Universidade Anhembi Morumbi, pelo suporte institucional e pela dedicação no exercício da docência ao longo de todo o período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A engenharia biomédica integra princípios da engenharia, física, química e ciências biológicas para o desenvolvimento e a otimização de sistemas com aplicação em saúde, incluindo moléculas fotoativas utilizadas em terapia fotodinâmica. Nesse contexto, os macrociclos tetrapirrólicos constituem uma classe de compostos amplamente distribuídos na natureza, cujas propriedades eletrônicas, fotoquímicas e fotofísicas os tornam relevantes para processos biológicos e aplicações tecnológicas, como a terapia fotodinâmica e sistemas de conversão de energia. Dentre essas estruturas, a protoporfirina IX dimetil éster (PpIX DME) destaca-se como modelo para o estudo de interações supramoleculares, em especial o fenômeno de agregação, o qual interfere diretamente em suas propriedades espectroscópicas por meio de efeitos de anisotropia diamagnética. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar as influências da agregação na anisotropia diamagnética da PpIX DME por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), visando compreender como o empilhamento molecular afeta os deslocamentos químicos, multiplicidades e interações espaciais. Foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais (RNM ^1H , RMN ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC) em concentrações crescentes (2,82 a 33,8 mmol.L $^{-1}$), com o objetivo de avaliar o efeito da concentração sobre o processo de agregação, identificar os substituintes mais envolvidos nas interações intermoleculares e compreender o arranjo geométrico adotado no estado agregado. A comparação com a literatura evidenciou inconsistências nas atribuições espectroscópicas previamente relatadas. Os dados obtidos em alta frequência (800 MHz) permitiram estabelecer atribuições mais robustas, sustentadas por correlações bidimensionais. Observou-se que o aumento da concentração promove deslocamentos químicos mais pronunciados nos espectros de RMN ^1H do que nos de RMN ^{13}C . Os prótons situados no interior do anel e das posições *meso* H-5 e H-20 mostraram-se particularmente relevantes na estabilização do estado agregado, sustentando que a PpIX DME adota predominantemente geometrias do tipo J e T. Contudo, ao longo da série de espectro, foi observado a repulsão entre os prótons das cadeias metoxílicas e o deslocamento para campo baixo dos carbonos-13 *meso* C-10 e C-15, indicando menor influência do campo magnético da molécula vizinha e maior distanciamento nesses pontos de contato. Esse comportamento confirma que no estado agregado existe um ângulo de inclinação entre as moléculas, reforçando a complexidade das interações supramoleculares envolvidas. O estudo fornece uma caracterização espectroscópica de alta resolução da PpIX DME, contribuindo para a compreensão do processo de agregação em porfirinas e oferecendo base de caracterização para o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores e materiais funcionais.

Palavras-chave: Engenharia biomédica; protoporfirina IX dimetil éster; ressonância magnética nuclear; agregação.

ABSTRACT

Biomedical engineering integrates principles from engineering, physics, chemistry, and life sciences to develop and optimize systems with applications in healthcare, including photoactive molecules used in photodynamic therapy. In this context, tetrapyrrolic macrocycles constitute a class of compounds widely distributed in nature, whose electronic, photochemical, and photophysical properties make them relevant to biological processes and technological applications, such as photodynamic therapy and energy conversion systems. Among these structures, protoporphyrin IX dimethyl ester (PpIX DME) is frequently employed as a model for the investigation of supramolecular interactions, particularly the aggregation phenomenon, which directly affects its spectroscopic properties through diamagnetic anisotropy effects. In this context, the present study aimed to investigate the influence of aggregation on the diamagnetic anisotropy of PpIX DME using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, in order to figure out how molecular stacking affects chemical shifts, multiplicities, and spatial interactions. One- and two-dimensional NMR experiments (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY and ^1H - ^{13}C HSQC) were performed at increasing concentrations (2.82 to 33.8 mmol L $^{-1}$) to evaluate the effect of concentration on the aggregation process, identify the substituents most involved in intermolecular interactions, and comprehend the geometric arrangement adopted in the aggregated state. Comparison with previously reported data revealed inconsistencies in the spectroscopic assignments available in the literature. High-field measurements (800 MHz) allowed the establishment of more reliable assignments, supported by bidimensional correlations. The increase in concentration resulted in more pronounced chemical shift variations in the ^1H NMR spectra compared to the ^{13}C NMR spectra, indicating a higher sensitivity of proton nuclei to supramolecular interactions. Protons located within the macrocyclic core and at the *meso* positions H-5 and H-20 were found to play a significant role in stabilizing the aggregated state, supporting the predominance of J- and T-type geometries. However, throughout the spectrum series, repulsion between the protons of the methoxy chains and the low-field shift of the *meso* carbon-13 C-10 and C-15 atoms were observed, indicating less influence from the magnetic field of the neighboring molecule and greater distance at these contact points. These findings indicate that the aggregated state exhibits an angular inclination between molecules, highlighting the complexity of the supramolecular interactions involved. This study provides a high-resolution spectroscopic characterization of PpIX DME, contributing to the understanding of aggregation processes in porphyrins and offering relevant insights for the development of new photosensitizers and functional materials.

Keywords: Biomedical engineering; protoporphyrin IX dimethyl ester; nuclear magnetic resonance; aggregation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo geral	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1. MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS	5
2.2. PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E FOTOFÍSICAS	6
2.3. TERAPIA FOTODINÂMICA	9
2.4. AGREGAÇÃO	10
2.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	12
2.5.1. Perturbação espectral induzida	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. MATERIAIS	16
3.2. MÉTODOS	16
3.2.1. Esterificação	16
3.3. MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE	17
3.3.1. Aquisição dos espectros	17
3.3.2. Preparo das amostras	17
3.3.3. Processamento de dados	18
4. RESULTADOS	20
4.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO	20
4.2. ATRIBUIÇÕES ESPECTROSCÓPICAS DA PpIX DME 1	21
4.3. ATRIBUIÇÕES ESPECTROSCÓPICAS DA PpIX DME 12	29
4.4. AGREGAÇÃO DA PpIX DME EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO	36
5. DISCUSSÃO	43
5.1. ANÁLISE COMPARATIVA DA PpIX DME 1 COM OS DADOS DA LITERATURA	43
5.2. ANÁLISE COMPARATIVA DA PpIX DME 12 COM OS DADOS DA LITERATURA	46

5.3. ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DA PpIX DME EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO	49
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. APÊNDICES	58
APÊNDICE A – RMN ^1H da PpIX DME 1	58
APÊNDICE B – ^1H - ^1H COSY da PpIX DME 1	59
APÊNDICE C – ^1H - ^{13}C HSQC da PpIX DME 1	60
APÊNDICE D – RMN ^{13}C da PpIX DME 1	61
APÊNDICE E – ^1H - ^1H NOESY da PpIX DME 1	62
APÊNDICE F – RMN ^1H da PpIX DME 2	63
APÊNDICE G – RMN ^1H da PpIX DME 3	64
APÊNDICE H – RMN ^1H da PpIX DME 4	65
APÊNDICE I – RMN ^1H da PpIX DME 5	66
APÊNDICE J – RMN ^1H da PpIX DME 6	67
APÊNDICE K – RMN ^1H da PpIX DME 7	68
APÊNDICE L – RMN ^1H da PpIX DME 8	69
APÊNDICE M – RMN ^1H da PpIX DME 9	70
APÊNDICE N – RMN ^1H da PpIX DME 10	71
APÊNDICE O – RMN ^1H da PpIX DME 11	72
APÊNDICE P – RMN ^1H da PpIX DME 12	73
APÊNDICE Q – ^1H - ^1H COSY da PpIX DME 12	74
APÊNDICE R – ^1H - ^{13}C HSQC da PpIX DME 12	75
APÊNDICE S – RMN ^{13}C da PpIX DME 12	76
APÊNDICE T – ^1H - ^1H NOESY da PpIX DME 12	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura geral para macrociclo tetrapirrólicos.	5
Figura 2 – Principais macrociclos tetrapirrólicos.....	6
Figura 3 – Diagrama de Jablonksi.	7
Figura 4 – Atribuição das regiões de atração e repulsão segundo o modelo de distribuição de cargas.	11
Figura 5 – Porfirinas investigadas por RMN ^1H	13
Figura 6 – Porfirina investigada por RMN ^1H e ^{13}C	14
Figura 7 – Rota sintética do éster dimetílico da PpIX.	17
Figura 8 – Preparo das amostras do de PpIX DME de forma acumulativa.	18
Figura 9 – Mecanismo reacional da esterificação da PpIX DME.	20
Figura 10 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1.	22
Figura 11 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos meso, metilênicos, metílicos e metoxílicos.	23
Figura 12 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos vinílicos H-3 1 e H-8 1	24
Figura 13 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos vinílicos e meso.	24
Figura 14 – ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos ^1H vinílicos.	25
Figura 15 – ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos metilênicos.	26
Figura 16 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos metilênicos e metílicos.	26
Figura 17 – Principais efeitos NOE.....	27
Figura 18 – RMN ^{13}C (CDCl_3 , com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) da PpIX DME 1.	28
Figura 19 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12.	30
Figura 20 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos meso, metilênicos, metílicos e metoxílicos.	30

Figura 21 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos H-3 1 e H-8 1	31
Figura 22 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos e meso.	31
Figura 23 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos H-3 $^{2\beta}$ /H-8 $^{2\beta}$ e H-3 $^{2\alpha}$ /H-8 $^{2\alpha}$	32
Figura 24 – ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos ^1H vinílicos.	33
Figura 25 – ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos metilênicos.	33
Figura 26 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos metilênicos e metílicos.	34
Figura 27 – RMN ^{13}C (CDCl_3 , com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) da PpIX DME 12.	35
Figura 28 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) das amostras de PpIX DME.....	36
Figura 29 – Alterações dos deslocamentos químicos de ^1H do PpIX DME em relação aos meso em CDCl_3 a 25 °C em função da concentração.	38
Figura 30 – Alterações dos deslocamentos químicos de ^1H do PpIX DME em relação aos metílicos em CDCl_3 a 25 °C em função da concentração.....	39
Figura 31 – RMN ^{13}C (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) das amostras de PpIX DME.....	40
Figura 32 – Alterações dos deslocamentos químicos de ^{13}C do PpIX DME em relação aos meso em CDCl_3 a 25 °C em função da concentração.	41

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H (ppm) da PpIX DME em diferentes concentrações, em CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ 37

Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (ppm) da PpIX DME em diferentes concentrações, em CDCl_3 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H - ^1H COSY – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional de correlação homonuclear de prótons

^1H - ^1H NOESY – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional de efeito nuclear *overhauser*

^1H - ^{13}C HSQC – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear bidimensional de correlação heteronuclear de coerência

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$ – Oxigênio tripleto

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

δ – Deslocamento químico

$\Delta\delta$ – Variações de deslocamento químico

$\bullet\text{OH}$ – Radical hidroxila

J – Constante de acoplamento

$\text{O}_2^{\bullet-}$ – Ânion superóxido

P. A. – Grau analítico

PDT – Terapia fotodinâmica

PpIX – Protoporfirina IX

PpIX DME – Protoporfirina IX dimetil éster

PS – Fotossensibilizador

RMN – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RMN ^1H – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de prótons

RMN ^{13}C – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de carbono-13

S_0 – Estado singlete fundamental

S_1 – Primeiro estado singlete excitado

S_n – Estados singletes excitados

T_1 – Primeiro estado tripleto excitado

TMS – Tetrametilsilano

1. INTRODUÇÃO

A engenharia biomédica caracteriza-se como área interdisciplinar que integra princípios da engenharia, física, química e ciências biológicas com o objetivo de desenvolver e otimizar tecnologias aplicadas à saúde, incluindo desde dispositivos médicos até moléculas com potencial terapêutico. Nesse contexto, a investigação de propriedades estruturais e supramoleculares de moléculas fotoativas torna-se viável, uma vez que tais características influenciam diretamente sua eficiência em aplicações clínicas, como a terapia fotodinâmica (PDT).

As porfirinas constituem uma classe de macrociclos tetrapirrólicos amplamente distribuídos na natureza, caracterizados por 4 unidades N-heterocíclicas do tipo pirrol interligadas por pontes de metina, formando um anel planar π -conjugado (Udrea *et al.*, 2023; Hiroto; Miyake; Shinokubo, 2017). Caracteristicamente, são estruturas aromáticas que apresentam deslocalização de 18 elétrons π ressonantes e 4 elétrons π conjugados (Boscenu *et al.*, 2023). Essa extensa densidade eletrônica confere propriedades únicas, permitindo a participação em processos biológicos como o transporte de oxigênio via hemoglobina, a fotossíntese em plantas e cianobactérias (Cerqueira *et al.*, 2017).

A capacidade desses macrociclos de participar em processos fotoquímicos e fotofísicos é amplamente explorada nos processos de transferência de elétrons em sistemas biológicos (Kiening; Lange, 2022), conversores de energia (Hasobe, 2013) e aplicações nas ciências da saúde, em especial na PDT (Shi *et al.*, 2019). A protoporfirina IX (PpIX), precursor do grupo heme, têm sido amplamente estudada como fotossensibilizador (PS) nessa terapia devido à sua biocompatibilidade (Zou *et al.*, 2025). Na presença de luz visível, essa molécula sofre excitação eletrônica sendo conduzida ao estado tripleto, que pode transferir elétrons ou energia ao oxigênio presente no meio biológico, gerando radicais oxigenados (Myrzakhmetov *et al.*, 2021). Essas espécies causam danos teciduais e induzem morte celular, conferindo à PDT relevância clínica, sobretudo ao possibilitar a erradicação de neoplasias (Collier *et al.*, 2018; Bartusik-Aebisher *et al.*, 2022; Shafirstein *et al.*, 2016; Que; Zwald; Schmults, 2018).

As estruturas tetrapirrólicas apresentam um comportamento característico de agregação (Estevão *et al.*, 2020). Esse processo decorre da elevada densidade

eletrônica π do macrociclo, que favorece interações entre os anéis aromáticos, energeticamente mais estáveis que as interações com o meio, como por exemplo a corrente sanguínea (Estevão *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2021). Em geral, a agregação do PS compromete a atividade fotodinâmica, pois promove supressão do primeiro estado singlete excitado e reduz a eficiência de formação do primeiro estado tripleto excitado, responsável pela transferência de energia ao oxigênio molecular e pela consequente geração de oxigênio singlete (Kwon *et al.*, 2021).

A compreensão desse fenômeno foi proposta por Hunter; Sanders (1990), que demonstraram que a formação de agregados resulta do equilíbrio entre interações atrativas σ - π e repulsivas π - π entre elétrons de moléculas vizinhas. Nesse modelo, empilhamentos do tipo J (deslocado) ou T (aresta-face) são energeticamente mais favorecidos, pois minimizam a sobreposição direta das densidades eletrônicas π . Em contraste, o empilhamento tipo H (face a face) implica maior superposição das nuvens π e, conseqüentemente, maior repulsão eletrônica entre os macrociclos.

A presença de substituintes periféricos em posições β -pirrólicas ou *meso*, bem como a coordenação de metais, influencia diretamente a geometria de agregação (Magna *et al.*, 2019). Estudos experimentais indicam que as porfirinas formam agregados do tipo J e T, com desvio lateral entre 3 e 4 Å e separação de planos variando entre 3,4 e 3,6 Å (Hunter; Sanders, 1990). Além disso, características físico-químicas como polaridade, temperatura, pH e concentração também modulam o processo de agregação (Estevão *et al.*, 2020; Magna *et al.*, 2019).

Ao longo da história da PDT, diferentes estratégias foram propostas para reduzir ou eliminar esse fenômeno: isolamento de derivados porfirínicos de fontes naturais (plantas, algas e bactérias), síntese e derivatização de macrociclos estericamente impedidos (Uchoa *et al.*, 2011) e o nanoencapsulamento dessas estruturas (Rossi *et al.*, 2008). Apesar dos avanços, a agregação permanece como barreira significativa, impactando o desempenho terapêutico e dificultando a caracterização por técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

As porfirinas e seus análogos, por serem aromáticos estão susceptíveis a anisotropia diamagnética. Esse fenômeno, descrito por Pauling, decorre da deslocalização dos elétrons π , que gera um campo magnético, que pode ter direção

oposta ao campo aplicado (contribuição diamagnética) ou a mesma direção (contribuição paramagnética) (Jirásek; Anderson; Peeks, 2021).

Como consequência, nos espectros de RMN ^1H , por exemplo, o sinal dos hidrogênios internos sofre deslocamento para campo alto, próximo a -2 a -5 ppm, enquanto os sinais dos hidrogênios *meso* e β -pirrólicos sofrem deslocamento para campo baixo, entre 8 e 12 ppm (Scheer; Katz, 1975).

A agregação interfere diretamente nesse padrão espectroscópico, provocando alargamento, deslocamento dos sinais e a permutação dos hidrogênios em decorrência das interações intermoleculares que alteram o ambiente químico nuclear. Pesquisadores como Abraham *et al.* (1979), e Janson; Katz (1972) buscaram compreender esse fenômeno por meio da modulação de fatores como concentração e temperatura.

Contudo, dadas as limitações instrumentais da época, é possível que algumas dessas estruturas tenham sido indevidamente caracterizadas. Com o avanço das técnicas de RMN, incluindo espectros bidimensionais, gradientes de campo pulsado e magnetos criogenicamente resfriados (Gjuroski; Furrer; Vermathen, 2021), torna-se possível reavaliar tais sistemas com maior resolução e sensibilidade, permitindo uma descrição mais detalhada da natureza supramolecular dos agregados. Assim, possibilitar uma compreensão do fenômeno de agregação que é de importância para as diversas áreas de aplicabilidade dos macrociclos, como a PDT.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Estudar as influências da agregação na anisotropia diamagnética do tetrapirrólico protoporfirina IX dimetil éster por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar de forma inequívoca a protoporfirina IX dimetil éster por diferentes técnicas da espectroscopia de ressonância magnética nuclear;

- Estudar o fenômeno de agregação em função da concentração pela técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- Compreender qual substituinte na porfirina tem maior contribuição para o fenômeno de agregação;
- Explicar a geometria adotada no estado agregado.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS

Os macrociclos tetrapirrólicos são amplamente encontrados na natureza e desempenham papéis de grande relevância nos processos que sustentam os sistemas vivos. Caracterizam-se por uma estrutura formada por 4 unidades N-heterocíclicas do tipo pirrol interligadas por pontes de metina, formando um anel planar π -conjugado (Udrea *et al.*, 2023; Hiroto; Miyake; Shinokubo, 2017). Essa organização confere ao sistema uma extensa deslocalização eletrônica, com 22 elétrons π presentes, dos quais 18 elétrons π são ressonantes e 4 elétrons π conjugados, resultando em um sistema aromático altamente estável (Boscencu *et al.*, 2023).

Nesse esqueleto estrutural, distinguem-se diferentes posições ao longo do macrociclo, incluindo os átomos de nitrogênio do núcleo, as posições α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19), β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18) e *meso* (5, 10, 15, 20) distribuídas nos anéis pirrólicos A, B, C e D (Senge; Sergeeva; Hale, 2021). Modificações estruturais nessas posições originam uma ampla variedade de derivados, denominados genericamente de porfirinoides ou porfirínicos, e, na presença de um íon metálico, metaloporfirinas. A **Figura 1** representa um esquema geral para os macrociclos tetrapirrólicos, em que a letra M indica a presença do íon metálico.

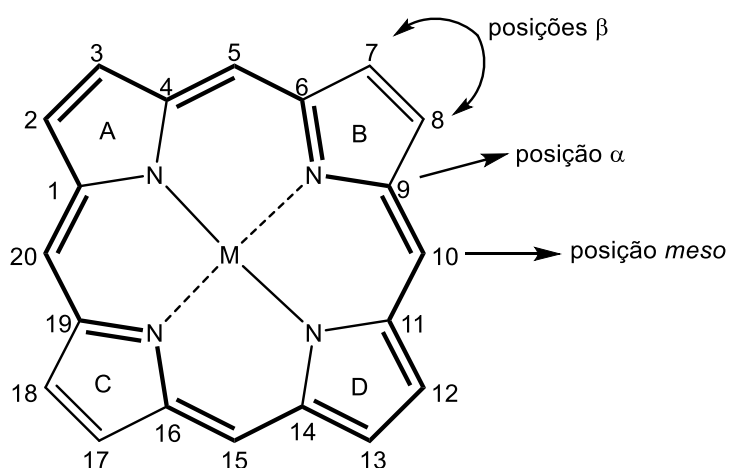


Figura 1 – Estrutura geral para macrociclo tetrapirrólicos.
Fonte: Adaptado de Senge; Sergeeva; Hale (2021).

Entre os exemplos mais relevantes dessa classe de macrociclos encontram-se as porfirinas, como a protoporfirina IX, que, ao ser coordenada com o íon Fe^{2+} , forma o grupo heme, componente essencial no transporte de oxigênio e na transferência eletrônica em células eucarióticas (Kiening; Lange, 2022). A hidrogenação em uma ligação dupla em uma das unidades pirrólicas do macrociclo porfirínico resulta na formação das clorinas, núcleo constituintes das clorofilas, contendo um íon de Mg^{2+} central, componentes fotossintéticos de plantas, algas e cianobactérias (Pareek *et al.*, 2017). A hidrogenação de duas ligações duplas em duas unidades pirrólicas do macrociclo porfirínico origina as bacterioclorinas, estruturas que também apresentam um íon de magnésio central e são encontradas em bactérias fotossintéticas (Montforts; Gerlach; Hoeper, 1994). O núcleo dessas estruturas está ilustrado na **Figura 2**.

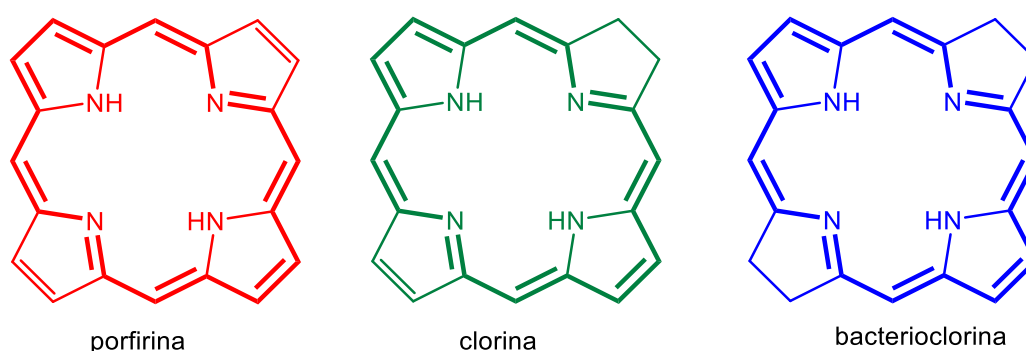


Figura 2 – Principais macrociclos tetrapirrólicos.

Além de sua importância biológica, os macrociclos tetrapirrólicos são de grande interesse científico devido à sua versatilidade sintética e funcional. A possibilidade de modificações nas posições α , β e *meso* permite ajustar propriedades eletrônicas, solubilidade e comportamento supramolecular (Cerqueira *et al.*, 2017). Essa flexibilidade está relacionada à capacidade desses sistemas de participar em processos fotoquímicos e fotofísicos, em decorrência da extensa conjugação π .

2.2. PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E FOTOFÍSICAS

Os porfirinoides apresentam intensa absorção na região do visível (380-780 nm), emissão de fluorescência característica e capacidade de participar em processos

de transferência de energia e elétrons (Laba *et al.*, 2020). Essas características podem ser racionalizadas pelo diagrama de Jablonski, elucidado na **Figura 3** (Frackowiak, 1988; Jablonski, 1933).

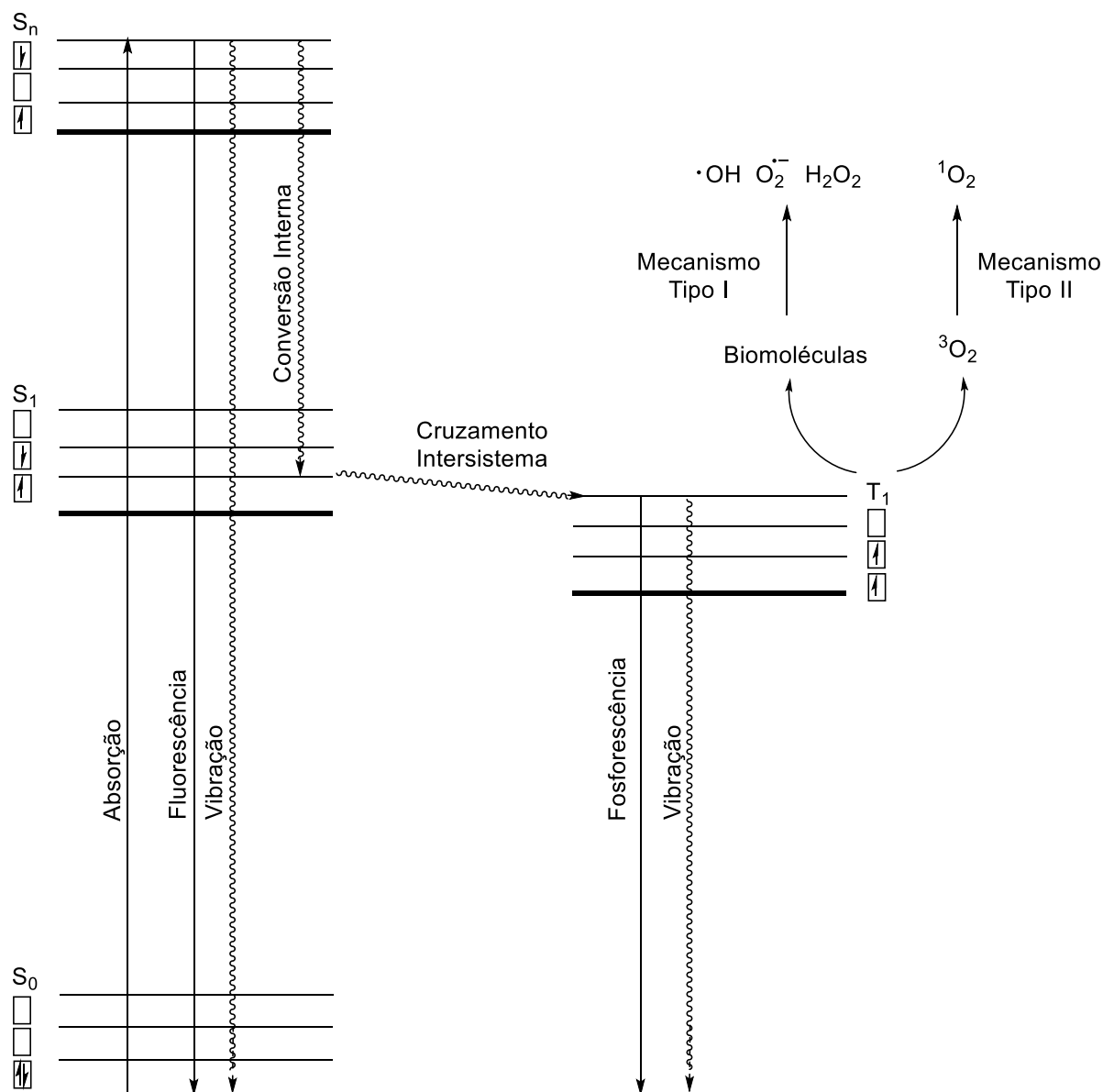


Figura 3 – Diagrama de Jablonski.
Fonte: Adaptado de Frackowiak (1988).

A excitação promove um elétron do estado singlete fundamental (S_0) para um estado singlete de maior energia (S_n), seguido de um rápido decaimento energético na ordem de nanossegundos a picossegundos (Chilakamarthi; Giribabu, 2017). O elétron pode assumir três rotas principais de decaimento: (i) retornar ao S_0 de forma não radiativa por vibração, (ii) retornar ao S_0 de forma radiativa, por emissão de um fóton na forma de fluorescência, ou (iii) o elétron pode passar até o nível mais baixo

do primeiro estado singlete excitado (S_1) por meio de conversão interna, ter seu spin invertido e decair energeticamente para o primeiro estado triplete excitado (T_1) pelo cruzamento intersistema (Verger *et al.*, 2021).

O estado T_1 apresenta tempo de vida significativamente maior que o estado S_1 porque a transição direta $T_1 \rightarrow S_0$ é spin-proibida, o que torna o processo de decaimento lento (Ribeiro *et al.*, 2007). Como consequência, a probabilidade de emissão radiativa é significativamente menor, resultando em tempos de vida mais longos para o estado T_1 , tipicamente na faixa de microssegundos a milissegundos (Chilakamarthi; Giribabu, 2017).

A partir de T_1 podem originar-se: (i) emissão radiativa prolongada, chamada de fosforescência, (ii) desativação não radiativa, ou (iii) reações fotoquímicas, nas quais o T_1 pode reagir com biomoléculas por transferência de elétrons (reação do tipo I) e/ou reagir diretamente com oxigênio triplete (3O_2) por transferência de energia (reação do tipo II) (Chen *et al.*, 2020; Baroncini; Bergamini; Ceroni, 2017).

No mecanismo do tipo I, a reação direta do elétron e/ou H^+ às biomoléculas no organismo, como lipídeos e proteínas, produz o radical hidroxila ($\bullet OH$), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto no mecanismo tipo II, a transferência de energia ao 3O_2 resulta em uma espécie mais reativa, o oxigênio no estado singlete excitado (1O_2) (Matlou; Abrahamse, 2021; Lima; Reis, 2023).

As espécies reativas formadas pelo mecanismo tipo I, como o $O_2^{\bullet -}$, o H_2O_2 e o $\bullet OH$, estão envolvidas em processos de sinalização, defesa e dano oxidativo (Lee; Koo; Min, 2004). Em concentrações controladas, $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 participam da regulação redox e da comunicação celular, enquanto em níveis elevados desencadeiam estresse oxidativo, morte celular e lesões teciduais (Wang *et al.*, 2018). O radical $\bullet OH$ é essencialmente tóxico, sendo associado apenas a danos oxidativos severos, sem função fisiológica benéfica (Lee; Koo; Min, 2004).

É destacável a transferência de energia ao 3O_2 , pelo mecanismo tipo II, formando o 1O_2 , atuante em processos fotossintéticos de plantas e cianobactérias, bem como em reações enzimáticas em seres humanos (Lee; Koo; Min, 2004; Ryan; Senge, 2015; Sedoud *et al.*, 2014; Agnez-Lima *et al.*, 2012). Em plantas e cianobactérias, atua em baixas concentrações como molécula sinalizadora que regula respostas de defesa e fotoproteção, embora em excesso cause fotoinibição e danos oxidativos aos pigmentos e membranas (Ryan; Senge, 2015; Sedoud *et al.*, 2014).

Em seres humanos, o $^1\text{O}_2$ é formado por processos enzimáticos, desempenhando papel na defesa imune e na sinalização celular, por exemplo em processos inflamatórios (Agnéz-Lima *et al.*, 2012), mas, quando em níveis elevados, provoca oxidação de biomoléculas, contribuindo para o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças degenerativas (Lee; Koo; Min, 2004). Devido à sua elevada reatividade e seletividade, o $^1\text{O}_2$ é amplamente explorado nos processos de transferência de elétrons em sistemas biológicos (Kiening; Lange, 2022), conversores de energia (Hasobe, 2013) e aplicações nas ciências da saúde, em especial na PDT (Shi *et al.*, 2019).

2.3. TERAPIA FOTODINÂMICA

A PDT constitui-se como uma abordagem terapêutica minimamente invasiva que combina um PS, luz em comprimento de onda na região do visível e $^3\text{O}_2$ presente nos tecidos (Correia *et al.*, 2021). O processo fotoquímico decorrente se traduz em efeitos celulares diretos, como a oxidação de membranas lipídicas e organelas, e indiretos, incluindo a indução de morte celular por apoptose, necrose e autofagia (Battogtokh; Ko, 2017; Mroz *et al.*, 2011).

Atualmente, a PDT apresenta uma ampla gama de aplicações. Na dermatologia, é empregada no tratamento de queratoses actínicas, acne, verrugas virais, fotorejuvenescimento, psoríase, cicatrizes hipertróficas e queloides (Wen; Li; Hamblin, 2017). Na oftalmologia, tem sido utilizada no manejo da degeneração macular relacionada à idade e na condição de coriorretinopatia serosa central (Dong *et al.*, 2016; Mohabati *et al.*, 2018). No entanto, seu maior destaque encontra-se na oncologia, sendo amplamente aplicada na erradicação de cânceres de pele basocelular, câncer de esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de pele de células escamosas (Collier *et al.*, 2018; Bartusik-Aebischer *et al.*, 2022; Shafirstein *et al.*, 2016; Que; Zwald; Schmults, 2018), assim como é também explorada como diagnóstico, em que a fluorescência do PS acumulado em tecidos neoplásicos auxilia na detecção de tumores (Zhao *et al.*, 2019).

A agregação representa um obstáculo crítico para o desempenho fotodinâmico, pois favorece processos de desativação não radiativa do S_1 , reduzindo a eficiência do cruzamento intersistema responsável pela formação do T_1 (Parra *et al.*,

2021). Como consequência, ocorre diminuição da população do estado T_1 disponível para transferência de energia ao 3O_2 , o que compromete a geração de 1O_2 e, consequentemente, tanto a função diagnóstica quanto a terapêutica desses PSs (Parra *et al.*, 2021).

Por isso, esforços significativos têm sido direcionados ao desenvolvimento de estratégias que previnam ou minimizem esse efeito, como o isolamento de derivados porfirínicos, síntese e derivatização de macrociclos estericamente impedidos (Uchoa *et al.*, 2011) e o nanoencapsulamento (Rossi *et al.*, 2008) dessas estruturas.

Entretanto, mesmo com o emprego dessas metodologias, a agregação continua a interferir em diferentes etapas do estudo de novos PSs. Um dos impactos mais relevantes ocorre na caracterização estrutural por técnicas espectroscópicas, especialmente a RMN na qual a formação de agregados pode provocar alargamento de sinais e alterações nos deslocamentos químicos no espectro, dificultando a interpretação precisa.

2.4. AGREGAÇÃO

Os agregados porfirínicos resultam da tendência natural dessas moléculas aromáticas a interagir por meio de forças intermoleculares. Esse fenômeno é explicado pelo modelo desenvolvido por Hunter; Sanders (1990). Nesse modelo, a formação dos agregados é resultante do equilíbrio entre a interação σ positiva de uma molécula e a nuvem π negativa de outra molécula, e a repulsão das nuvens π - π .

Para representar esse equilíbrio, os autores propuseram um modelo simplificado de distribuição de cargas, no qual cada átomo da estrutura é descrito como possuindo uma carga positiva central (núcleo) e duas cargas negativas correspondentes à densidade eletrônica π , posicionadas acima e abaixo do plano. Esse arranjo permite visualizar separadamente as contribuições de atração e repulsão nas interações intermoleculares (Hunter; Sanders, 1990), conforme ilustrado na **Figura 4**.

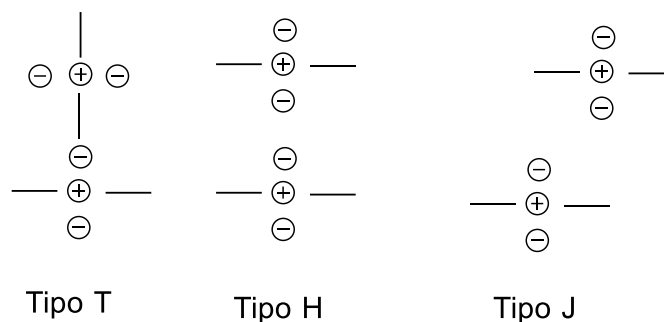


Figura 4 – Atribuição das regiões de atração e repulsão segundo o modelo de distribuição de cargas. Fonte: Adaptado de Hunter; Sanders (1990).

A partir dessa descrição, três geometrias típicas são previstas:

- J-agregados, em que as moléculas se empilham de forma lateral defasada, minimizando a repulsão $\pi-\pi$;
- T-agregados, nos quais a aresta de uma molécula se aproxima da face da outra, favorecendo a atração $\sigma-\pi$;
- H-agregados, caracterizados por empilhamento paralelo (face-a-face), em que a repulsão $\pi-\pi$ é maximizada.

Os autores relatam que a polarização eletrônica das moléculas envolvidas exerce grande influência na natureza dessas interações. Regiões π -ricas ou π -deficientes podem alterar significativamente o equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas, de modo que a estabilidade dos agregados não depende apenas das características eletrônicas globais da molécula, mas também dos pontos de contato intermoleculares (Hunter; Sanders, 1990).

Desta forma, diferentes substituintes β , *meso* ou íons metálicos coordenados ao núcleo tetrapirrólico modulam a geometria e a intensidade da agregação (Hunter; Sanders, 1990). As distâncias observadas para agregados de porfirinas em sistemas biológicos seguem as conformações do tipo J e T com deslocamentos laterais de 3 a 4 Å e separações interplanares entre 3,4 e 3,6 Å (Hunter; Sanders, 1990). Além disso, fatores ambientais como polaridade, temperatura, pH e concentração também modulam o processo de agregação (Estevão *et al.*, 2020; Magna *et al.*, 2019).

Antes mesmo do modelo de Hunter; Sanders (1990) ser amplamente aceito como referência teórica para explicar as interações $\pi-\pi$, diversos pesquisadores buscaram compreender o fenômeno da agregação por meio da RMN, uma vez que esta técnica apresenta alta sensibilidade às mudanças no ambiente químico dos

núcleos, sendo útil para investigar processos de agregação em solução (Gjuroski; Furrer; Vermathen, 2021).

2.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os macrociclos tetrapirrólicos por serem aromáticos estão susceptíveis a anisotropia diamagnética. Esse fenômeno foi descrito por Pauling como o comportamento magnético apresentado por estruturas químicas quando submetidas a um campo magnético externo, observando que a deslocalização dos elétrons π resulta na criação de um campo magnético, que pode ter direção oposta ao campo aplicado (contribuição diamagnética) ou a mesma direção (contribuição paramagnética) (Jirásek; Anderson; Peeks, 2021).

Essa anisotropia magnética resulta em diferenças nos deslocamentos químicos observados por RMN. Em porfirinas livres, por exemplo, os ^1H internos sofrem blindagem, apresentando sinais deslocados para campo alto, em torno de -2 a -5 ppm, enquanto os ^1H *meso* e em posições β -pirrólicas encontram-se em regiões desblindadas entre 8 e 12 ppm (Scheer; Katz, 1975).

2.5.1. Perturbação espectral induzida

Janson; Katz (1972) estudaram os efeitos da agregação por meio da técnica de RMN ^1H à 220 MHz, utilizando três ésteres dimetilícos de porfirinas: a mesoporfirina IX, a deuteroporfirina IX e a PpIX. Os autores investigaram a influência da concentração no ambiente químico dos ^1H e observaram baixa simetria nos espectros desses compostos. A **Figura 5** destaca as estruturas investigadas.

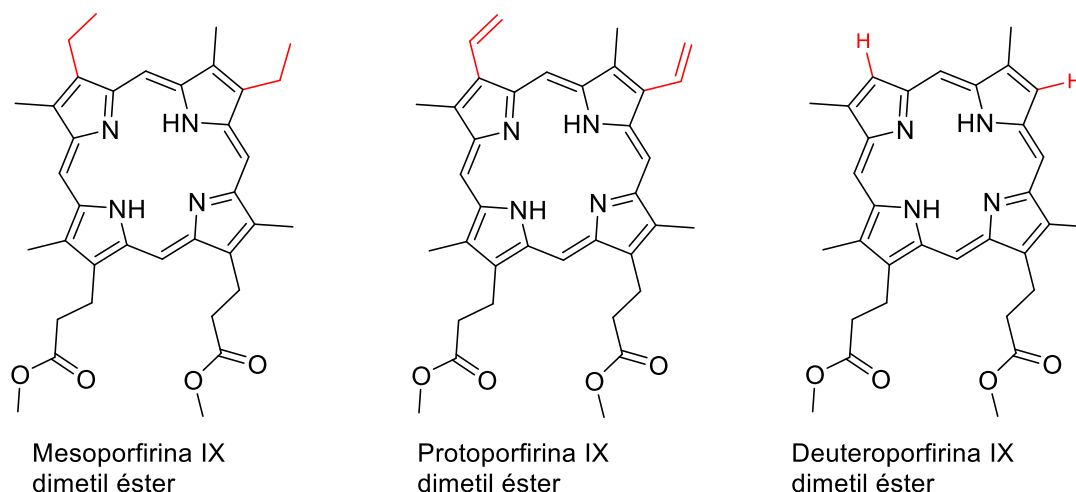


Figura 5 – Porfirinas investigadas por RMN ^1H .

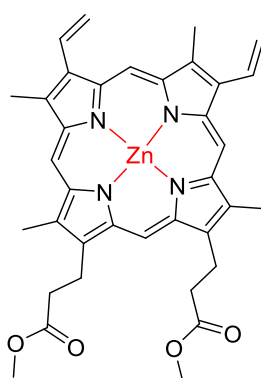
O estudo evidenciou que o aumento da concentração promovia a formação de dímeros, influenciando diretamente os deslocamentos dos sinais. Observou-se que a mudança nos deslocamentos químicos não era uniforme entre todos os ^1H , o que possibilitou a caracterização das estruturas para a época. Foi inferido, já na época, que a agregação depende do local de contato intermolecular.

A variação nos deslocamentos indicava que a agregação também influencia o efeito de anisotropia diamagnética, uma vez que todos os núcleos sob esse efeito apresentaram deslocamento para campo alto, atribuível à contribuição diamagnética. Assim, o aumento da concentração e a interação entre as nuvens π das moléculas contribuem para um efeito de blindagem mais acentuado.

Com base nessa diferenciação, os autores buscaram inferir a possível conformação do dímero. Para isso, monitoraram os sinais correspondentes às metilas nas posições 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1 do éster dimetílico da mesoporfirina IX. A análise comparativa entre os espectros obtidos na solução mais diluída e na mais concentrada revelou que as posições 2^1 e 18^1 apresentaram as maiores variações de deslocamentos químicos, indicando que essas regiões da molécula estavam mais envolvidas nas interações intermoleculares associadas à formação dos dímeros.

Essa observação permitiu inferir quais ^1H sofrem maior deslocamento, indicando que a conformação do dímero seria a aproximação lado a lado com os centros desalinhados, o tipo J. Os autores explicam que isso se deve ao fato dos substituintes no macrociclo ter nuvens π volumosas e causar a repulsão entre as cadeias e não permitir que o núcleo se encaixe.

Este estudo de preliminar de Jason; Katz (1972), foi contestado por Abraham *et al.* (1979), sendo dito que não era possível realizar as atribuições inequívocas das diferentes porfirinas apresentadas apenas pela técnica de RMN ^1H . Assim, em seu estudo, Abraham *et al.* (1979) buscaram estudar o efeito da agregação com a estrutura do derivado dimetil éster da PpIX coordenada ao íon Zn(II) (**Figura 6**) por meio de espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . A escolha se deve ao íon metálico de zinco intensificar a tendência de agregação em solução, tornando os efeitos espectroscópicos mais pronunciados e, portanto, mais acessíveis à caracterização.



Zinco (II) protoporfirina IX
dimetil éster

Figura 6 – Porfirina investigada por RMN ^1H e ^{13}C .

O objetivo central consistia em compreender de que maneira os deslocamentos químicos de núcleos de ^{13}C eram influenciados pela formação de dímeros e se tais mudanças poderiam ser atribuídas ao efeito de anisotropia diamagnética proveniente do sistema π de uma molécula vizinha. Primeiramente, os pesquisadores realizaram experimentos de RMN ^{13}C em diferentes concentrações, de modo a acompanhar a variação dos deslocamentos químicos durante o processo de agregação.

Assim como no estudo prévio de 1972, observou-se que, à medida que a concentração aumentava, múltiplos sinais deslocavam-se em direção a campo alto, o que indica aumento da blindagem magnética resultante da proximidade entre macrociclos. Para interpretar esse comportamento, foi necessário obter o estado monomérico da molécula. Empregaram solventes como a pirrolidina, capazes de romper as interações intermoleculares e dissociar os agregados, o que permitiu determinar as variações de deslocamento químico entre as formas monomérica e agregada.

A fim de confirmar a origem dos sinais e obter atribuições inequívocas, os autores utilizaram duas estratégias complementares. Realizaram experimentos de deuteração seletiva em posições específicas da cadeia lateral da porfirina, permitindo eliminar sobreposições espectrais, além de utilizarem desacoplamento seletivo durante as aquisições de RMN, de modo a correlacionar sinais de ^{13}C com os ^1H diretamente ligados.

Os resultados obtidos revelaram uma correlação entre as variações de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C correspondentes, confirmando que ambos os núcleos estavam submetidos ao mesmo campo magnético adicional, proveniente da anisotropia diamagnética da molécula vizinha. Com o objetivo de propor um modelo estrutural para o dímero de Zn-protoporfirina IX dimetil éster, Abraham *et al.* (1979) realizaram um tratamento computacional baseado no modelo de rede de dipolos equivalentes.

O cálculo de anisotropia diamagnética revelou que as variações nos deslocamentos químicos observadas em ambos os núcleos são efeitos magnéticos anisotrópicos induzidos pela molécula vizinha, confirmando a presença de correntes intermoleculares na formação e estabilização do agregado. Esse estudo demonstrou uma forma elegante e mais precisa as mudanças do estado monomérico e agregado de porfirinas por RMN.

Contudo, dadas as limitações instrumentais da época, é possível que algumas dessas atribuições tenham sido indevidamente caracterizadas. Com o avanço das técnicas de RMN, incluindo espectros bidimensionais, gradientes de campo pulsado e magnetos criogenicamente resfriados, torna-se possível reavaliar tais sistemas com maior resolução e sensibilidade, permitindo uma descrição mais detalhada da natureza supramolecular dos agregados (Gjuroski; Furrer; Vermathen, 2021).

Esses avanços permitem atribuições mais seguras e detalhadas, possibilitando a identificação dos substituintes que mais contribuem para a formação dos agregados e a determinação das faixas de concentração associadas à permutação dos sinais. Assim, possibilitar uma compreensão do fenômeno de agregação que é de importância para as diversas áreas de aplicabilidade dos macrociclos, como a PDT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas instalações do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ) e da empresa Resix Invent, com as caracterizações estruturais realizadas em parceria com a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

As rotas sintéticas para a obtenção das estruturas estudadas encontram-se bem estabelecidas na literatura (Uchoa *et al.*, 2011) e são de domínio do grupo de pesquisa vinculado ao *Center for Research on Redox Processes in Biomedicine* (REDOXOME – CEPID-FAPESP, Processo 2013/07937-8). O projeto foi desenvolvido com os insumos do projeto PIPE/FAPESP 2016/16380-3.

3.1. MATERIAIS

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.) e eram apropriados para síntese química. A PpIX sal dissódico ($\geq 90\%$) e o clorofórmio deuterado (CDCl_3) contendo 0,05% (v/v) de tetrametilsilano (TMS), com pureza $\geq 99,8\%$, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sendo empregados conforme recebidos, sem purificação ou tratamento prévio. Os demais reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas NEON e Synth.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Esterificação

O sal dissódico da PpIX (1,00 g, $\geq 90\%$) foi dissolvido em 20 mL de solução metanol:ácido sulfúrico (19:1, v/v) e mantido sob agitação magnética constante à temperatura de 25 °C por 12 h, sobre proteção da luz. A **Figura 7** destaca a rota sintética.

quantidades de 1,00 mg à solução anterior, até a obtenção da concentração máxima de 33,8 mmol.L⁻¹. A **Figura 8** ilustra o procedimento de preparo das amostras.

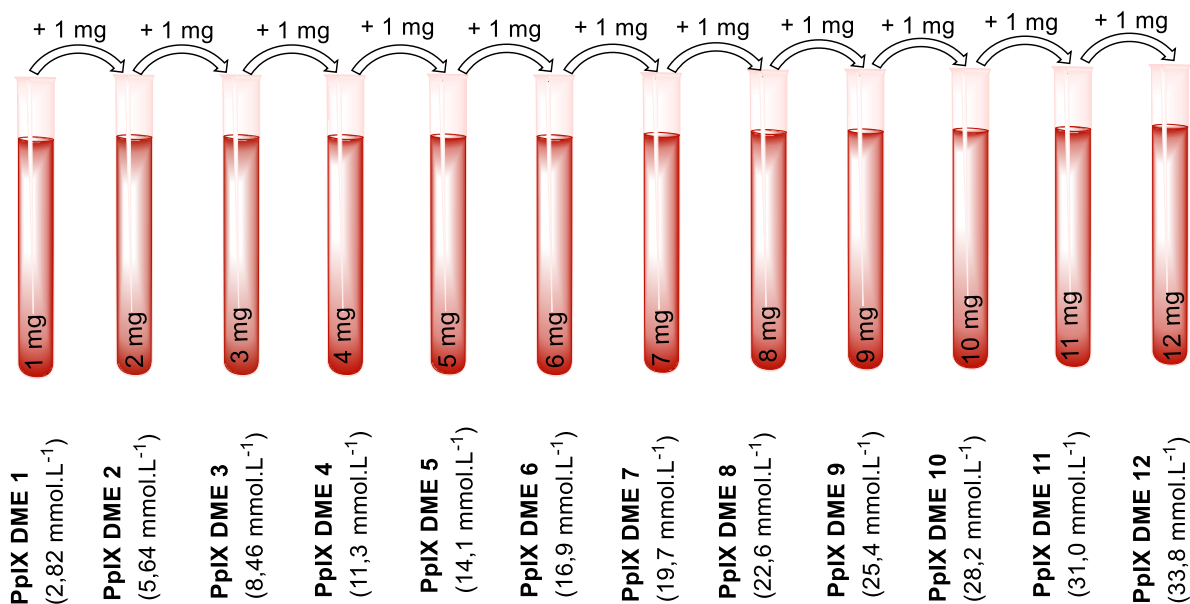


Figura 8 – Preparo das amostras do de PpIX DME de forma acumulativa.

Os espectros unidimensionais de RMN ¹H e bidimensionais ¹H–¹H COSY, ¹H–¹H NOESY e ¹H–¹³C HSQC foram registrados para as amostras de concentração 2,82 e 33,8 mmol.L⁻¹. As demais amostras foram registradas apenas o espectro unidimensional RMN ¹H.

3.3.3. Processamento de dados

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C de cada amostra foram processados e analisados utilizando o *software* MestReNova (versão 12.0.0-20080). O referenciamento químico foi realizado de forma manual com base no sinal do TMS, adotado como padrão interno e fixado em 0,00 ppm, assegurando a comparação entre os sinais espectrais. A identificação dos sinais espectrais foi realizada por seleção manual, permitindo a adequada distinção entre sinais reais e interferentes.

As integrais nos espectros de RNM ¹H foram realizadas individualmente, de forma a garantir precisão das proporções relativas dos núcleos de ¹H presentes. As constantes *J* foram determinadas a partir da diferença do δ entre sinais adjacentes, expressa em ppm, multiplicada pela frequência de operação do espectrômetro (800

MHz). Isto possibilitou a análise de acoplamentos entre sinais e contribuiu para a confirmação estrutural. Para fins de padronização visual e comparação, os doze espectros foram organizados em modo empilhado, com ajuste automático da escala vertical, permitindo a visualização das diferenças espectrais e a comparação direta dos perfis obtidos para diferentes amostras.

Os espectros bidimensionais de RMN, incluindo ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC, foram processados e analisados utilizando o *software* Bruker TopSpin (versão 4.5.0). O referenciamento químico dos espectros bidimensionais homonucleares foi realizado por calibração manual dos eixos F1 e F2, adotando o sinal do TMS como padrão interno e fixando-o em 0,00 ppm. Em relação ao experimento heteronuclear, o referenciamento químico foi realizado pelo conhecimento do δ das metoxilas adquirida das análises de RMN ^1H aqui efetuadas, sendo a calibração realizada utilizando os valores referente aos núcleos de ^1H e ^{13}C como padrão interno nos eixos F2 e F1, respectivamente.

A seleção dos sinais nos espectros bidimensionais foi realizada pelo procedimento manual de marcação de picos, permitindo a identificação precisa das correlações cruzadas. Nos experimentos homonucleares, a análise concentrou-se exclusivamente nos sinais localizados fora da diagonal principal, uma vez que esta representa a autocorrelação dos núcleos e não fornece informações adicionais sobre acoplamentos escalares. No experimento heteronuclear, não há a presença de diagonal, sendo a interpretação baseada na correlação cruzada entre os sinais dos núcleos de ^1H e ^{13}C .

4. RESULTADOS

4.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO

A reação de esterificação empregada corresponde ao método de Fischer, que envolve a reação entre um ácido carboxílico e um álcool na presença de um ácido forte como catalisador, resultando na formação de um éster e água. Do ponto de vista mecanístico, trata-se de uma substituição nucleofílica acílica. Conforme ilustrado na **Figura 9**, o oxigênio da carbonila da PpIX é inicialmente protonado pelo ácido sulfúrico, aumentando a eletrofilicidade do carbono carbonílico e, conseqüentemente, facilitando o ataque nucleofílico do metanol, que doa um par de elétrons e leva à formação de um intermediário tetraédrico.

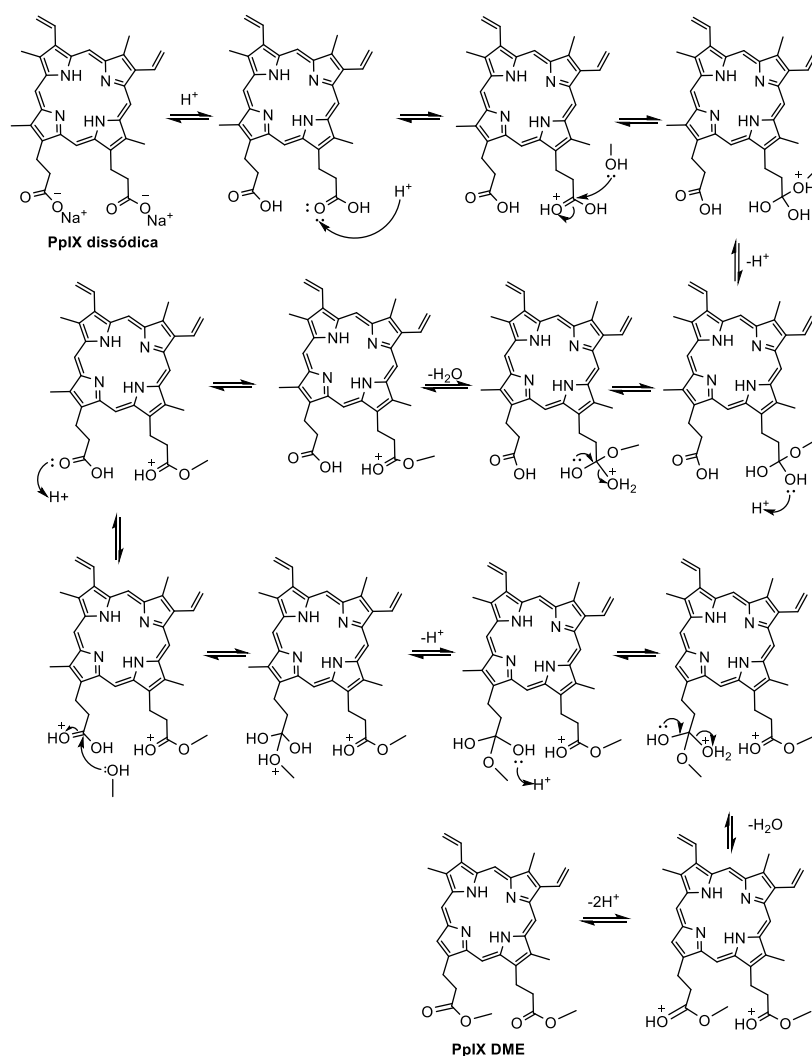


Figura 9 – Mecanismo reacional da esterificação da PpIX DME.

A reação estabelece um equilíbrio químico, no qual é quebrado pelo excesso de metanol, deslocando o equilíbrio na direção à formação do éster (Bruice, 2006). O intermediário tetraédrico então passa por uma série de reorganizações eletrônicas, para formar o PpIX DME e eliminar água. É importante ressaltar, que a PpIX não apresenta simetria estrutural, logo a esterificação ocorre em uma carboxila e depois em outra, conforme destacado na **Figura 9**. Os produtos gerados são a PpIX mono esterificada e a PpIX DME.

Todas as etapas de purificação foram conduzidas no escuro para preservar a integridade do macrociclo. A mistura reacional foi extraída com diclorometano (100 mL) e neutralizada com hidróxido de amônio (150 mL, 28–30%,) em gelo até pH 11, sob agitação lenta por 5–10 min, evitando a formação de emulsão. A fase orgânica foi separada por decantação, e o procedimento de extração foi repetido duas vezes com diclorometano (10 mL), com tempos de decantação de 5–10 min. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada por evaporação rotativa.

A purificação foi realizada por solubilização em diclorometano, seguida de precipitação por adição de metanol com auxílio de ultrassom. O sólido precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, raspado e transferido para frasco âmbar. Após secagem em capela com fluxo ar de contínuo, o material foi armazenado em dessecador sob vácuo.

4.2. ATRIBUIÇÕES ESPECTROSCÓPICAS DA PpIX DME 1

A espectroscopia por RMN ^1H da amostra PpIX DME 1 evidenciou o perfil característico de compostos porfirinoides, apresentando sinais bem definidos e compatíveis com a estrutura proposta. O espectro unidimensional (**Figura 10**) revela uma boa resolução, com ausência de sinais de impurezas relevantes, o que confirma a pureza e integridade estrutural do composto esterificado.

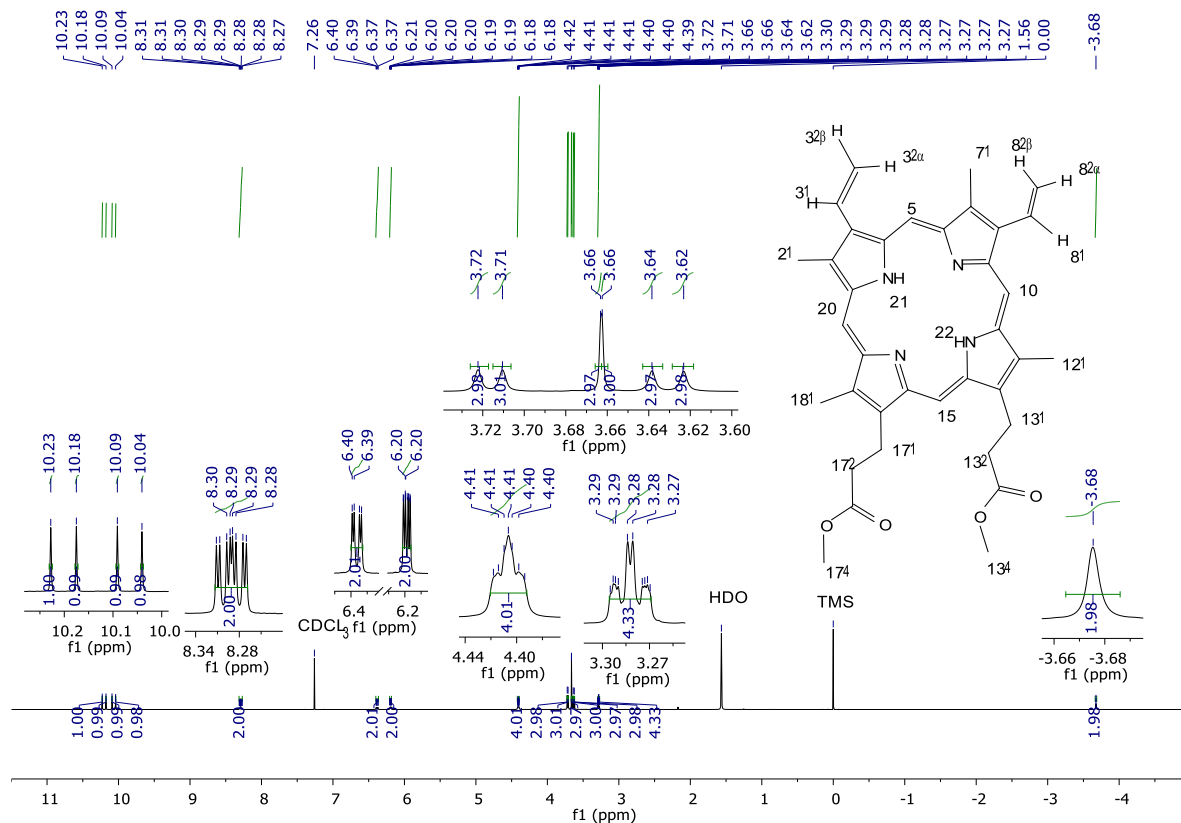


Figura 10 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1.

Os *meso* H-5, H-10, H-15 e H-20 foram observados em campo baixo, comportamento esperado em função do efeito de anisotropia diamagnética. A presença de quatro singletos distintos comprova a não equivalência magnética desses núcleos. Essa diferenciação é consequência direta da assimetria molecular introduzida pelas cadeias laterais propanoato nas posições 13 e 17, pelas cadeias metílicas nas posições 2, 7, 12 e 18 e pelos sistemas vinílicos nas posições 3 e 8, que quebram a simetria do macrociclo.

A confirmação das atribuições das posições *meso* foi realizada com base nas correlações espaciais observadas no espectro ^1H – ^1H NOESY, cuja análise permitiu distinguir inequivocamente cada um dos singletos, conforme apresentado na **Figura 11**.

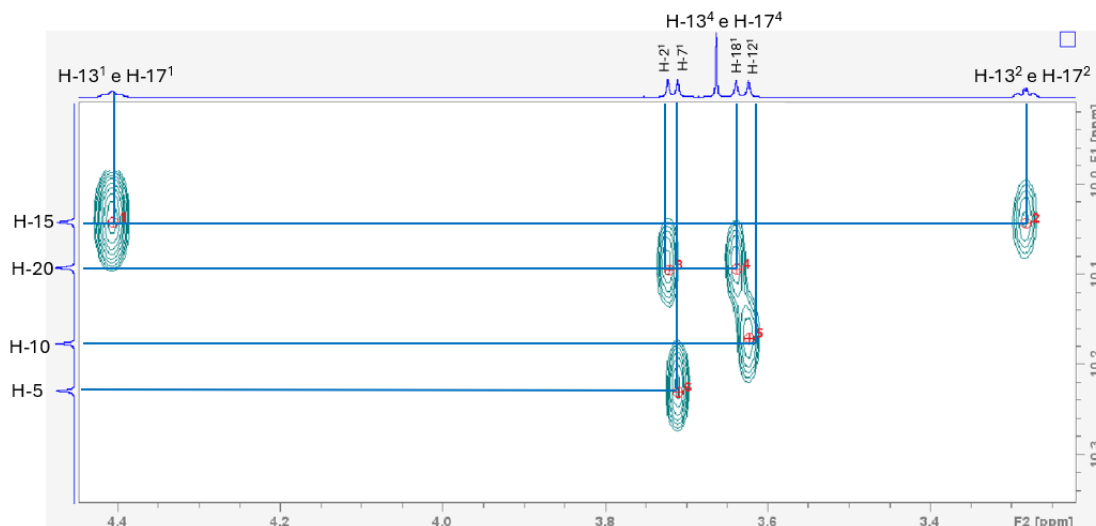


Figura 11 – ^1H – ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos *meso*, metilênicos, metílicos e metoxílicos.

O H-15 apresentou correlação com H-13¹, H-13², H-17¹ e H-17², confirmando sua posição em δ 10,04 ppm; o H-20 correlacionou-se com H-2¹ e H-18¹, sendo atribuído a δ 10,09 ppm; o H-10 mostrou interação espacial com H-12¹ (δ 10,18 ppm), enquanto o H-5 apresentou NOE com H-7¹ (δ 10,23 ppm).

Os vinílicos H-3¹ e H-8¹ foram observados como dupletos de dupletos sobrepostos em δ 8,29 ppm. A distorção de multiplicidade é explicada pelo acoplamento com vinílicos em *cis* (H-3^{2 α} e H-8^{2 α}) e em *trans* (H-3^{2 β} e H-8^{2 β}). Esse comportamento foi validado pelos valores de J calculados, sendo 11,4 Hz para o arranjo *cis* e 17,8 Hz para o *trans*, estando em concordância com os valores pré-estabelecidos na literatura (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005). A **Figura 12** ilustra o diagrama de chave para esses ^1H vinílicos.

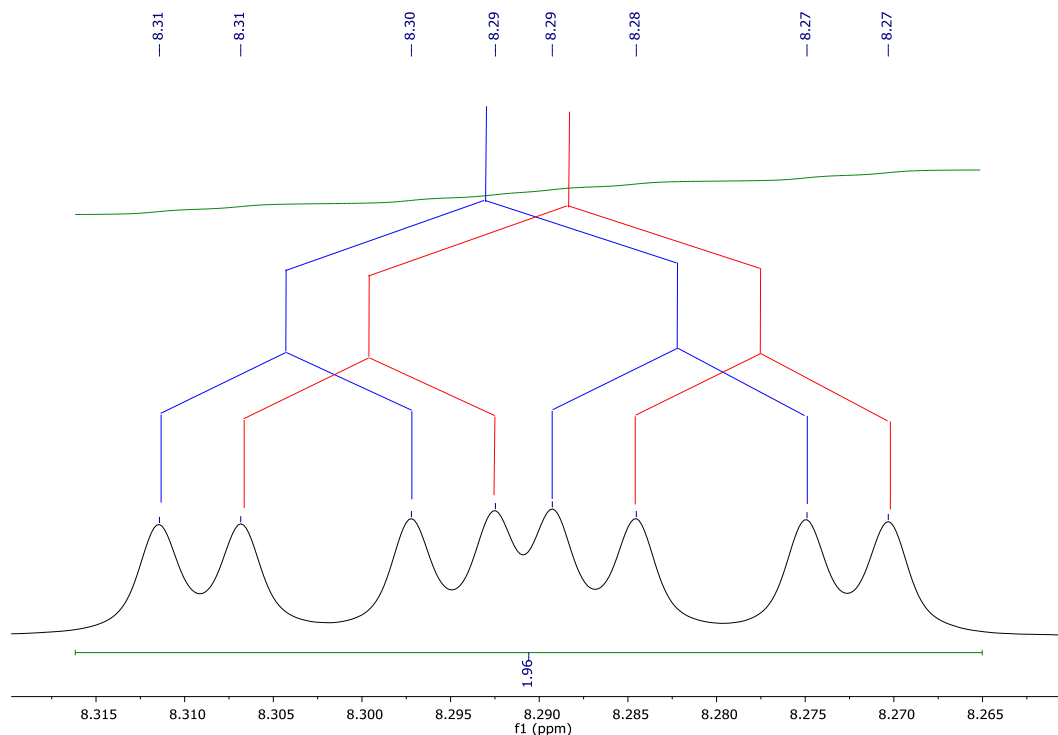


Figura 12 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos vinílicos H-3' e H-8'.

A análise do ^1H – ^1H NOESY complementa essa observação, revelando interações espaciais entre os vinílicos H-3' e H-8' com os *meso* H-5 e H-10, respectivamente (**Figura 13**). Nota-se, entretanto, que o centro das duas ondas não coincide, indicando ambientes magnéticos distintos para esses vinílicos. Com base nesses resultados, é possível atribuir que o H-3' representa o diagrama de chave em azul na **Figura 12**.

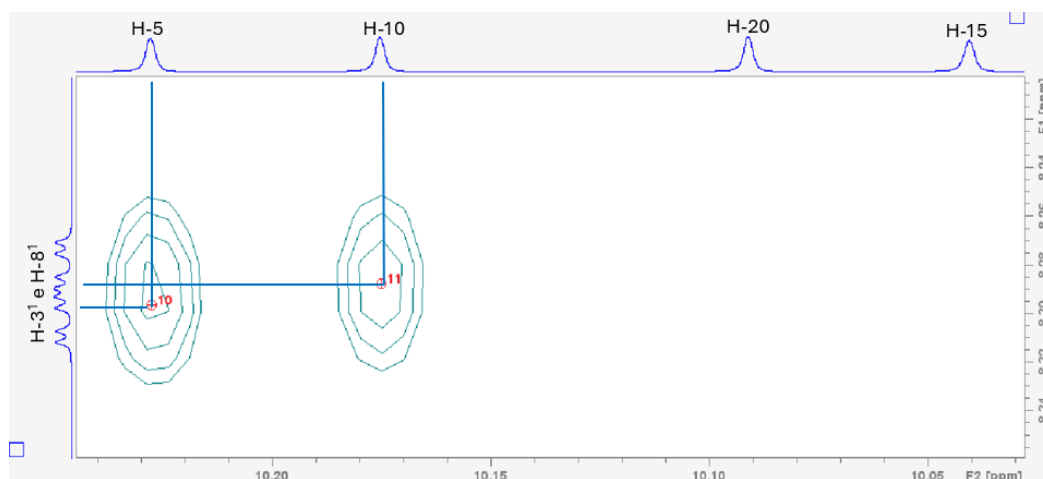


Figura 13 – ^1H – ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos vinílicos e *meso*.

A região de δ 6,38 e 6,19 ppm apresentou dois dupletos de dupletos atribuídos a H-3^{2 β} /H-8^{2 β} e H-3^{2 α} /H-8^{2 α} , respectivamente. O sinal em δ 6,38 ppm ($J = 17,8$ Hz) foi associado à geometria trans, enquanto o sinal em δ 6,19 ppm ($J = 11,5$ Hz) corresponde à geometria cis, corroborando a análise dos acoplamentos de H-3¹ e H-8¹. Apesar dos vinílicos H-3² e H-8² não serem equivalentes, os sinais aparecem sobrepostos em decorrência da similaridade estrutural. O espectro ¹H-¹H COSY (Figura 14) confirmou essas atribuições ao ser identificado correlações entre H-3¹→H-3^{2 α} e 2 ^{β} e H-8¹→H-8^{2 α} e 2 ^{β} .

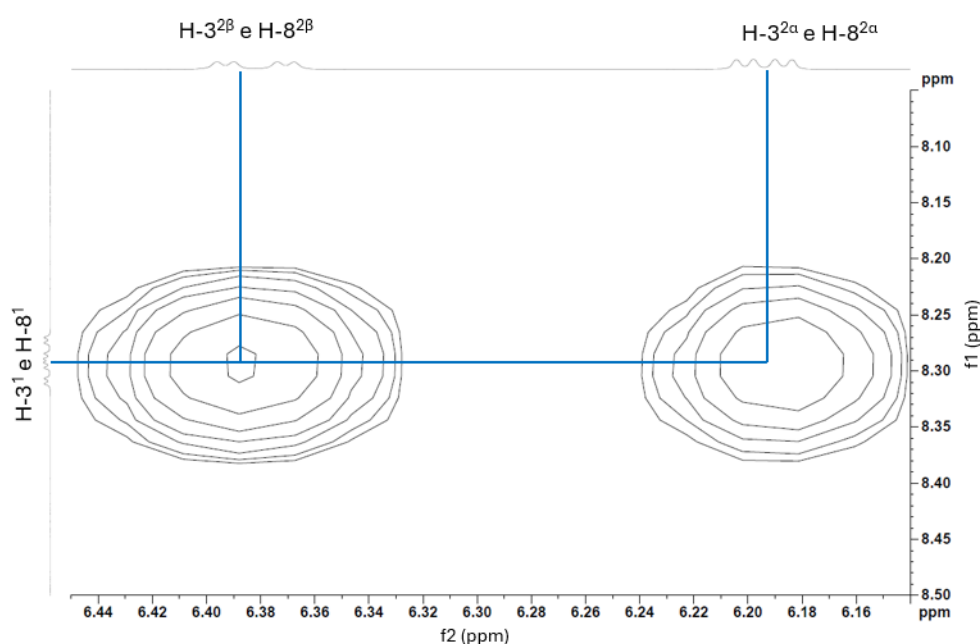


Figura 14 – ¹H-¹H COSY (CDCl₃ com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos ¹H vinílicos.

Os metilênicos também foram caracterizados. Em δ 4,41 ppm foram observados dois tripletos parcialmente sobrepostos, correspondentes a H-13¹/H-17¹, com $J = 8,8$ Hz, acoplando-se a H-13²/H-17², que aparecem como tripletos parcialmente sobrepostos em δ 3,28 ppm ($J = 8,5$ Hz). A análise do espectro ¹H-¹H COSY confirmou as correlações entre H-13¹/H-17¹→H-13²/H-17² (Figura 15).

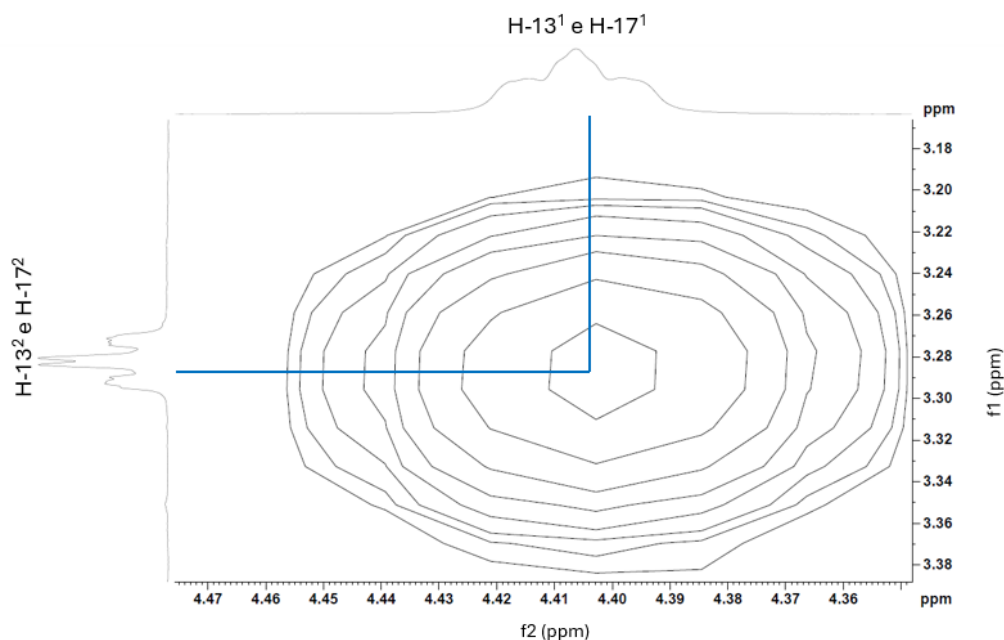


Figura 15 – ^1H – ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos metilênicos.

A diferença de δ dessas posições reflete o efeito de anisotropia diamagnética, que afeta mais intensamente os metilênicos $\text{H-13}^1/\text{H-17}^1$, resultando em uma maior desblindagem desses núcleos. A atribuição dos tripletos foi confirmada pela análise do espectro ^1H – ^1H NOESY (**Figura 16**), em que se observou interações espaciais entre $\text{H-13}^1 \rightarrow \text{H-12}^1$ e $\text{H-17}^1 \rightarrow \text{H-18}^1$.

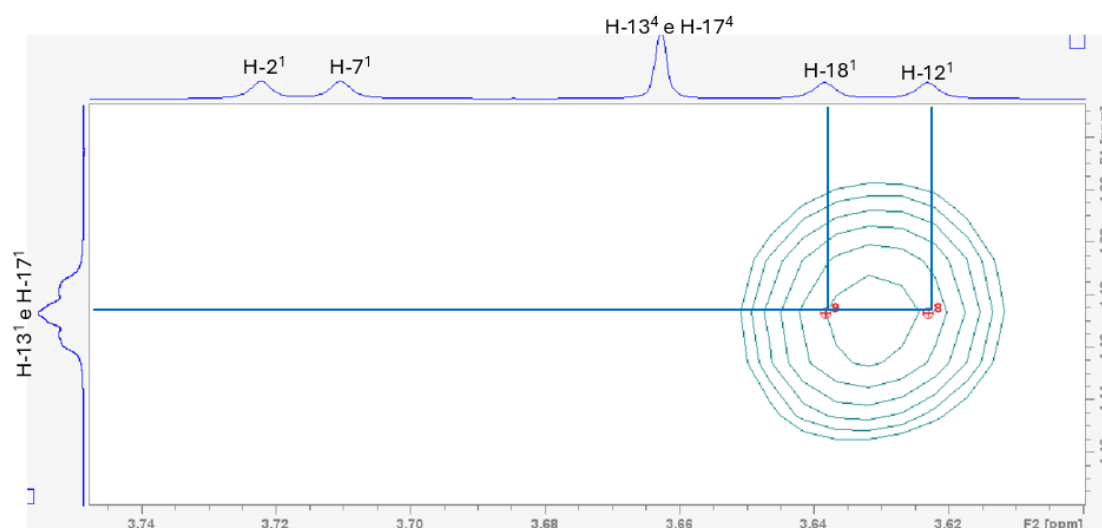


Figura 16 – ^1H – ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 1 em relação aos metilênicos e metílicos.

Os metílicos foram observados como quatro singletos distintos nos δ 3,72, 3,71, 3,64 e 3,62 ppm no espectro de RMN ^1H . Os metílicos apresentaram correlação espacial com os *meso*, conforme observado anteriormente na **Figura 11**. O cruzamento espacial entre o H-20 e o metílico H-2¹ confirmou a atribuição deste em δ 3,72 ppm, enquanto a interação entre o H-20 e o metílico H-18¹ possibilitou associá-lo em δ 3,64 ppm. O NOE entre o H-5 e o metílico H-7¹ indicou sua posição em δ 3,71 ppm, e a interação do H-10 com o metílico H-12¹ o confirmou em δ 3,62 ppm.

Os metoxílicos das posições H-13⁴ e H-17⁴ foram observados como singletos quase sobrepostos em δ 3,66 ppm, sendo a distância dos sinais na ordem de 0,8 ppb. Apesar da quase equivalência, essas posições apresentam ambientes eletrônicos distintos. Essas posições não apresentaram correlações nos experimentos homonucleares e não puderam ser atribuídos individualmente.

Os internos H-21 e H-22 foram observados como equivalentes em um singletto em δ -3,68 ppm, caracterizando-se por intensa blindagem, como esperado para núcleos localizados no interior do macrociclo. Os principais efeitos NOE percebidos pelo presente estudo estão apresentados na **Figura 17**.

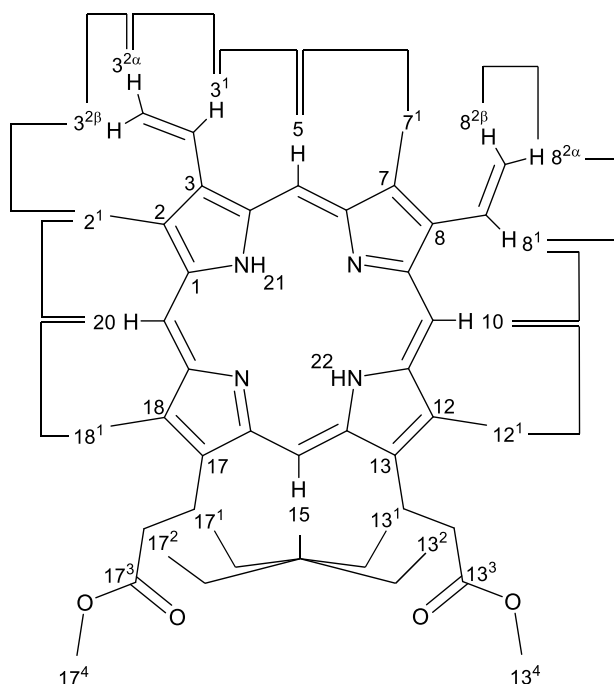


Figura 17 – Principais efeitos NOE.

A interpretação dos espectros bidimensionais que possibilitou a atribuição precisa dos ^1H permitiu, por consequência, inferir as atribuições dos ^{13}C não

quaternários com base na análise de ^1H - ^{13}C HSQC. O espectro de RMN ^{13}C da amostra PpIX DME 1 está apresentado na **Figura 18**.

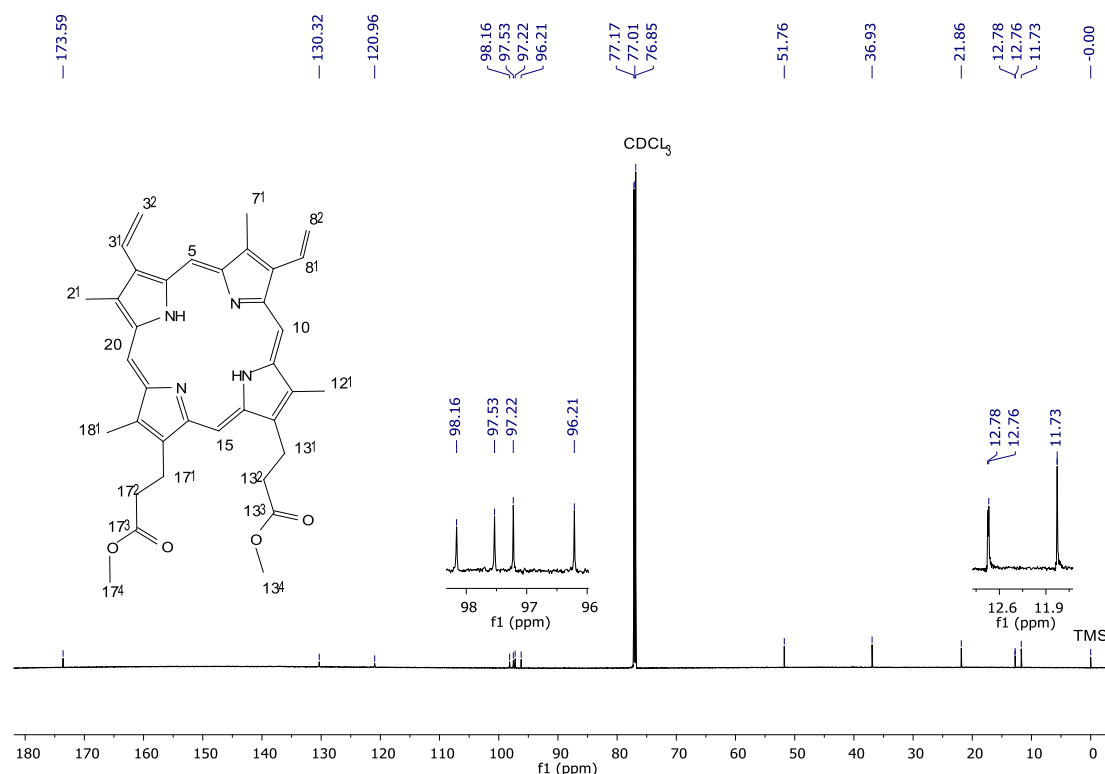


Figura 18 – RMN ^{13}C (CDCl_3 , com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) da PpIX DME 1.

Observa-se na **Figura 18** que o sinal mais desblindado, em δ 173,59 ppm, corresponde aos carbonílicos C-13³/C-17³, que não apresentam correlação no espectro de ^1H - ^{13}C HSQC, conforme esperado para carbonilas.

Os vinílicos C-3¹/C-8¹ foram identificados em δ 130,32 ppm e seus vizinhos C-3²/C-8² em δ 120,96 ppm, refletindo o padrão de desblindagem característico de sistemas vinílicos, em que o grupo $=\text{CH}_2-$ estão em campo alto quando comparados com o grupo $=\text{CH}-$ (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

Os *meso* C-5, C-10, C-15 e C-20 são observados em δ 98,16 ppm, δ 97,55 ppm, δ 96,21 ppm e δ 97,22 ppm, respectivamente, confirmando a não equivalência magnética já evidenciada pelo espectro de RMN ^1H . Os metoxílicos C-13⁴/C-17⁴ foram identificadas como equivalentes em δ 51,76 ppm.

Os metilênicos C-13²/C-17² são observados em δ 36,93 ppm e C-13¹/C-17¹ em δ 21,86 ppm. Esse comportamento pode ser explicado pela influência eletrônica exercida pelos carbonílicos C-13³/C-17³. As carbonilas, por apresentarem caráter

fortemente eletrofílico, induzem uma polarização da densidade eletrônica ao longo das cadeias laterais adjacentes, resultando em uma distribuição assimétrica de cargas.

Esse efeito faz com que os C-13²/C-17² apresentem caráter mais negativo, enquanto C-13¹/C-17¹ se tornam relativamente mais positivos. Como consequência, ocorre um efeito de desblindagem mais acentuado sobre C-13²/C-17², deslocando seus sinais para campo mais baixo.

Os sinais das metilas C-2¹/C-7¹ foram observadas em um sinal centrado em δ 12,80 ppm aproximadamente, com leve desdobramento, sugerindo pequenas variações no ambiente eletrônico, mas mantendo equivalência magnética dentro da resolução experimental. Em contrapartida, as metilas C-12¹/C-18¹ aparecem como equivalentes no δ 11,73 ppm.

4.3. ATRIBUIÇÕES ESPECTROSCÓPICAS DA PpIX DME 12

A influência do estado de agregação sobre o comportamento espectroscópico da PpIX DME pode ser observada por meio das mudanças nos δ de seus núcleos de ¹H. Como ilustrado na **Figura 19**, o aumento da concentração da amostra altera o perfil do espectro de RMN ¹H, refletindo modificações no ambiente eletrônico decorrentes da aproximação e interação entre os macrociclos.

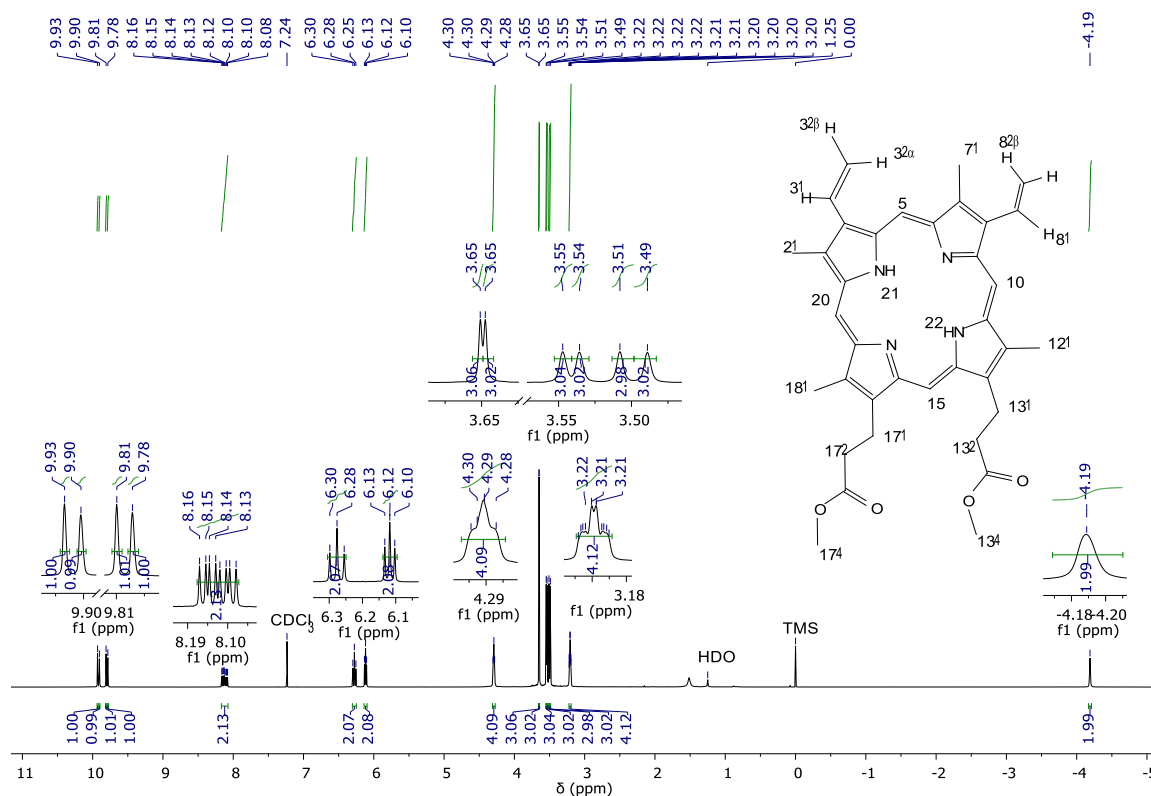


Figura 19 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12.

A análise conjunta dos espectros de RMN ^1H e ^1H – ^1H NOESY (**Figura 20**) permitiu identificar alterações na sequência dos singletos referentes aos *meso*. Na amostra PpIX DME 12, o sinal mais desblindado foi H-10, atribuído em δ 9,93 ppm, seguido por H-5 (δ 9,90 ppm), H-15 (δ 9,81 ppm) e H-20 (δ 9,78 ppm).

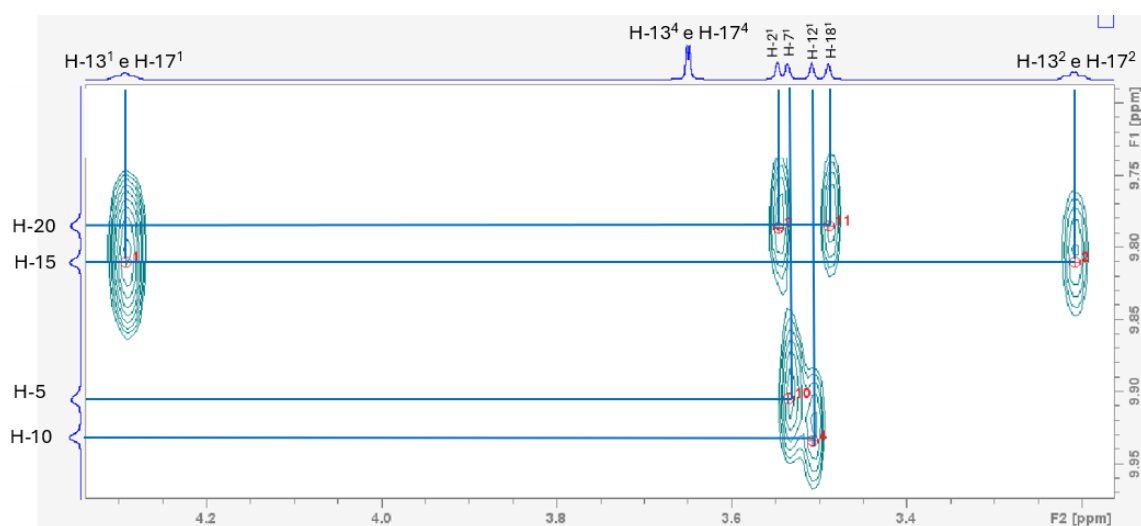


Figura 20 – ^1H – ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos *meso*, metilênicos, metílicos e metoxílicos.

Os vinílicos apresentaram alterações notáveis. Os dupletos de dupletos de H-3¹ e H-8¹ (**Figura 21**), antes sobrepostos, passaram a ser distinguíveis, embora ainda observados próximos no espectro.

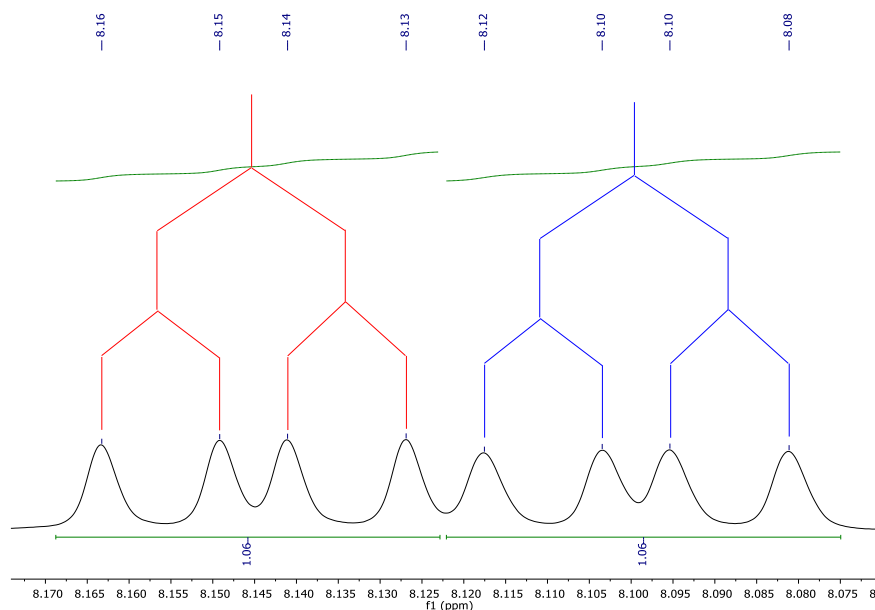


Figura 21 – RMN ¹H (CDCl₃ com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos H-3¹ e H-8¹.

Essa separação decorre da interação entre os macrociclos e devido a mudança na sequência dos *meso*. Pelo ¹H–¹H NOESY (**Figura 22**), H-8¹ foi identificado como o sinal mais desblindado, em razão de sua interação espacial com H-10 em δ 8,15 ppm, enquanto H-3¹ é indicado em δ 8,10 ppm devido sua interação com o *meso* H-5.

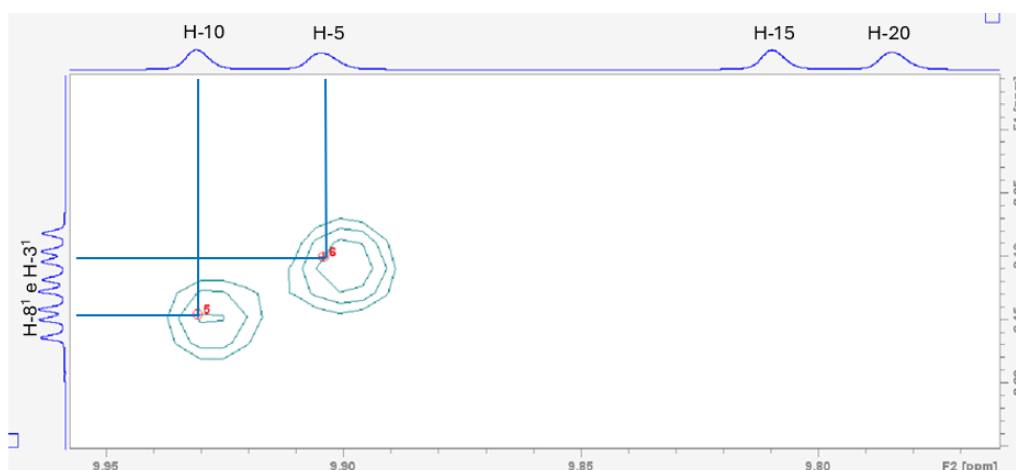


Figura 22 – ¹H–¹H NOESY (CDCl₃ com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos e *meso*.

Os sinais correspondentes aos vinílicos H-3²/H-8² em configurações cis e trans, que na amostra PpIX DME 1 exibiam perfis de dupletos de dupletos, passam a apresentar multiplicidade de tripletos na amostra PpIX DME 12, resultado da sobreposição parcial entre essas posições.

Embora a separação entre H-3² e H-8² não tenha sido completamente resolvida, a distinção geométrica pôde ser confirmada por meio das constantes de acoplamento: δ 6,28 ppm ($J = 17,3$ Hz) para as posições trans H-3^{2 β} /H-8^{2 β} e δ 6,12 ppm ($J = 12,0$ Hz) para as posições cis H-3^{2 α} /H-8^{2 α} , conforme ilustrado no diagrama de chave (**Figura 23**).

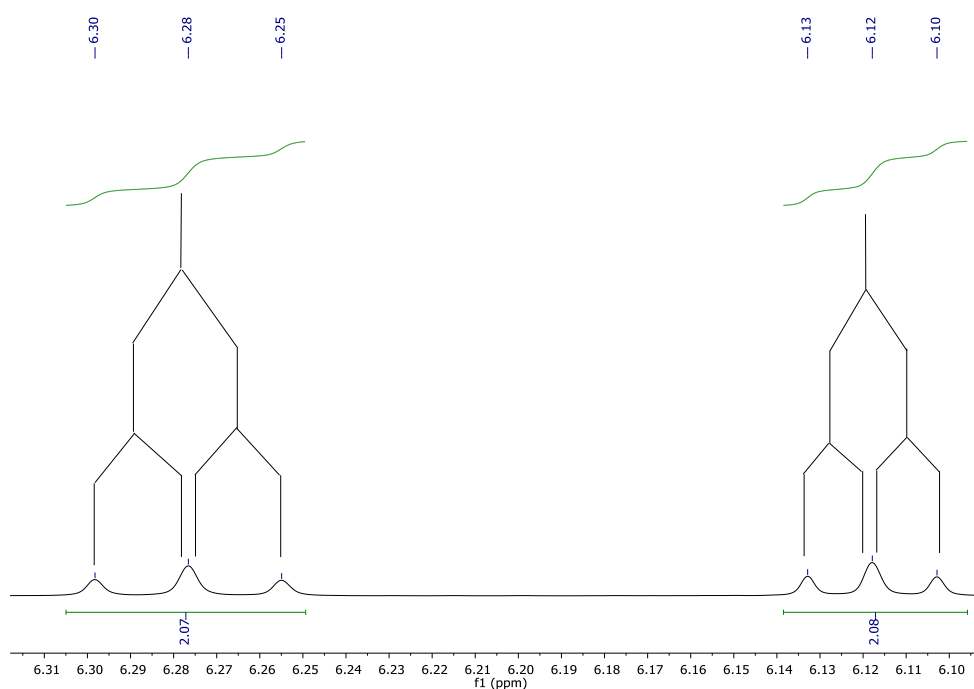


Figura 23 – RMN ¹H (CDCl₃ com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos vinílicos H-3^{2 β} /H-8^{2 β} e H-3^{2 α} /H-8^{2 α} .

O espectro ¹H–¹H COSY (**Figura 24**) confirmou as atribuições dos vinílicos ao ser identificado correlações entre H-3¹→H-3^{2 α} e ^{2 β} e H-8¹→H-8^{2 α} e ^{2 β} .

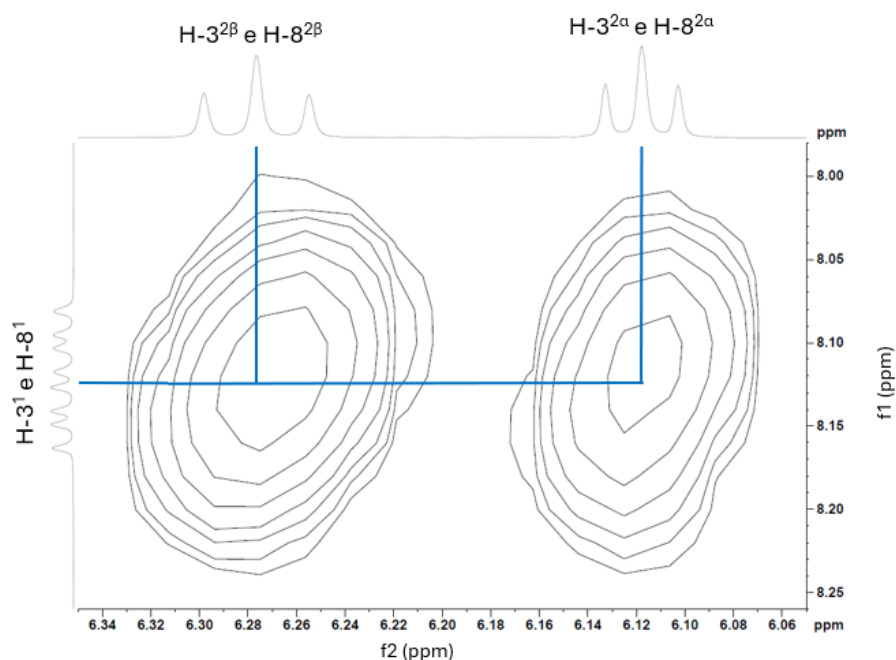


Figura 24 – ^1H – ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos ^1H vinílicos.

Para os metilênicos H-13^1 , H-13^2 , H-17^1 e H-17^2 , os sinais foram observados como dois conjuntos principais de tripletos sobrepostos: $\text{H-13}^1/\text{H-17}^1$ em δ 4,29 ppm e $\text{H-13}^2/\text{H-17}^2$ em δ 3,21 ppm. Não foi possível calcular a constante J devido a multiplicidade dos sinais, porém a correlação entre $\text{H-13}^1/\text{H-13}^2 \rightarrow \text{H-17}^1/\text{H-17}^2$ foi confirmada pela análise do espectro ^1H – ^1H COSY (**Figura 25**).

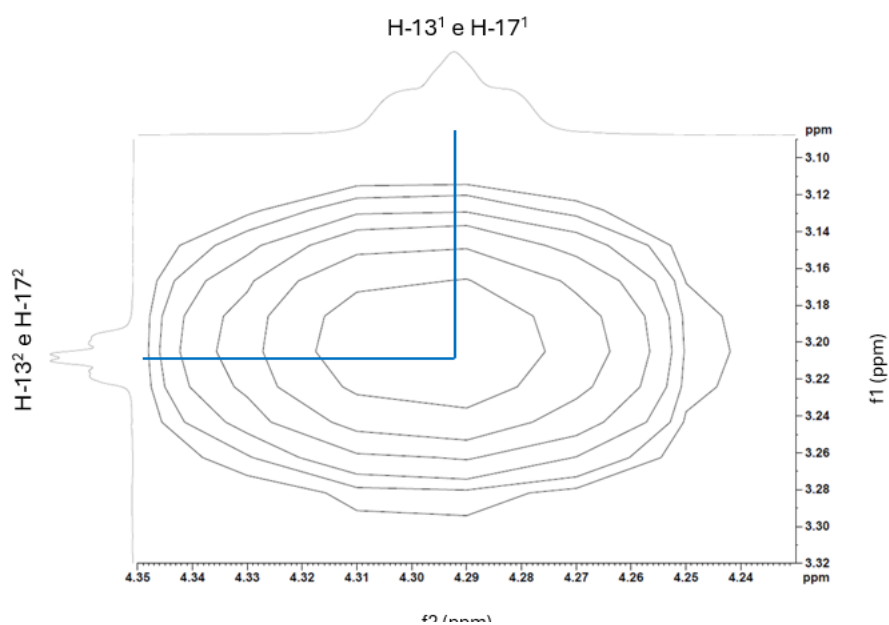


Figura 25 – ^1H – ^1H COSY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos metilênicos.

A atribuição dos metilênicos foi confirmada pela análise do espectro ^1H - ^1H NOESY (**Figura 26**), em que se observou interações espaciais entre $\text{H-13}^1 \rightarrow \text{H-12}^1$ e $\text{H-17}^1 \rightarrow \text{H-18}^1$.

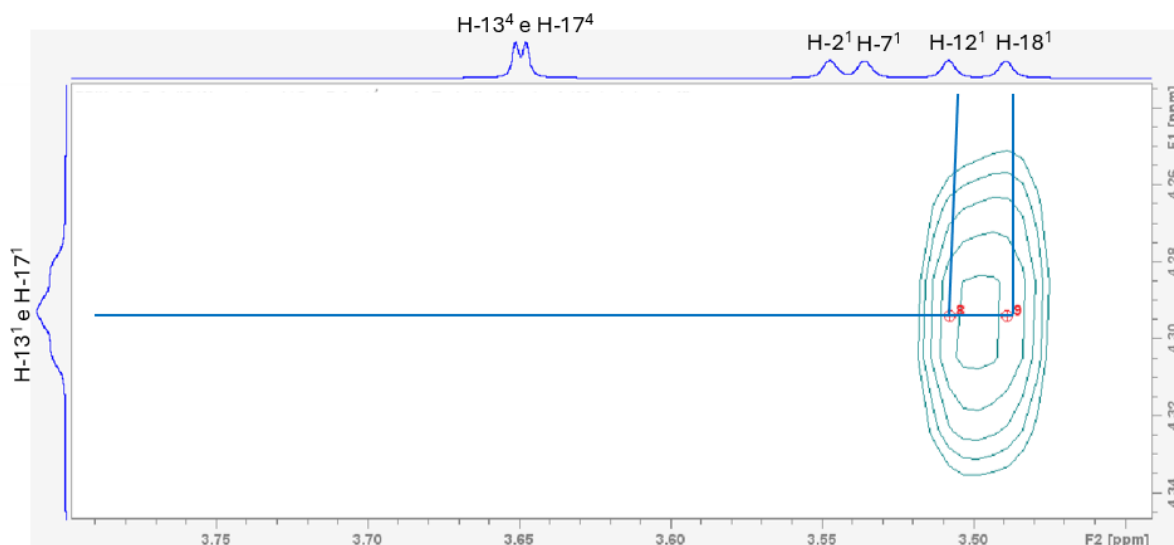


Figura 26 – ^1H - ^1H NOESY (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) da PpIX DME 12 em relação aos metilênicos e metílicos.

As atribuições dos metílicos também foram afetadas pela agregação. Na PpIX DME 12, H-18^1 tornou-se o mais blindado (δ 3,49 ppm), seguido por H-12^1 (δ 3,51 ppm), H-7^1 (δ 3,53 ppm) e H-2^1 (δ 3,54 ppm). Os metoxílicos H-13^4 e H-17^4 foram observados como singletos quase sobrepostos em δ 3,65 ppm, com a distância entre os singletos no valor de 3,4 ppb.

A similaridade entre as posições ainda é observada, mas o aumento da distância entre os singletos deixa evidente os ambientes eletrônicos distintos das metoxilas. Essas posições continuaram não apresentando correlações nos experimentos homonucleares e não puderam ser atribuídos individualmente. As posições H-21 e H-22 foram observados como equivalentes em um singletos em δ – 4,19 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C obtido para a PpIX DME 12 (**Figura 27**), os sinais do macrociclo tetrapirrólico também sofreram alterações devido ao aumento da concentração. Os sinais foram observados com boa definição, permitindo a atribuição completa dos núcleos de ^{13}C .

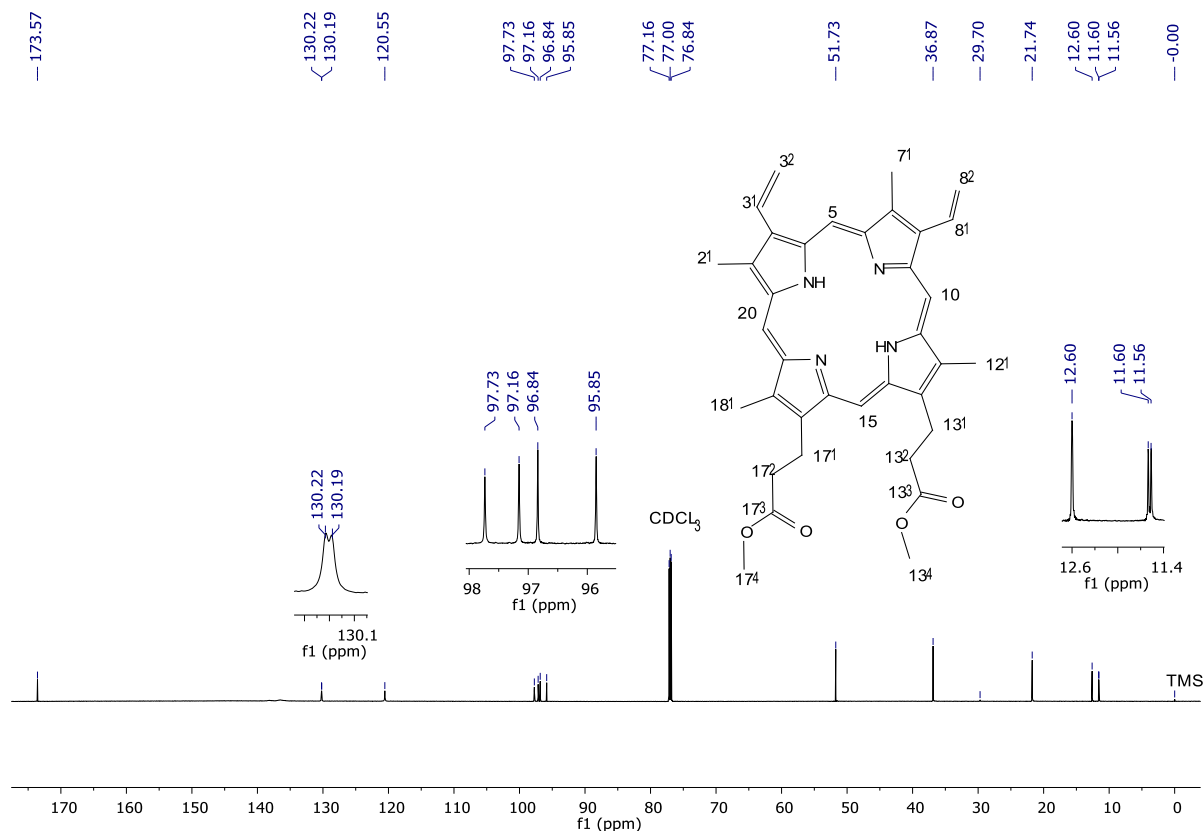


Figura 27 – RMN ^{13}C (CDCl_3 , com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) da PpIX DME 12.

Os carbonílicos C-13³/C-17³ aparecem como equivalentes em δ 173,57 ppm. Os sinais para os vinílicos C-3¹/C-8¹ exibem uma discreta separação em δ 130,20 ppm. Essa divisão sugere uma diferença magnética entre esses núcleos, embora não suficientemente expressiva para resultar em distinção perceptível no espectro de ^1H - ^{13}C HSQC. Os C-3²/C-8² aparecem em um sinal centrado em δ 120,55 ppm.

Os *meso* são visualizados em δ 97,73 ppm para C-10, δ 97,16 ppm para C-5, δ 96,84 ppm para C-15 e δ 95,85 ppm para C-20. Os metoxílicos C-13⁴ e C-17⁴ encontram-se em um sinal centrado em 51,73 ppm. Os metilênicos das cadeias laterais C-13²/C-17² foram identificados em δ 36,87 ppm, enquanto as posições C-13¹/C-17¹ se encontram em δ 21,74 ppm.

Os metílicos C-2¹ e C-7¹ exibem um sinal centrado em δ 12,60 ppm, que apresenta uma singela separação, embora insuficiente para distinguir inequivocamente essas duas posições. Em contrapartida, as metilas C-12¹ e C-18¹ permanecem magneticamente equivalentes, sendo observadas como um único singlete centrado em δ 11,58 ppm.

4.4. AGREGAÇÃO DA PpIX DME EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Com a estrutura caracterizada em baixa ($2,82 \text{ mmol.L}^{-1}$) e alta ($33,8 \text{ mmol.L}^{-1}$) concentração, foi possível acompanhar a evolução espectral da PpIX DME ao longo de doze espectros de RMN ^1H . A **Figura 28** ilustra o δ dos sinais em função da concentração, sendo cada espectro enumerado no eixo da ordenada de 1 a 12, conforme o aumento da concentração amostral.

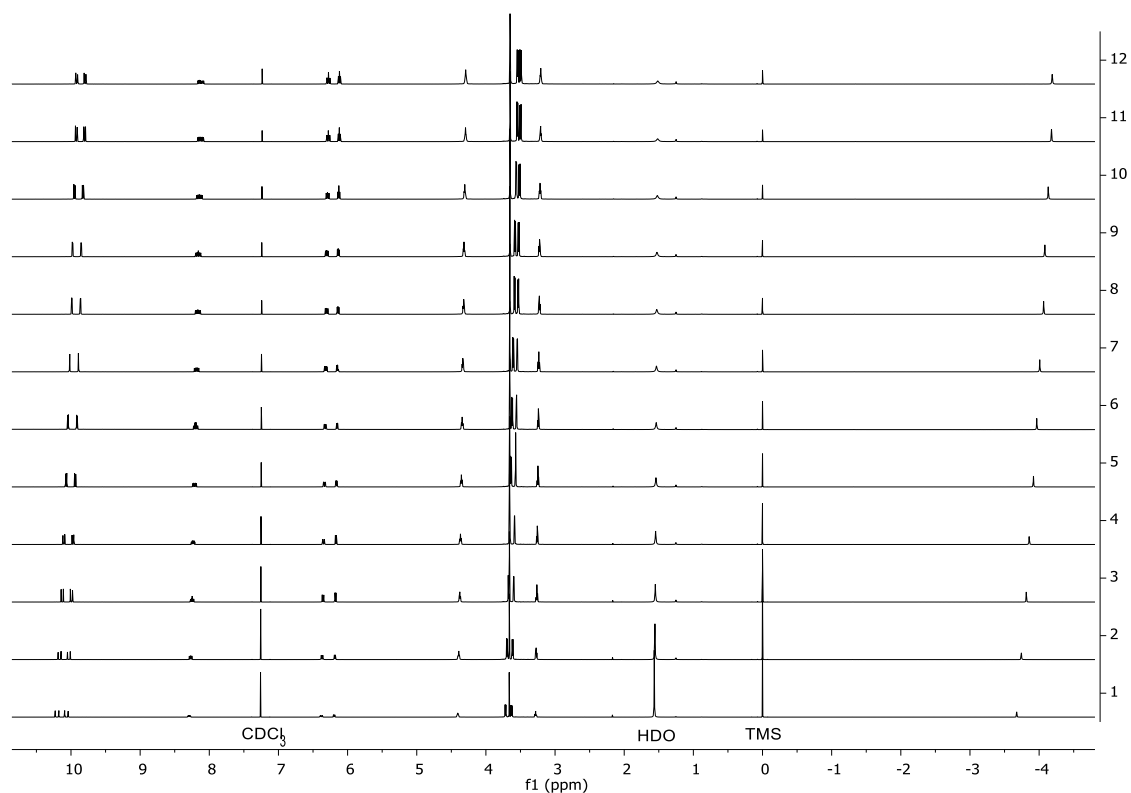


Figura 28 – RMN ^1H (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 800 MHz) das amostras de PpIX DME.

O aumento da concentração da PpIX DME promoveu mudanças significativas no espectro de RMN ^1H das amostras, atribuídas ao processo de agregação da estrutura. De maneira geral, observou-se o deslocamento de todos os sinais para campo mais alto, indicando um aumento na blindagem dos núcleos de ^1H à medida que a concentração da amostra foi elevada. Para quantificar essas variações, os δ de cada sinal foram organizados na **Tabela 1**, levando em consideração os doze espectros examinados. Esses dados foram usados para calcular a variações de deslocamento químico ($\Delta\delta$) entre os extremos.

Tabela 1 – Deslocamentos químicos de RMN ^1H (ppm) da PpIX DME em diferentes concentrações, em CDCl_3 a 25 °C.

Grupo	Posição	PplX DME 1	PplX DME 2	PplX DME 3	PplX DME 4	PplX DME 5	PplX DME 6	PplX DME 7	PplX DME 8	PplX DME 9	PplX DME 10	PplX DME 11	PplX DME 12	Δδ
Meso	H-5	10,23	10,19	10,14	10,12	10,08	10,05	10,02	9,98	9,97	9,94	9,91	9,90	0,33
	H-10	10,18	10,14	10,11	10,09	10,06	10,04	10,02	9,99	9,98	9,96	9,94	9,93	0,25
	H-15	10,04	10,01	10,01	9,96	9,93	9,91	9,89	9,87	9,86	9,84	9,81	9,81	0,23
	H-20	10,09	10,05	9,98	9,98	9,95	9,92	9,89	9,86	9,85	9,82	9,79	9,78	0,31
Vinílicos	H-3 ¹	8,29	8,27	8,25	8,23	8,21	8,20	8,18	8,16	8,16	8,12	8,10	8,10	0,19
	H-8 ¹	8,29	8,27	8,25	8,23	8,21	8,20	8,18	8,16	8,16	8,16	8,15	8,15	0,14
	H-3 ^{2B}	6,38	6,37	6,36	6,35	6,33	6,32	6,32	6,30	6,30	6,29	6,28	6,28	0,10
	H-8 ^{2B}													
	H-3 ^{2α}	6,19	6,19	6,17	6,17	6,16	6,15	6,15	6,14	6,13	6,13	6,12	6,12	0,07
	H-8 ^{2α}													
Metilênicos	H-13 ¹													
	H-17 ¹	4,41	4,39	4,38	4,37	4,35	4,34	4,33	4,32	4,32	4,31	4,30	4,29	0,12
	H-13 ²													
	H-17 ²	3,28	3,27	3,26	3,26	3,25	3,24	3,23	3,23	3,22	3,22	3,21	3,21	0,07
Metílicos	H-2 ¹	3,72	3,70	3,68	3,66	3,64	3,63	3,61	3,59	3,58	3,57	3,55	3,55	0,17
	H-7 ¹	3,71	3,69	3,67	3,65	3,63	3,61	3,60	3,58	3,57	3,56	3,54	3,54	0,17
	H-12 ¹	3,62	3,61	3,59	3,58	3,57	3,56	3,55	3,54	3,53	3,52	3,51	3,51	0,11
	H-18 ¹	3,64	3,62	3,60	3,59	3,57	3,56	3,54	3,53	3,52	3,51	3,49	3,49	0,15
Metoxílicos	H-13 ⁴	3,66	3,66	3,66	3,66	3,66	3,66	3,66	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65	0,01
	H-17 ⁴	3,66	3,66	3,66	3,66	3,66	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65	3,65	
Internos	H-21													
	H-22	-3,68	-3,74	-3,81	-3,86	-3,92	-3,97	-4,01	-4,07	-4,08	-4,13	-4,18	-4,19	0,51

Os internos H-21 e H-22 foram os mais afetados pelo aumento da concentração, apresentando o maior deslocamento para campo alto, com $\Delta\delta = 0,51$ ppm. Esse comportamento indica um aumento significativo da blindagem magnética desses núcleos, consistente com a formação de agregados supramoleculares, nos quais as posições internas passam a experimentar um ambiente eletrônico altamente blindado devido à sobreposição dos anéis porfirínicos.

Os *meso* também apresentaram deslocamentos para campo alto. As $\Delta\delta$ observadas foram de 0,33 ppm para H-5, 0,25 ppm para H-10, 0,23 ppm para H-15 e 0,31 ppm para H-20. Além da magnitude do deslocamento, foi observada a permutação da ordem relativa dos sinais ao longo da série espectral. Para melhor visualização desse fenômeno, as atribuições correspondentes aos espectros extremos foram utilizadas como referência, e as posições foram conectadas por linhas tracejadas, conforme apresentado na **Figura 29**.

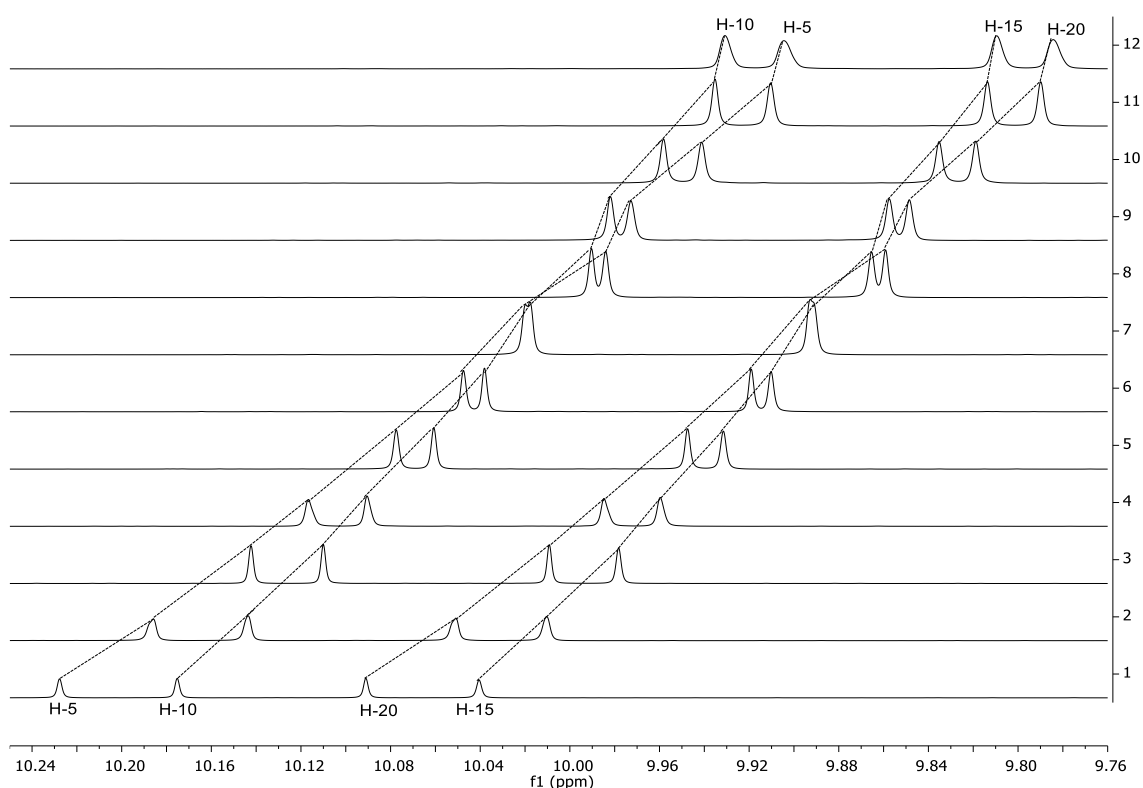


Figura 29 – Alterações dos deslocamentos químicos de ^1H do PpIX DME em relação aos *meso* em CDCl_3 a 25°C em função da concentração.

Os metílicos também tiveram a permutação dos sinais ao longo da série de espectros de RNM ^1H (**Figura 30**) em decorrência da influência da agregação, embora

em menor intensidade quando comparados aos *meso*. Os metílicos mais próximos às posições *meso*, H-2¹ e H-7¹, apresentaram $\Delta\delta = 0,18$ ppm, enquanto aqueles mais distantes do núcleo porfirínico e próximos à cadeia propanoato, H-12¹ e H-18¹, foram menos afetados, com $\Delta\delta = 0,15$ e $0,11$ ppm, respectivamente.

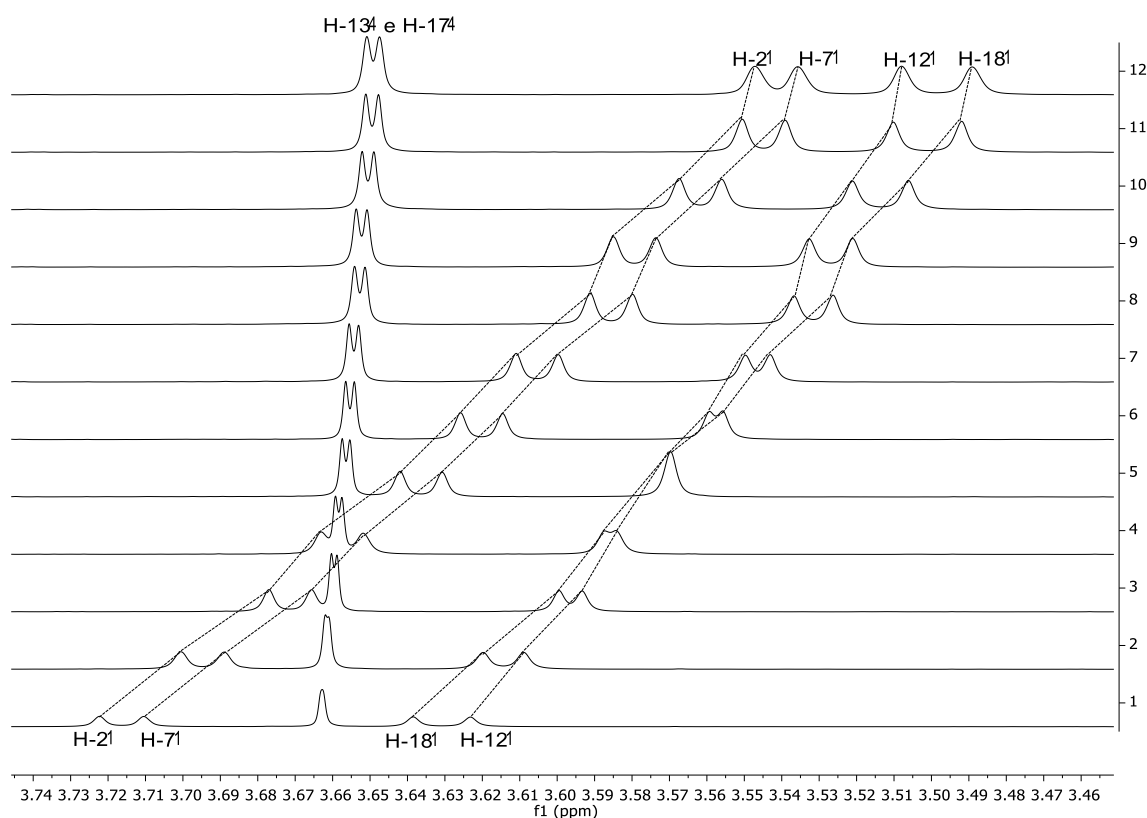


Figura 30 – Alterações dos deslocamentos químicos de ^1H do PpIX DME em relação aos metílicos em CDCl_3 a 25°C em função da concentração.

Adicionalmente, observou-se que os sinais correspondentes às metoxilas H-13⁴ e H-17⁴ tornam-se progressivamente mais separados com o aumento da concentração, em que a $\Delta\delta$ é de $0,01$ ppm. Essa separação crescente é consequência da formação dos agregados, em que os ambientes magnéticos dessas posições se tornam cada vez mais distintos em função da formação supramolecular.

De maneira análoga, foram avaliadas as alterações nos δ dos núcleos de ^{13}C por meio da análise dos espectros de RMN ^{13}C . A **Figura 31** ilustra os dois espectros em modo empilhado, sendo cada espectro enumerado no eixo da ordenada, conforme o aumento da concentração amostral.

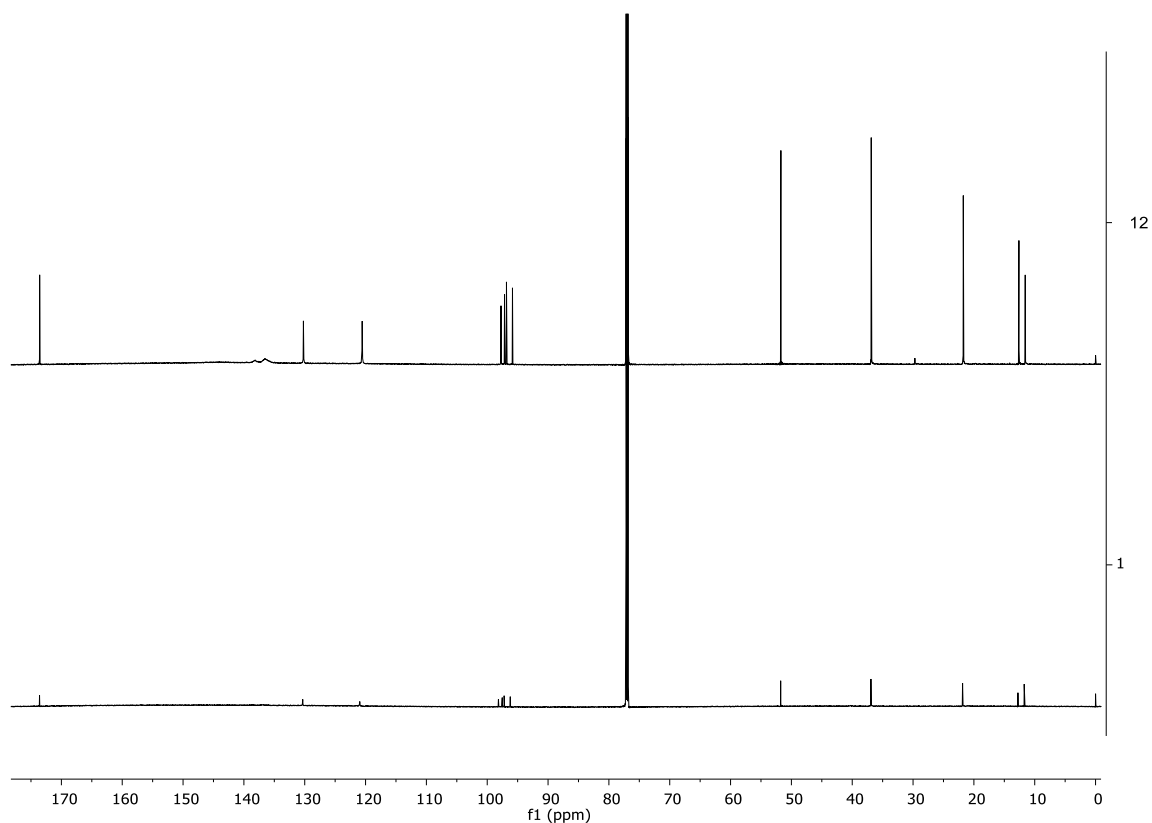


Figura 31 – RMN ^{13}C (CDCl_3 com 0,05% v/v TMS, 201 MHz) das amostras de PpIX DME.

As atribuições e $\Delta\delta$ observadas estão reunidas na **Tabela 2**. Diferentemente do observado para o núcleo de ^1H , o efeito da agregação manifesta-se de forma menos pronunciada nos espectros de RMN ^{13}C .

Tabela 2 – Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (ppm) da PpIX DME em diferentes concentrações, em CDCl_3 a 25 °C.

Grupo	Posição	PpIX DME 1	PpIX DME 12	$\Delta\delta$
Carbonílicos	C-13 ³	173,6	173,6	0,00
	C-17 ³			
Vinílicos	C-3 ¹	130,3	130,2	0,10
	C-8 ¹			
	C-3 ²	120,9	120,5	0,40
	C-8 ²			
<i>Meso</i>	C-5	98,2	97,2	1,00
	C-10	97,5	97,7	-0,20
	C-15	96,2	96,8	-0,60
	C-20	97,2	95,8	1,40
Metoxílicos	C-13 ⁴	51,8	51,7	0,10
	C-17 ⁴			

Metilênicos	C-13 ²			
	C-17 ²	36,9	36,9	0,00
	C-13 ¹			
	C-17 ¹	21,9	21,7	0,20
Metílicos	C-2 ¹			
	C-7 ¹	12,8	12,6	0,20
	C-12 ¹			
	C-18 ¹	11,7	11,6	0,10

Algumas posições, como os carbonílicos, C-13³ e C-17³, e os metilênicos, C-13² e C-17², não apresentaram variação ($\Delta\delta = 0$), indicando menor sensibilidade desses núcleos às interações intermoleculares e intramoleculares envolvidas no processo de agregação.

Em contraste, os *meso* apresentam um comportamento interessante, caracterizado pela permutação dos sinais e por deslocamentos tanto para campo alto quanto para campo baixo. Os valores de $\Delta\delta$ observados foram de 1,00 ppm para o C-5, -0,20 ppm para C-10, -0,60 ppm para C-15 e 1,30 ppm para C-20. A **Figura 32** apresenta um recorte dos espectros correspondente a essas regiões, comparando os extremos.

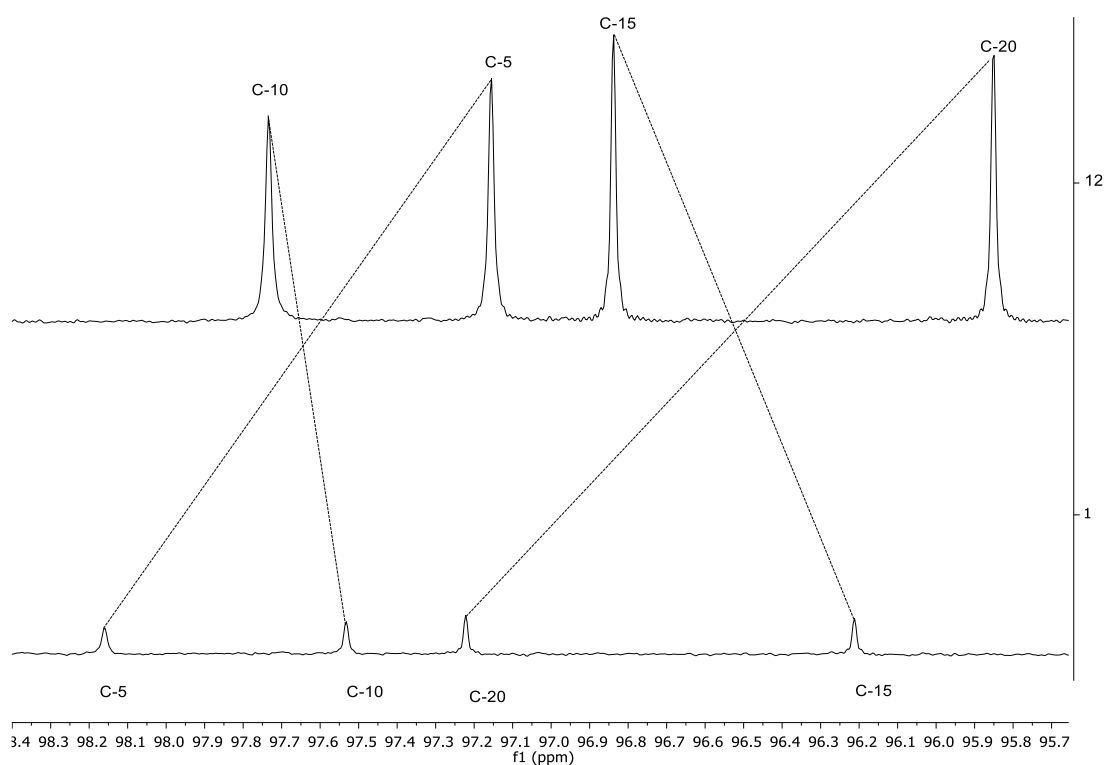


Figura 32 – Alterações dos deslocamentos químicos de ¹³C do PpIX DME em relação aos *meso* em CDCl₃ a 25 °C em função da concentração.

Esses resultados evidenciam que, enquanto algumas posições experimentam aumento de blindagem pela proximidade das moléculas, outras sofrem desblindagem pelo afastamento de certos pontos de contato, implicando em alterações anisotrópicas no ambiente eletrônico devido ao arranjo geométrico do empilhamento das unidades porfirínicas.

5. DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE COMPARATIVA DA PpIX DME 1 COM OS DADOS DA LITERATURA

A comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho e aqueles previamente descritos na literatura evidencia diferenças significativas tanto nos valores de δ quanto na ordem de atribuição dos ^1H e ^{13}C da PpIX DME. Essas diferenças são devido a metodologia adotada, incluindo concentração da amostra, frequência do espectrômetro e os experimentos de RMN empregados para realizar as atribuições.

No estudo clássico de Janson; Katz (1972), a análise da PpIX DME foi realizada exclusivamente por meio da técnica unidimensional de RMN ^1H a 220 MHz, utilizando inicialmente uma concentração inicial de $13,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Os autores afirmam que praticamente todas as espécies de ^1H poderiam ser facilmente resolvidas sem o emprego de solventes especiais.

Entretanto, a comparação direta entre as atribuições propostas no estudo clássico e aquelas obtidas no presente trabalho revela diferenças significativas, indicando que a interpretação baseada unicamente em dados unidimensionais apresenta limitações quando aplicada a um sistema macrocíclico complexo como a PpIX DME.

No presente trabalho, a utilização combinada das técnicas bidimensionais ^1H – ^1H COSY e ^1H – ^1H NOESY permitiu a realização de atribuições inequívocas para os diferentes conjuntos de ^1H , reduzindo significativamente a ambiguidade associada à sobreposição de sinais. Esse avanço metodológico confere maior solidez às atribuições estruturais propostas, possibilitando uma comparação mais criteriosa e fundamentada com os dados clássicos da literatura.

A análise dos *meso* evidencia diferenças sistemáticas entre os estudos. Janson; Katz (1972) reportaram a sequência H-5 (δ 9,96 ppm), H-10 (δ 9,95 ppm), H-15 (δ 9,83 ppm) e H-20 (δ 9,82 ppm). No presente estudo, esses ^1H foram observados sistematicamente em campo mais baixo, com $\Delta\delta = 0,27$ ppm para H-5, 0,23 ppm para H-10, 0,21 ppm para H-15 e 0,27 ppm para H-20 em relação com o estudo clássico. Esse comportamento sugere uma contribuição mais pronunciada de efeitos anisotrópicos associados à corrente de anel do macrociclo, cuja detecção é favorecida tanto pela maior frequência instrumental (800 MHz) quanto pela maior

resolução espectral. Assim, embora a ordem relativa dos sinais esteja parcialmente em concordância, os valores de δ refletem diferenças significativas na descrição do ambiente eletrônico desses prótons.

Em relação aos ^1H vinílicos, Janson; Katz (1972) afirmam que poderiam ser facilmente distinguidos, por constituírem um sistema AMX de primeira ordem que permitiria a determinação direta das J . A análise detalhada do presente estudo demonstra que a situação é mais complexa do que a sugerida pelos autores. No trabalho clássico, os vinílicos foram atribuídos às posições H-3¹ (δ 8,10 ppm) e H-8¹ (δ 8,14 ppm). Porém, com a interpretação do ^1H - ^1H NOESY, a ordem da atribuição é inversa. As $\Delta\delta$ entre os dados aqui obtidos e os clássicos são de 0,19 ppm para H-3¹ e 0,15 ppm para H-8¹, indicando que os valores reportados por Janson; Katz (1972) se encontram sistematicamente deslocados para campo mais alto.

Para os vinílicos em cis e em trans, correspondentes às posições H-3² e H-8², observa-se uma concordância entre os estudos. Janson; Katz (1972) reportaram as posições trans em δ 6,26 ppm (J = 17,9 Hz) e as posições cis em δ 6,09 ppm (J = 11,1 Hz). No presente trabalho, embora as constantes de acoplamento sejam compatíveis, os valores de δ apresentam deslocamentos para campo mais baixo, com $\Delta\delta$ = 0,12 ppm (trans) e 0,10 ppm (cis). Esses resultados indicam que, apesar da preservação do padrão de acoplamento, o ambiente eletrônico desses prótons é descrito de forma mais sensível nas condições experimentais atuais.

A comparação das atribuições dos ^1H metilênicos também revela boa concordância estrutural entre os estudos. Janson; Katz (1972) identificaram os sinais de H-13¹/H-17¹ como os mais desblindados e os de H-13²/H-17² como os mais blindados desse grupo. Todavia, os valores de δ reportados no estudo clássico, δ 4,27 ppm para H-13¹/H-17¹ e δ 3,16 ppm para H-13²/H-17², encontram-se novamente deslocados para campo mais alto em relação aos valores determinados no presente trabalho, com $\Delta\delta$ = 0,14 ppm e 0,12 ppm, respectivamente.

Diferenças mais expressivas são observadas na atribuição dos ^1H metílicos. Janson; Katz (1972) reportaram a sequência H-2¹/H-7¹ (δ 3,48 ppm), H-12¹ (δ 3,54 ppm) e H-18¹ (δ 3,55 ppm). A frequência instrumental de 220 MHz não permitiu a separação adequada desses sinais, resultando em singletos parcialmente sobrepostos para as posições H-2¹ e H-7¹. No presente estudo, a maior resolução espectral possibilitou distinguir esses ambientes, evidenciando que todos os valores reportados no estudo clássico estão deslocados para campo mais alto, com $\Delta\delta$ = 0,24

ppm para a posição H-2¹, 0,23 ppm para o H-7¹, 0,08 ppm para o H-12¹ e 0,09 ppm para o H-18¹. Esses resultados indicam que as atribuições anteriores estavam limitadas pela sobreposição espectral.

As metoxilas, correspondente às posições H-13⁴ e H-17⁴, foi descrito por Janson; Katz (1972) como equivalente, apresentando um único sinal em δ 3,59 ppm. No presente trabalho, observa-se uma $\Delta\delta$ = 0,07 ppm em relação a esse valor, além da identificação de ambientes magnéticos distintos para essas posições. Esse resultado destaca que a maior frequência magnética aplicada permite detectar assimetrias sutis no sistema, não relatadas no estudo clássico.

Para os ¹H internos do macrociclo, posições H-21 e H-22, Janson; Katz (1972) reportaram um sinal em δ -4,08 ppm, com $\Delta\delta$ de 0,40 ppm para campo mais alto em relação ao observado no presente trabalho. Esse deslocamento acentuado reforça a sensibilidade desses prótons às condições experimentais e ao ambiente magnético do macrociclo.

No que se refere aos dados de ¹³C, os resultados obtidos foram comparados com o estudo de Abraham *et al.* (1979), que investigaram uma estrutura relacionada à PpIX DME coordenada a zinco, em concentração de 95,0 mmol.L⁻¹. Interessante notar que os autores escolheram realizar experimentos de desagregação dos núcleos para que assim pudessem tentar correlacionar os sinais com o espectro de RMN ¹H. Atualmente, essa abordagem é realizada de forma mais direta por meio do experimento bidimensional ¹H-¹³C HSQC, embora esse experimento permita a observação apenas de ¹³C não quaternários, uma vez que a detecção ocorre via relaxamento dos ¹H.

Inicialmente foi comparado a posição das carbonilas, posições C-13³ e C-17³, estando em concordância com o reportado previamente por Abraham *et al.* (1979), que descreve o mesmo sinal em δ 173,60 ppm. A $\Delta\delta$ observada em relação ao presente trabalho é mínima, no valor de 0,01 ppm, indicando boa reprodutibilidade.

Para os vinílicos, posições C-3¹ e C-8¹, a comparação direta é limitada, uma vez que Abraham *et al.* (1979) não apresentaram atribuições específicas, restringindo-se à descrição dos sinais de =CH- (130,00 e 129,58 ppm) e =CH₂- (118,07 e 117,78 ppm). No presente estudo, essa limitação é contornada mediante a obtenção de correlações diretas entre ¹H e ¹³C pelo experimento ¹H-¹³C HSQC, o que permite a proposição de atribuições inequívocas.

A ordem grupo das posições *meso* observada no presente trabalho está em concordância com a literatura. Abraham *et al.* (1979) registraram o δ de 95,91 ppm para C-5 e C-10; δ 95,59 ppm para C-20; e δ 94,60 ppm para C-15. As $\Delta\delta$ com presente trabalho de 2,25 ppm para C-5, 1,62 ppm para C-10, 1,61 ppm para C-15 e 1,63 ppm para C-20, refletem as diferenças metodológicas, especialmente a baixa frequência do espectrômetro de 25,2 MHz empregado no estudo clássico. Em contraste, o espectro obtido a 201 MHz permitiu a separação completa dos quatro sinais *meso*, resultando em maior precisão nas atribuições.

Os metoxílicos, posições C-13⁴ e C-17⁴, foram reportados por Abraham *et al.* (1979) em δ 51,49 ppm, apresentando uma $\Delta\delta = 0,27$ ppm em direção a campo mais alto quando comparados aos dados do presente estudo. Apesar dessa variação, a atribuição é consistente entre os trabalhos.

Para os metilênicos, posições C-13¹, C-13², C-17¹ e C-17², Abraham *et al.* (1979) não estabeleceram atribuições específicas, limitando-se à observação de dois sinais em δ 36,68 e 21,30 ppm. O presente trabalho avança na análise da caracterização da PpIX DME ao realizar as atribuições dos sinais de forma inequívoca, evidenciando a limitação do estudo clássico.

As posições metílicas, C-2¹, C-7¹, C-12¹ e C-18¹, foram relatados por Abraham *et al.* (1979) como quatro singletos distintos em δ 11,93; 11,66; 11,11; e 10,96 ppm, mas sem atribuição específica. No presente trabalho, embora os sinais tenham se apresentado como dois conjuntos sobrepostos, foi possível determinar a atribuição das posições por meio da técnica bidimensional ¹H–¹³C HSQC. Dessa forma, mesmo sem separação completa dos sinais de ¹³C, as atribuições propostas mostram-se mais consistentes e fundamentadas do que aquelas disponíveis na literatura clássica.

5.2. ANÁLISE COMPARATIVA DA PpIX DME 12 COM OS DADOS DA LITERATURA

O estudo clássico de Janson; Katz (1972) também investigou a influência da concentração sobre o perfil espectral da PpIX DME por RMN ¹H, registrando espectros em diferentes concentrações, sendo a mais elevada de 76,0 mmol.L⁻¹. No presente trabalho, os experimentos foram conduzidos até a concentração de 33,8 mmol.L⁻¹. Embora inferior àquela empregada no estudo clássico, essa concentração é suficientemente elevada para favorecer a formação de espécies agregadas,

permitindo uma comparação direta dos efeitos da agregação sobre os δ e a ordem de atribuição dos sinais.

Para os *meso*, Janson; Katz (1972) reportaram a sequência H-10 (δ 9,67 ppm), H-5 (δ 9,58 ppm), H-20 (δ 9,54 ppm) e H-15 (δ 9,47 ppm), mesma ordem de atribuição obtida aqui pela interpretação do ^1H - ^1H NOESY. No entanto, no presente estudo, todos esses sinais são observados sistematicamente em campo mais baixo, com $\Delta\delta$ = 0,32 ppm (H-5), 0,26 ppm (H-10), 0,34 ppm (H-15) e 0,24 ppm (H-20). Esses deslocamentos refletem um aumento da blindagem, compatível com modificações no campo magnético local associadas à agregação, que intensifica os efeitos anisotrópicos do sistema π conjugado do macrociclo.

Comportamento semelhante é observado para os vinílicos H-3¹ e H-8¹. No estudo clássico, esses sinais foram reportados em δ 7,87 ppm (H-3¹) e δ 7,95 ppm (H-8¹), mesma ordem de atribuição obtida pela interpretação do ^1H - ^1H NOESY. No presente trabalho, ambos se encontram deslocados para campo mais baixo, apresentando $\Delta\delta$ = 0,23 ppm e 0,20 ppm, respectivamente. Esses deslocamentos reforçam a influência da agregação sobre o ambiente eletrônico das cadeias vinílicas, indicando maior contribuição anisotrópica.

Em relação aos vinílicos *cis* (H-3^{2 α} e H-8^{2 α}) e *trans* (H-3^{2 β} e H-8^{2 β}), Janson; Katz (1972) reportaram H-3^{2 α} (δ 5,96 ppm), H-3^{2 β} (δ 6,09 ppm), H-8^{2 α} (δ 6,00 ppm) e H-8^{2 β} (δ 6,14 ppm). No presente estudo, observa-se boa concordância na atribuição, porém sendo identificados como conjuntos: H-3^{2 α} /H-8^{2 α} e H-3^{2 β} /H-8^{2 β} . Os sinais no presente estudo se encontram deslocados para campo mais baixo, com $\Delta\delta$ = 0,16 ppm (H-3^{2 α}), 0,19 ppm (H-3^{2 β}), 0,12 ppm (H-8^{2 α}) e 0,14 ppm (H-8^{2 β}). Esses deslocamentos são consistentes com alterações na geometria relativa e no empilhamento das cadeias vinílicas em função da agregação, afetando diretamente os campos locais experimentados por esses ^1H .

Para os metilênicos das cadeias propiônicas, Janson; Katz (1972) reportaram valores individualizados para H-13¹ (δ 4,13 ppm), H-13² (δ 3,08 ppm), H-17¹ (δ 4,12 ppm) e H-17² (δ 3,07 ppm). No presente trabalho, esses sinais são observados como conjuntos sobrepostos, H-13¹/H-17¹ e H-13²/H-17², em regiões distintas, sistematicamente deslocados para campo mais baixo. As $\Delta\delta$ = 0,16 ppm para H-13¹, 0,13 ppm para H-13², 0,16 para H-17¹ e 0,14 para H-17² indicam que a agregação influencia de maneira diferenciada os ^1H mais próximos ao núcleo macrocíclico em

relação àqueles mais externos, refletindo gradientes de anisotropia ao longo das cadeias laterais.

Os metílicos H-2¹, H-7¹, H-12¹/H-18¹ foram reportados por Janson; Katz (1972) em δ 3,29; 3,33; e 3,34 ppm, respectivamente. A frequência instrumental de 220 MHz não permitiu a separação adequada desses sinais, resultando em singletos parcialmente sobrepostos para as posições H-12¹ e H-18¹. No presente estudo, a maior resolução espectral possibilitou distinguir esses ambientes, evidenciando que todos os valores reportados no presente estudo se encontram deslocados para campo mais baixo, com $\Delta\delta$ = 0,26 ppm (H-2¹), 0,21 ppm (H-7¹), 0,17 ppm (H-12¹) e 0,15 ppm (H-18¹). Esse comportamento é compatível com o aumento da desblindagem induzida pela agregação, particularmente relevante para os metílicos próximos ao plano do macrociclo, posições H-2¹ e H-7¹, onde os efeitos anisotrópicos são mais pronunciados.

Para as metoxilas, Janson; Katz (1972) relataram valores próximos, em δ 3,57 ppm (H-13⁴) e δ 3,56 ppm (H-17⁴). No presente trabalho, esses sinais não foram atribuídos individualmente, pois essas posições não apresentaram correlações nos experimentos homonucleares. Além disso, neste trabalho são observados deslocados para campo mais baixo quando comparado ao estudo clássico. As $\Delta\delta$ foram de 0,08 ppm para a posição H-13⁴ e 0,09 ppm para a posição H-17⁴. Essa diferenciação observada reforça que a agregação afeta de forma sutil, mas mensurável, os ambientes magnéticos da metoxilas, possivelmente em função de orientações distintas das cadeias éster no agregado.

Por fim, os ¹H internos do macrociclo, posições H-21 e H-22 foram reportados por Janson; Katz (1972) em δ -4,67 ppm. No presente estudo, esse conjunto aparece deslocado para campo mais baixo, resultando em um $\Delta\delta$ = 0,48 ppm com o estudo clássico. Apesar das diferenças de concentração e de frequência instrumental, ambos os estudos convergem ao demonstrar que esses núcleos permanecem fortemente blindados, característica intrínseca do efeito anisotrópico do anel tetrapirrólico, que pode ser intensificado em sistemas agregados.

De forma geral, a comparação quantitativa dos δ obtidos neste trabalho com os dados clássicos evidencia que, mesmo em concentrações inferiores às utilizadas por Janson; Katz (1972), os efeitos da agregação já se manifestam de maneira clara no espectro de RMN ¹H da PpIX DME. Os deslocamentos sistemáticos para campo mais baixo observados em diferentes conjuntos de ¹H indicam modificações no

campo magnético local, associadas à organização supramolecular e ao reforço dos efeitos anisotrópicos do sistema π conjugado.

Importante destacar que, até onde se pôde verificar na literatura, não há estudos que investiguem de forma sistemática as variações do espectro de RMN ^{13}C em função da concentração para a PpIX DME ou para moléculas estruturalmente relacionadas. A maioria dos trabalhos disponíveis limita-se à atribuição dos sinais de ^{13}C sob condições experimentais específicas, sem explorar de maneira direta os efeitos da concentração e, conseqüentemente, da agregação sobre o ambiente magnético desses núcleos. Nesse contexto, os dados aqui apresentados constituem uma contribuição relevante, ampliando a compreensão dos efeitos da agregação sobre os δ dos ^{13}C do macrociclo.

5.3. ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO DA PpIX DME EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

As alterações observadas nos δ da PpIX DME em função da concentração indicam a formação de espécies agregadas em solução, cuja organização supramolecular influencia de maneira distinta os diferentes núcleos da molécula. As posições para os internos H-21, H-22, os *meso* H-5 e H-20, assim como os *meso* C-5 e C-20, são os que mais tem $\Delta\delta$. Isto indica que as posições no centro do macrociclo são mais sensíveis às modificações no ambiente magnético induzidas pela proximidade entre moléculas vizinhas. Tal comportamento está de acordo com a formação de dímeros e oligômeros da PpIX DME ocorre preferencialmente pelo arranjo tipo J ou T (Hunter; Sanders, 1990; Abraham *et al.*, 1979).

A permutação da ordem relativa dos δ observada para as posições *meso* C-10 e C-15, indica que a agregação não ocorre de forma perfeitamente simétrica. O deslocamento para campo baixo dessas posições implica na presença de um ângulo de inclinação entre as unidades porfirínicas no estado agregado, eliminando a possibilidade de arranjo perfeitamente tipo J ou T, mas sugerindo uma mistura entre esses dois arranjos.

A análise conjunta dos dados indica ainda que a perturbação eletrônica associada à agregação se propaga de forma mais intensa nas regiões próximas ao centro da estrutura, atenuando-se gradualmente à medida que aumenta a distância estrutural. Isto é evidente ao observar o comportamento espectroscópico dos ^1H

metílicos e metoxílicos. Os ^1H metílicos localizados mais próximos ao anel porfirínico, especificamente as posições H-2¹ e H-7¹, apresentam $\Delta\delta$ mais pronunciadas. Essa maior sensibilidade pode ser associada à proximidade dessas posições os grupos vinílicos, que contribuem para a deslocalização eletrônica no macrociclo.

Em contraste, os ^1H metoxílicos, posições H-13⁴ e H-17⁴, localizados na periferia da molécula, exibem $\Delta\delta$ muito discretas no valor de 0,01 ppm, indicando menor influência das interações intermoleculares nessas posições. Além da magnitude, os grupos metoxílicos fornecem informações adicionais sobre a organização supramolecular do sistema. O aumento progressivo da separação entre os singletos atribuídos a essas posições ao longo da série de concentrações sugere a repulsão entre essas cadeias laterais. Esse comportamento é coerente com observações descritas em estudos cristalográficos da PpIX DME por difração de raios X (Caughey; Ibers, 1977) e revela mais um indicativo da existência de um ângulo de inclinação entre as moléculas no estado agregado.

No que se refere aos espectros de RMN ^{13}C , observa-se que as $\Delta\delta$ são, em geral, menos pronunciadas quando comparadas às do RMN ^1H . Esse comportamento diferente pode estar relacionado à menor sensibilidade intrínseca do núcleo de ^{13}C às variações locais do campo magnético, bem como às diferenças nos tempos de relaxamento nuclear. Conforme Silverstein, Webster e Kiemle (2005), tempos de relaxamento mais longos podem tornar os núcleos de ^{13}C menos propensos a perturbações supramoleculares, oferecendo uma resposta plausível para a menor magnitude das $\Delta\delta$ observadas.

De forma integrada, as $\Delta\delta$ mais acentuadas para campo alto foram observadas para os C-20, C-5, H-21, H-22, H-5, H-20, H-3¹, H-2¹ e H-7¹, indicando que essas regiões correspondem aos pontos de maior proximidade intermolecular e, conseqüentemente, desempenham papel relevante na estabilização do estado agregado. Esses resultados não apenas corroboram relatos prévios da literatura, como também permitem identificar, com maior precisão, as regiões estruturais da PpIX DME mais sensíveis ao processo de agregação em solução.

Em conjunto, os dados espectroscópicos obtidos permitem descrever a agregação da PpIX DME como um processo dependente da concentração, no qual as interações entre os macrociclos são dependentes dos pontos de contato entre as moléculas. A compreensão detalhada desse comportamento espectroscópico é relevante para áreas aplicadas, como a terapia fotodinâmica e os sistemas de

conversão de energia, nas quais a caracterização estrutural e o controle da agregação influencia diretamente a eficiência dos processos fotofísicos e fotoquímicos. Assim, os resultados aqui apresentados estabelecem uma base sólida para futuras investigações de macrociclos tetrapirrólicos e derivados.

6. CONCLUSÃO

A análise detalhada dos dados espectroscópicos de RMN apresentada neste trabalho permitiu o refinamento significativo das atribuições dos núcleos de ^1H e ^{13}C do PpIX DME, superando a ambiguidade observada em atribuições previamente reportadas na literatura. A integração sistemática de deslocamentos químicos, multiplicidades e correlações obtidas por técnicas bidimensionais modernas forneceu um conjunto de evidências experimentais, resultando em uma caracterização estrutural mais precisa e confiável da molécula em solução.

As variações observadas nos espectros de ^1H mostraram-se influenciadas pelo fenômeno de anisotropia diamagnética associado ao sistema aromático, tornando esses núcleos particularmente sensíveis às alterações espaciais e eletrônicas decorrentes do processo de agregação. Em contraste, os deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C apresentaram menor contribuição dos efeitos anisotrópicos, sendo predominantemente regidos por efeitos de polarização de cargas e redistribuição eletrônica ao longo do macrociclo.

A partir da análise conjunta dos dados de ^1H e ^{13}C , os resultados obtidos são compatíveis com a formação de agregados que não correspondem estritamente a uma geometria idealizada do tipo J ou T. As evidências espectrais indicam que o estado agregado do PpIX DME em solução é mais bem descrito como um arranjo híbrido ou distorcido entre essas duas organizações clássicas, envolvendo inclinação relativa entre macrociclos. Essa observação reforça a complexidade das interações supramoleculares envolvidas e destaca a sensibilidade da RMN na elucidação dessas estruturas.

Dessa forma, este trabalho constitui uma contribuição relevante para a caracterização estrutural e supramolecular da PpIX DME, oferecendo um conjunto de atribuições precisas e uma interpretação consistente de seu comportamento agregado em solução. No contexto da engenharia biomédica, os dados e a abordagem metodológica empregados podem servir como referência para outros sistemas aromáticos suscetíveis à agregação e suporte ao desenvolvimento de estruturas porfirínicas similares para aplicação na PDT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R.J.; Fell, S.C.M.; Pearson, H.; Smith, K.M. The nmr spectra of porphyrins—15: Self-aggregation in zinc(II) protoporphyrin-IX dimethyl ester. **Tetrahedron**, v. 35, n.14, p.1759-1766, 1979. DOI: 10.1016/0040-4020(79)88005-9

Agnez-Lima, L.F.; Melo, J.T.A.; Silva, A.E.; Oliveira, A.H.S.; Timoteo, A.R.S.; Lima-Bessa, K.M.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Mascio, P.D.; Galhardo, R.S.; Menck, C.F.M. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.75, n.1, p.15-28, 2012. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.12.005

Baroncini, M.; Bergamini, G.; Ceroni, P. Rigidification or interaction-induced phosphorescence of organic molecules. **Chemical Communications**, v.53, n.13, p.2081-2093, 2017. DOI: 10.1039/C6CC09288H

Bartusik-Aebisher, D.; Osuchowski, M.; Adamczyk, M.; Stopa, J.; Ciešlar, G.; Kawczyk-Krupka, A.; Aebisher, D. Advancements in photodynamic therapy of esophageal cancer. **Frontiers in Oncology**, v.12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.1024576

Battogtokh, G.; Ko, Y.T. Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.13, n.2, p.733-743, 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2016.10.014

Boscencu, R.; Radulea, N.; Manda, G.; Machado, I.F.; Socoteanu, R.P.; Lupuliasa, D.; Burloiu, A.M.; Mihai, D.P.; Ferreira, L.F.V. Porphyrin Macrocycles: General Properties and Theranostic Potential. **Molecules**, v.28, n.3, p.1149, 2023. DOI: 10.3390/molecules28031149

Bruice, P. Y. Substâncias carboniladas I – substituição nucleofílica acíclica. In: Cairo, S.; Gomes, M.; Fabre, S. (org.). **Química orgânica**. v. 2. 4. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2006. Cap.17, p.81-134.

Caughey, W.S.; Ibers, J.A. Crystal and Molecular Structure of the Free Base Porphyrin, Protoporphyrin IX Dimethyl Ester. **Journal of the American Chemical Society**, v.99, n.20, p.6639-6645, 1977. DOI: 10.1021/ja00462a027

Cerqueira, A.F.R.; Moura, N.M.M.; Serra, V.V.; Faustino, M.A.F.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Neves, M.G.P.M.S. β -Formyl- and β -Vinylporphyrins: Magic Building Blocks for Novel Porphyrin Derivatives. **Molecules**, v.22, n.8, p.1269, 2017. DOI: 10.3390/molecules22081269

Chen, D.; Song, M.; Huang, J.; Chen, N.; Xue, J.; Huang, M. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v.13, n.3, p.2030009, 2020. DOI: 10.1142/S1793545820300098

Chilakamarthi, U.; Giribabu, L. Photodynamic therapy: past, present and future. **The Chemical Record**, v.17, n.8, p.775-802, 2017. DOI: 10.1002/tcr.201600121

Collier, N.J.; Haylett, A.K.; Wong, T.H.; Morton, C.A.; Ibbotson, S.H.; McKenna, K.E.; Mallipeddi, R.; Moseley, H.; Seukeran, D.; Ward, K.A.; Mustapa, M.F.M.; Extton, L.S.; Green, A.C.; Rhodes, L.E. Conventional and combination topical photodynamic therapy for basal cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Dermatology**, v.179, n.6, p.1277-1296, 2018. DOI: 10.1111/bjd.16838

Correia, J.H.; Rodrigues, J.A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, v.13, n.9, p.1332, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091332

Dong, Y.; Wan, G.; Yan, P.; Chen, Y.; Wang, W.; Peng, G. Effect of anti-VEGF drugs combined with photodynamic therapy in the treatment of age-related macular degeneration. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.12, n.6, p.3923-3926, 2016. DOI: 10.3892/etm.2016.3886

Estevão, B.M.; de Freitas, C.F.; Franciscato, D.S.; de Assis, F.F.; de Oliveira, K.T.; Hioka, N.; Caetano, W.; Muniz, E. C. Synthetic chlorin derivative self-prevented from aggregation: Behavior in homogeneous medium for PDT applications. **Journal of Molecular Liquids**, v.320, parte B, p.114363, 2020. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114363

Frackowiak, D. The Jablonski diagram. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.2, n.3, p.399-401, 1988. DOI: 10.1016/1011-1344(88)85060-7

Gjuroski, I.; Furrer, J.; Vermathen, M. Probing the Interactions of Porphyrins with Macromolecules Using NMR Spectroscopy Techniques. **Molecules**, v.26, n.7, p.1942, 2021. DOI: 10.3390/molecules26071942

Hasobe, T. Porphyrin-Based Supramolecular Nanoarchitectures for Solar Energy Conversion. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v.4, n.11, p.1771-1780, 2013. DOI: 10.1021/jz4005152

Hiroto, S.; Miyake, Y.; Shinokubo, H. Synthesis and Functionalization of Porphyrins through Organometallic Methodologies. **Chemical Reviews**, v.117, n.4, p.2910-3043, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00427

Hunter, C.A.; Sanders, J.K.M. The nature of π - π interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, n.14, p.5525-5534, 1990. DOI: 10.1021/ja00170a016

Jablonski, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. **Nature**, v.131, p.839-840, 1933. DOI: 10.1038/131839b0

Janson, T.R.; Katz, J.J. An examination of the 220 MHz NMR spectra of mesoporphyrin IX dimethyl ester, deuteroporphyrin IX dimethyl ester, and protoporphyrin IX dimethyl ester. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v.6, n.2, p.209-220, 1972. DOI: 10.1016/0022-2364(72)90129-1

Jirásek, M.; Anderson, H.L.; Peeks, M.D. From macrocycles to quantum rings: does aromaticity have a size limit? **Accounts of Chemical Research**, v.54, n.16, p.3241-3251, 2021. DOI: 10.1021/acs.accounts.1c00323

Kiening, M.; Lange, N. A Recap of Heme Metabolism towards Understanding Protoporphyrin IX Selectivity in Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.14, p.7974, 2022. DOI: 10.3390/ijms23147974

Kwon, N.; Kim, H.; Li, X.; Yoon, J. Supramolecular agents for combination of photodynamic therapy and other treatments. **Chemical Science**, v.12, n.21, p. 7248-7268, 2021. DOI: 10.1039/d1sc01125a

Laba, K.; Lapkowski, M.; Officer, D.L.; Wagner, P.; Data, P. Electrochemical and optical aspects of cobalt meso-carbazole substituted porphyrin complexes. **Electrochimica Acta**, v.330, p.135140, 2020. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.135140

Lee, J.; Koo, N.; Min, D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, n.1, p. 21-33, 2006. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x

Lima, E.; Reis, L.V. Photodynamic Therapy: From the Basics to the Current Progress of N-Heterocyclic-Bearing Dyes as Effective Photosensitizers. **Molecules**, v.28, n.13, p.5092, 2023. DOI: 10.3390/molecules28135092

Magna, G.; Monti, D.; Di Natale, C.; Paolesse, R.; Stefanelli, M. The Assembly of Porphyrin Systems in Well-Defined Nanostructures: An Update. **Molecules**, v.24, n.23, p.4307, 2019. DOI: 10.3390/molecules24234307

Matlou, G.G.; Abrahamse, H. Hybrid Inorganic-Organic Core-Shell Nanodrug Systems in Targeted Photodynamic Therapy of Cancer. **Pharmaceutics**, v.13, n.11, p.1773, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111773

Mohabati, D.; van Dijk, E.H.; van Rijssen, T.J.; de Jong, E.K.; Breukink, M.B.; Martinez-Ciriano, J.P.; Martinez-Ciriano, J.P.; Dijkman, G.; Hoyng, C.B.; Fauser, S.; Yzer, S.; Boon, C.J.F. Clinical spectrum of severe chronic central serous chorioretinopathy and outcome of photodynamic therapy. **Clinical Ophthalmology**, v.12, p.2167-2176, 2018. DOI: 10.2147/OPTH.S174573

Montforts, F.-P.; Gerlach, B.; Hoeper, F. Discovery and synthesis of less common natural hydroporphyrins. **Chemical Reviews**, v.94, n.2, p.327-347, 1994. DOI: 10.1021/cr00026a003

Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G.B.; Hamblin, M.R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v.3, n.2, p.2516-2539, 2011. DOI: 10.3390/cancers3022516

Myrzakhmetov, B.; Arnoux, P.; Mordon, S.; Acherar, S.; Tsoy, I.; Frochot, C. Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions. **Pharmaceutics**, v.14, n.2, p.138, 2021. DOI: 10.3390/ph14020138

Pareek, S.; Sagar, N. A.; Sharma, S.; Kumar, V.; Agarwal, T.; González-Aguilar, G. A.; Yahia, E. M. Chlorophylls: chemistry and biological functions. In: Yahia, E. M. (Ed.). **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2018. Cap.14, p.269-284. DOI: 10.1002/9781119158042.ch14

Parra, G.G.; Correa, D.S.; Silveira-Alves, E.; Almeida, L.M.; Souza, M.A.R.; De Boni, L.; Misoguti, L.; Mendonça, C.R.; Zílio, S.C.; Neto, N.M.B.; Borissevitch, I.E.; Gonçalves, P.J. Effects of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS4) aggregation on its spectral and kinetic characteristics and singlet oxygen production. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v.261, p.120063, 2021. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120063

Que, S.K.T.; Zwald, F.O.; Schmults, C.D. Cutaneous squamous cell carcinoma: Management of advanced and high-stage tumors. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.78, n.2, p.249-261, 2018. DOI: 10.1016/j.jaad.2017.08.058

Ribeiro, J.N.; Jorge, R.A.; Silva, A.R.; da Flores, A.V.; Ronchi, L.M.; Tedesco, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v.32, n.1, p.7-14, 2007. DOI: 10.1590/S0100-46702007000100001

Rossi, L.M.; Silva, P.R.; Vono, L.L.R.; Fernandes, A.U.; Tada, D.B.; Baptista, M.S. Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties, and singlet oxygen generation. **Langmuir**, v.24, n.21, p.12534-12538, 2008. DOI: 10.1021/la800840k

Ryan, A.A.; Senge, M.O. How green is green chemistry? Chlorophylls as a bioresource from biorefineries and their commercial potential in medicine and photovoltaics. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.17, p.638-660, 2015. DOI: 10.1039/c4pp00435c

Scheer, H.; Katz, J. J. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins. In: Smith, K. M. **Porphyrins and metalloporphyrins**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1975. Cap.10, p.399-524.

Sedoud, A.; López-Igual, R.; ur Rehman, A.; Wilson, A.; Perreau, F.; Boulay, C.; Vass, I.; Krieger-Liszkay, A.; Kirilovsky, D. The cyanobacterial photoactive orange carotenoid protein is an excellent singlet oxygen quencher. **The Plant Cell**, v.26, n.4, p.1781-1791, 2014. DOI: 10.1105/tpc.114.123802

Senge, M.O.; Sergeeva, N.N.; Hale, K.J. Classic highlights in porphyrin and porphyrinoid total synthesis and biosynthesis. *Chemical Society Reviews*, v.50, n.7, p. 4730-4789, 2021. DOI: 10.1039/c7cs00719a

Shafirstein, G.; Battoo, A.; Harris, K.; Baumann, H.; Gollnick, S.O.; Lindenmann, J.; Nwogu, C.E. Photodynamic Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. Narrative Review and Future Directions. **Annals of the American Thoracic**, v.13, n.2, p.265-275, 2015. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201509-650FR

Shi, X.; Zhang, C.Y.; Gao, J.; Wang, Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v.11, n.5, p.1560, 2019. DOI: 10.1002/wnan.1560

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Carbon-13 NMR spectroscopy. In: Brennan, D.; Yee, J.; Pamela, K. (org.). **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. Cap. 4, p.204-244.

Teixeira, R.; Serra, V.V.; Botequim, D.; Paulo, P.M.R.; Andrade, S.M.; Costa, S.M.B. Fluorescence Spectroscopy of Porphyrins and Phthalocyanines: Some Insights into Supramolecular Self-Assembly, Microencapsulation, and Imaging Microscopy. **Molecules**, v.26, n.14, p.4264, 2021. DOI: 10.3390/molecules26144264

Uchoa, A.F.; de Oliveira, K.T.; Baptista, M.S.; Bortoluzzi, A.J.; Iamamoto, Y.; Serra O.A. Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation. **The Journal of Organic Chemistry**, v.76, n.21, p.8824-8832, 2011. DOI: 10.1021/jo201568n

Udrea, A.M.; Smarandache, A.; Dinache, A.; Mares, C.; Nistorescu, S.; Avram, S.; Staicu, A. Photosensitizers-Loaded Nanocarriers for Enhancement of Photodynamic Therapy in Melanoma Treatment. **Pharmaceutics**, v.15, n.8, p.2124, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15082124

Verger, A.; Brandhonneur, N.; Molard, Y.; Cordier, S.; Kowouvi, K.; Amela-Cortes, M.; Dollo, G. From molecules to nanovectors: Current state of the art and applications of photosensitizers in photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.604, p.120763, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120763

Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. **Journal of Cell Biology**, v.217, n.6, p.1915-1928, 2018. DOI: 10.1083/jcb.201708007

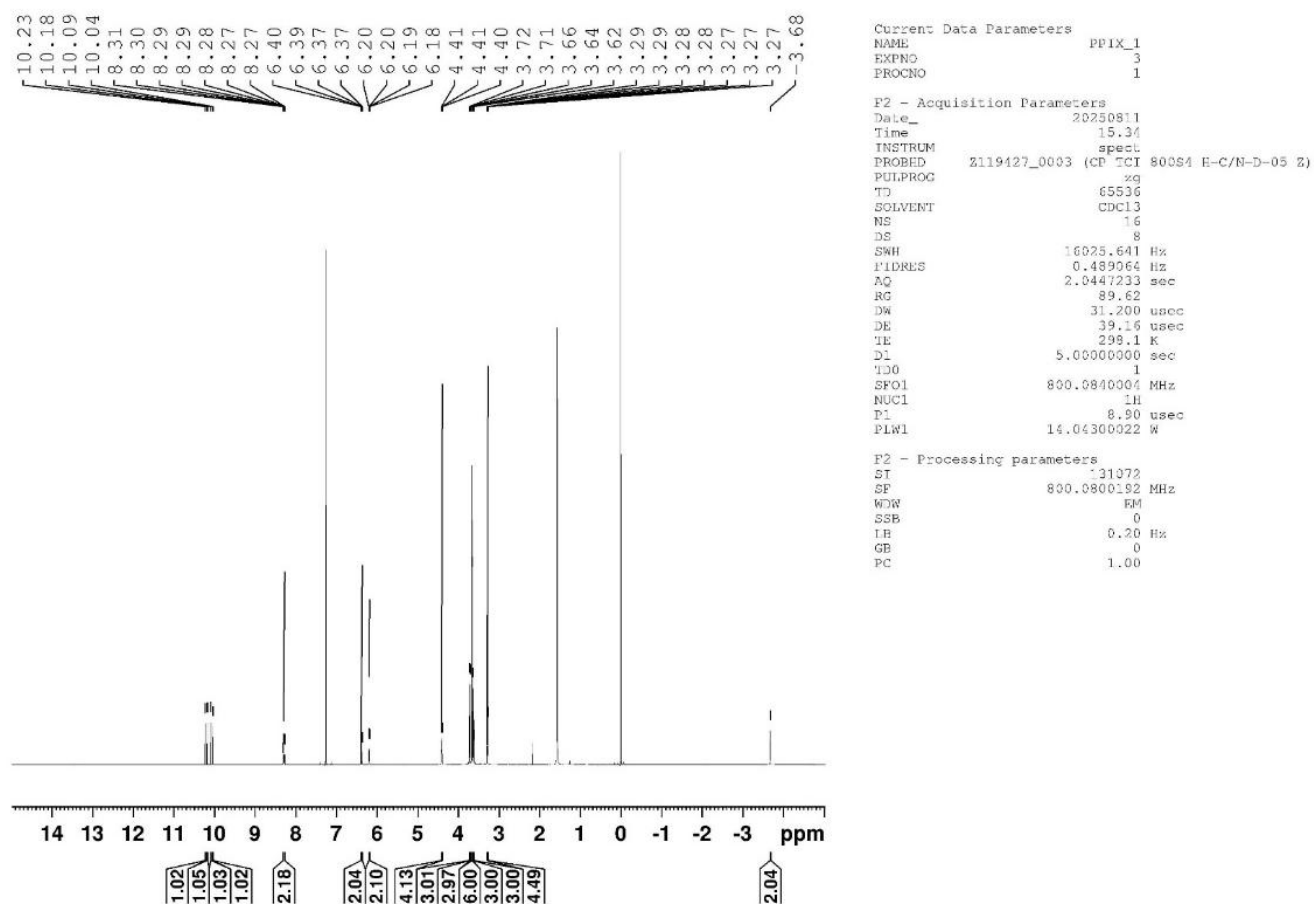
Wen, X.; Li, Y.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.19, p.140-152, 2017. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.010

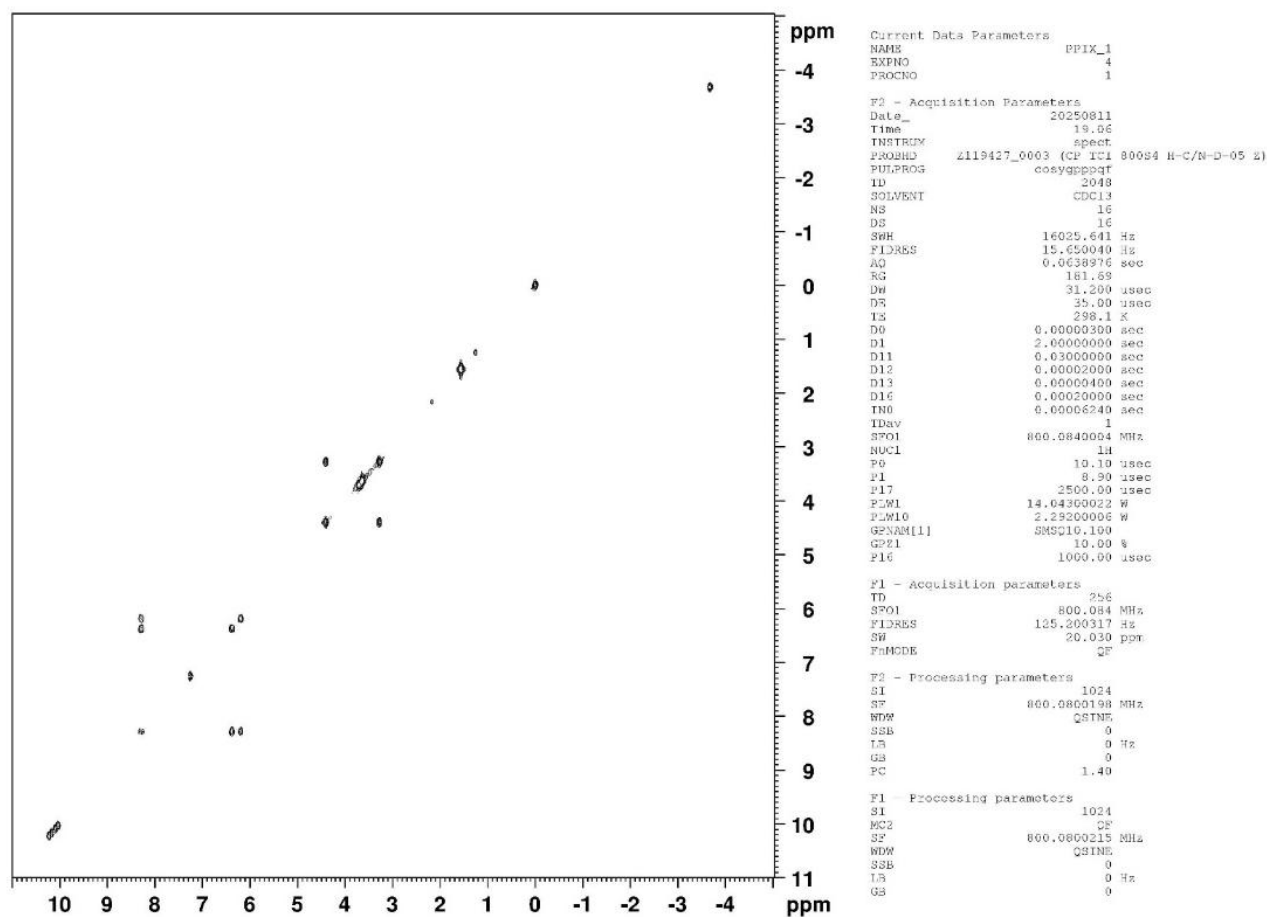
Zhao, X.; Ma, H.; Chen, J.; Zhang, F.; Jia, X.; Xue, J. An epidermal growth factor receptor-targeted and endoplasmic reticulum-localized organic photosensitizer toward photodynamic anticancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.182, p.111625, 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111625

Zou, Y.; Chen, J.; Qu, Y.; Luo, X.; Wang, W.; Zheng, X. Evolution of nMOFs in photodynamic therapy: from porphyrins to chlorins and bacteriochlorins for better efficacy. **Frontiers in Pharmacology**, v.16, p. 1533040, 2025. DOI: 10.3389/fphar.2025.1533040

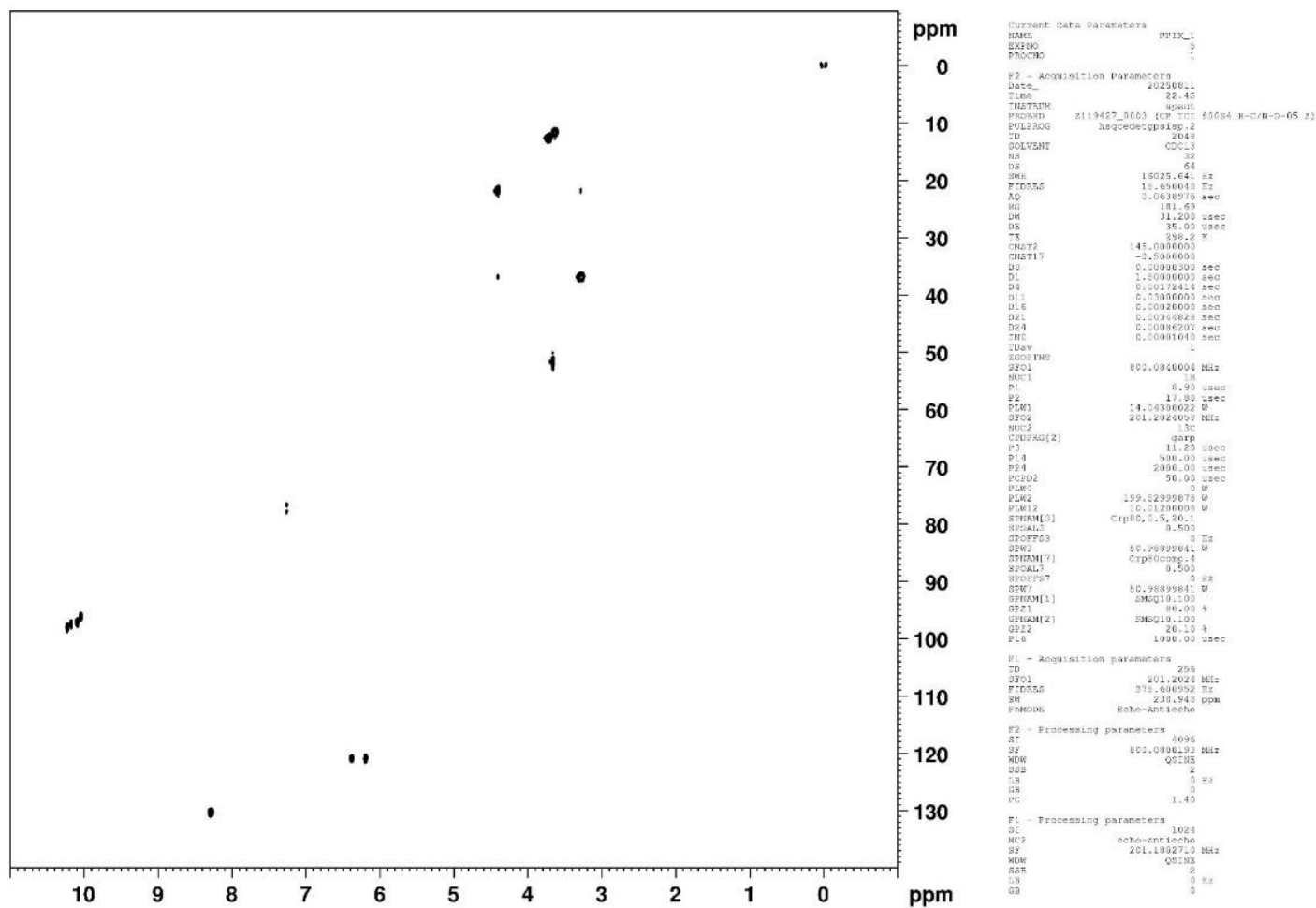
8. APÊNDICES

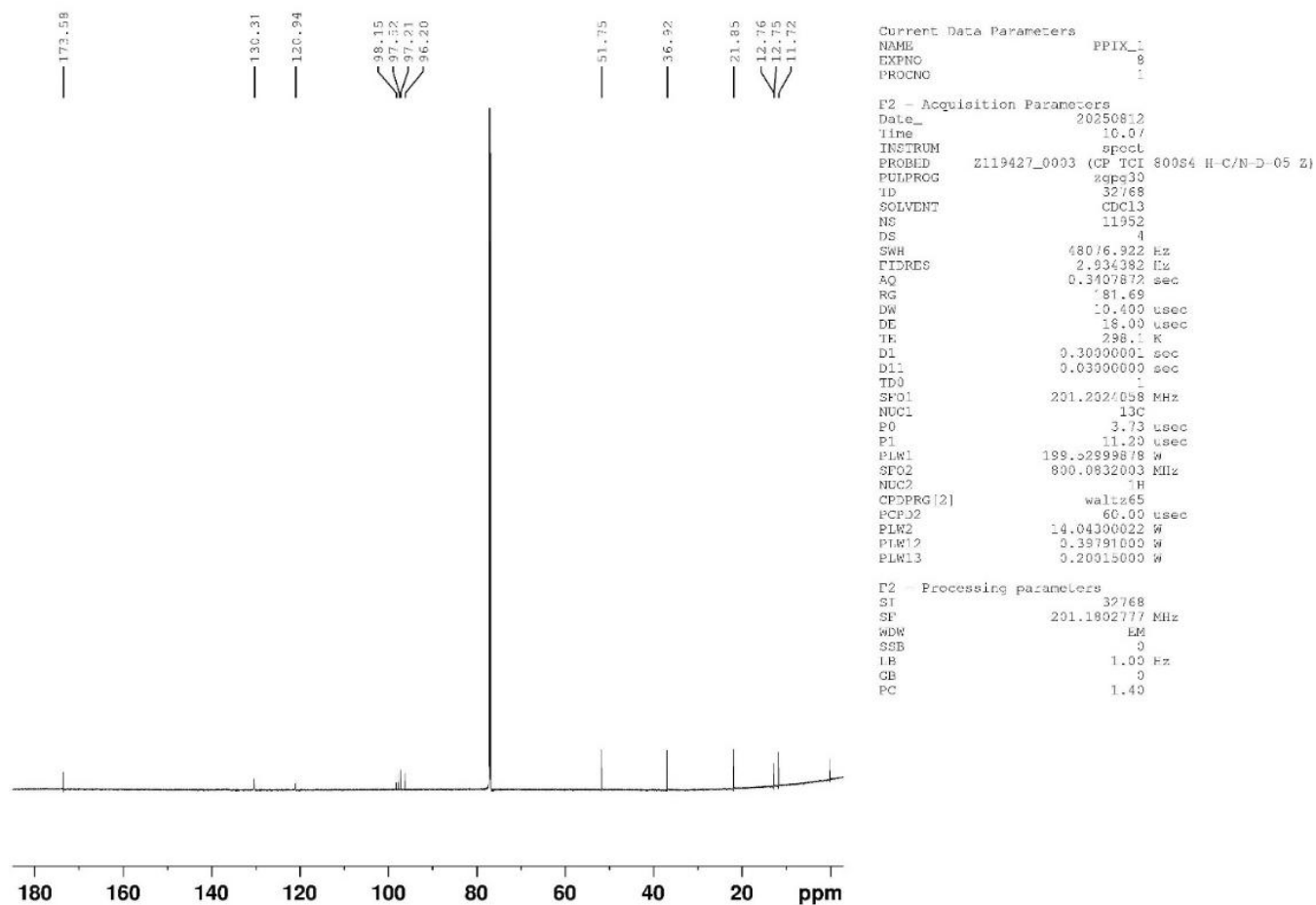
APÊNDICE A – RMN ^1H da PpIX DME 1

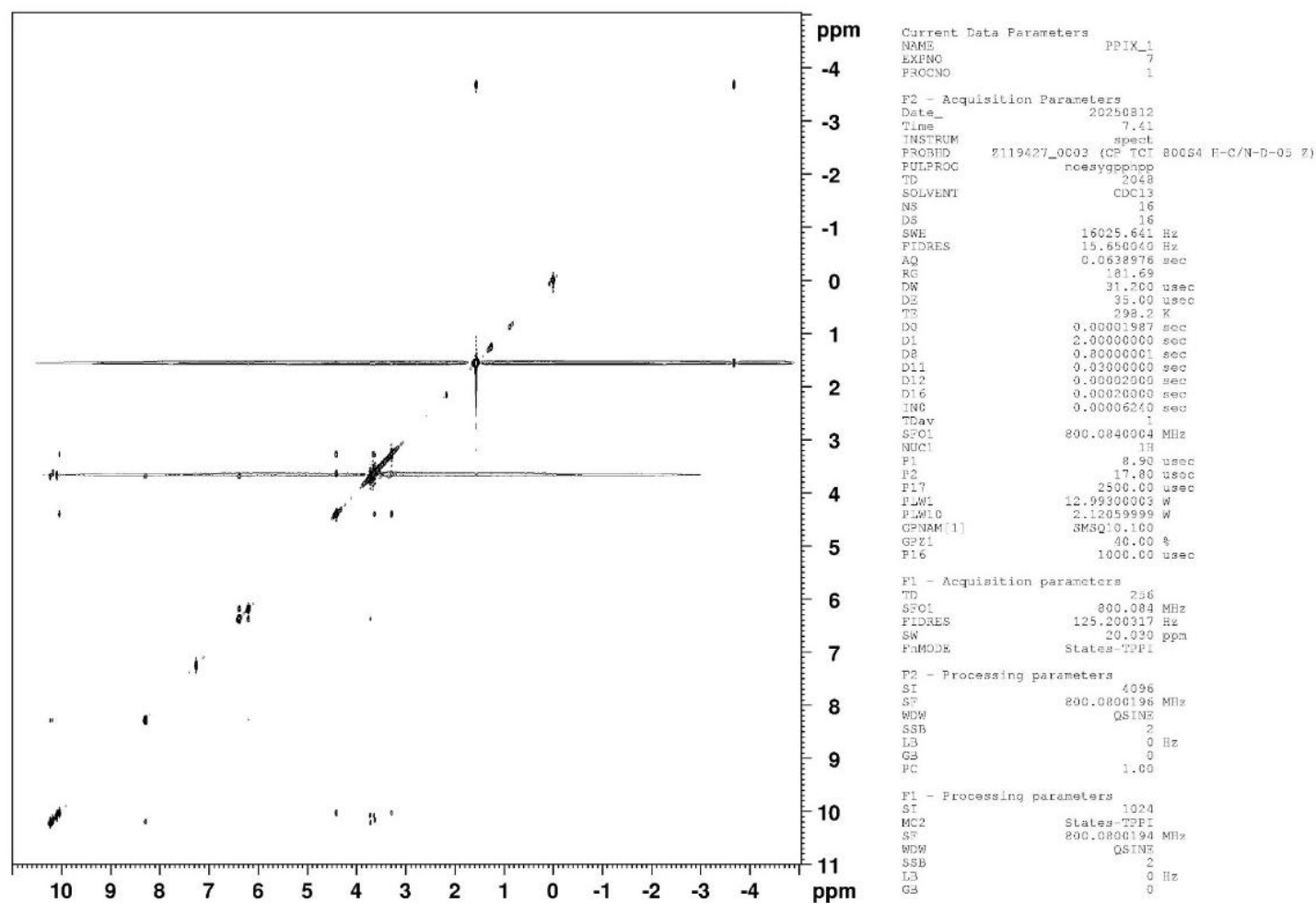


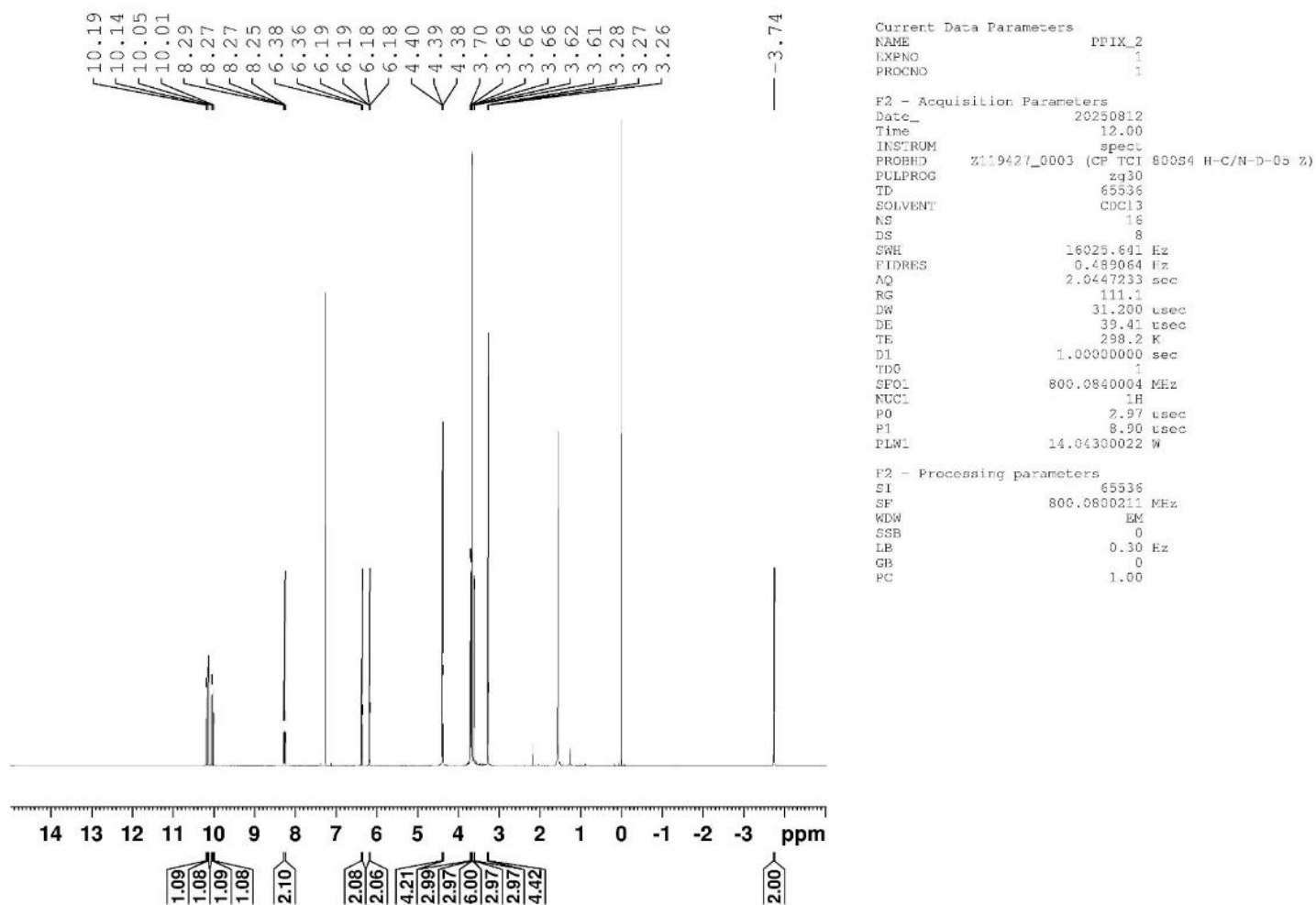
APÊNDICE B – ^1H - ^1H COSY da PpIX DME 1

APÊNDICE C – ^1H - ^{13}C HSQC da PpIX DME 1

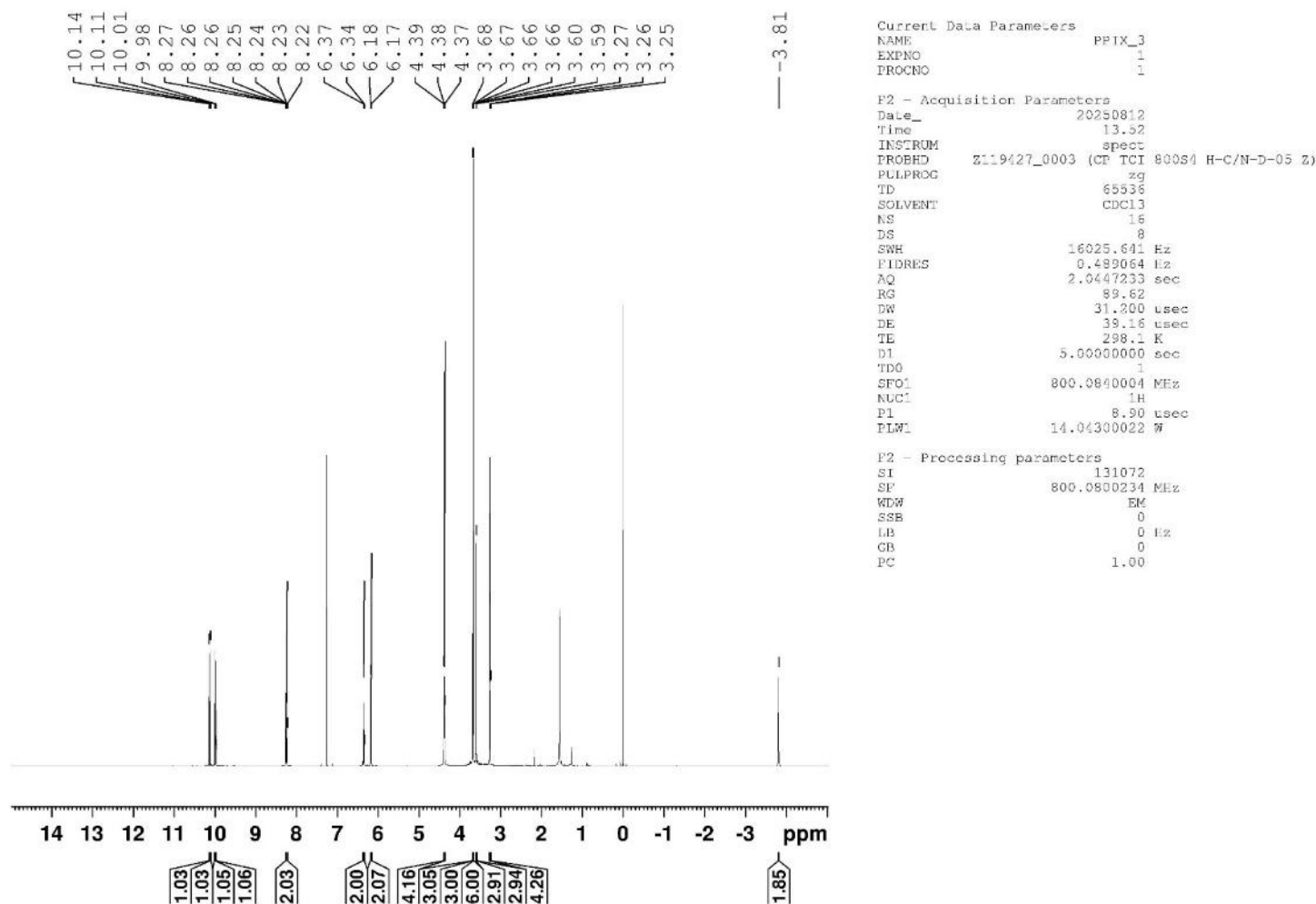


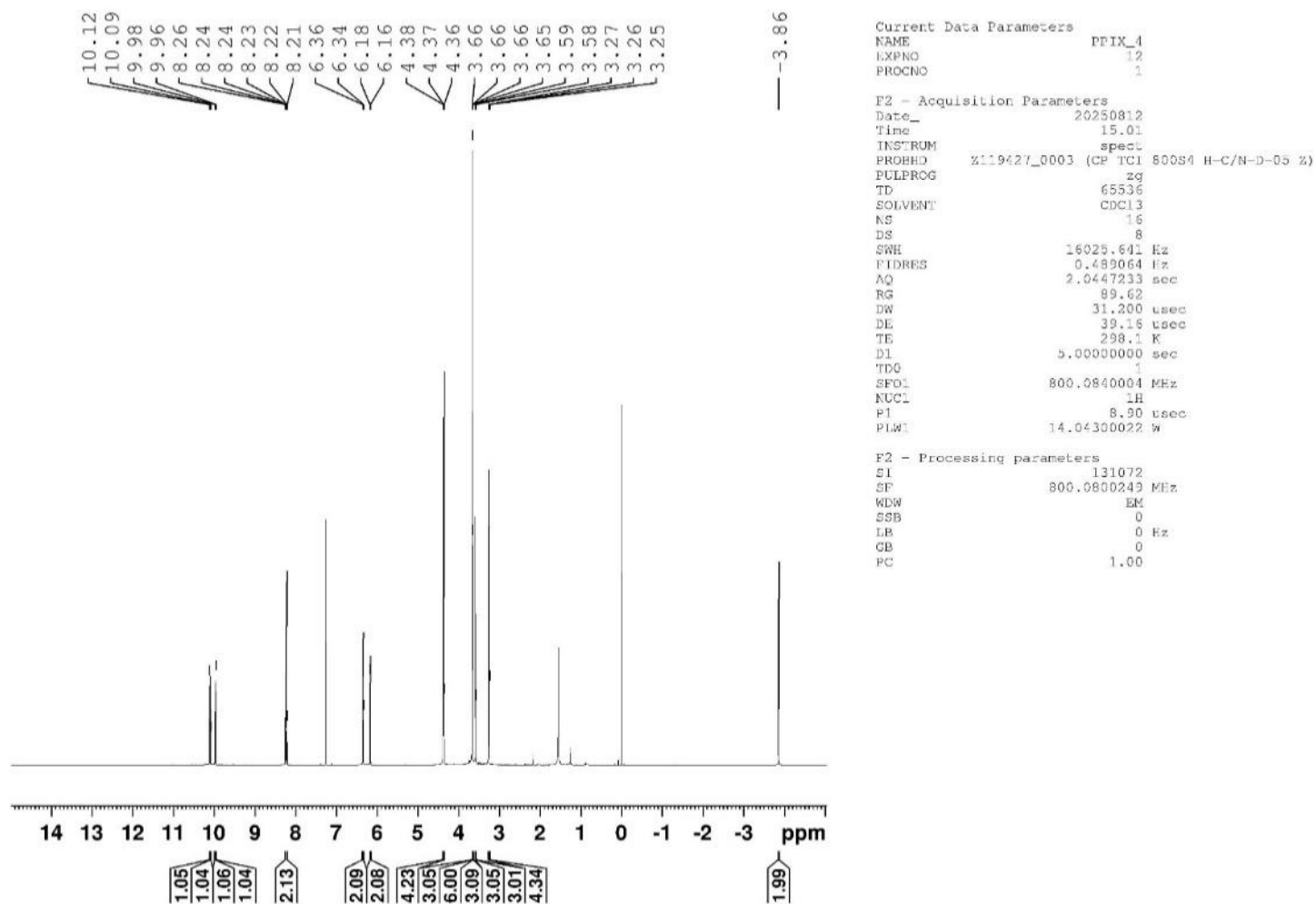
APÊNDICE D – RMN ^{13}C da PpIX DME 1

APÊNDICE E – ^1H - ^1H NOESY da PpIX DME 1

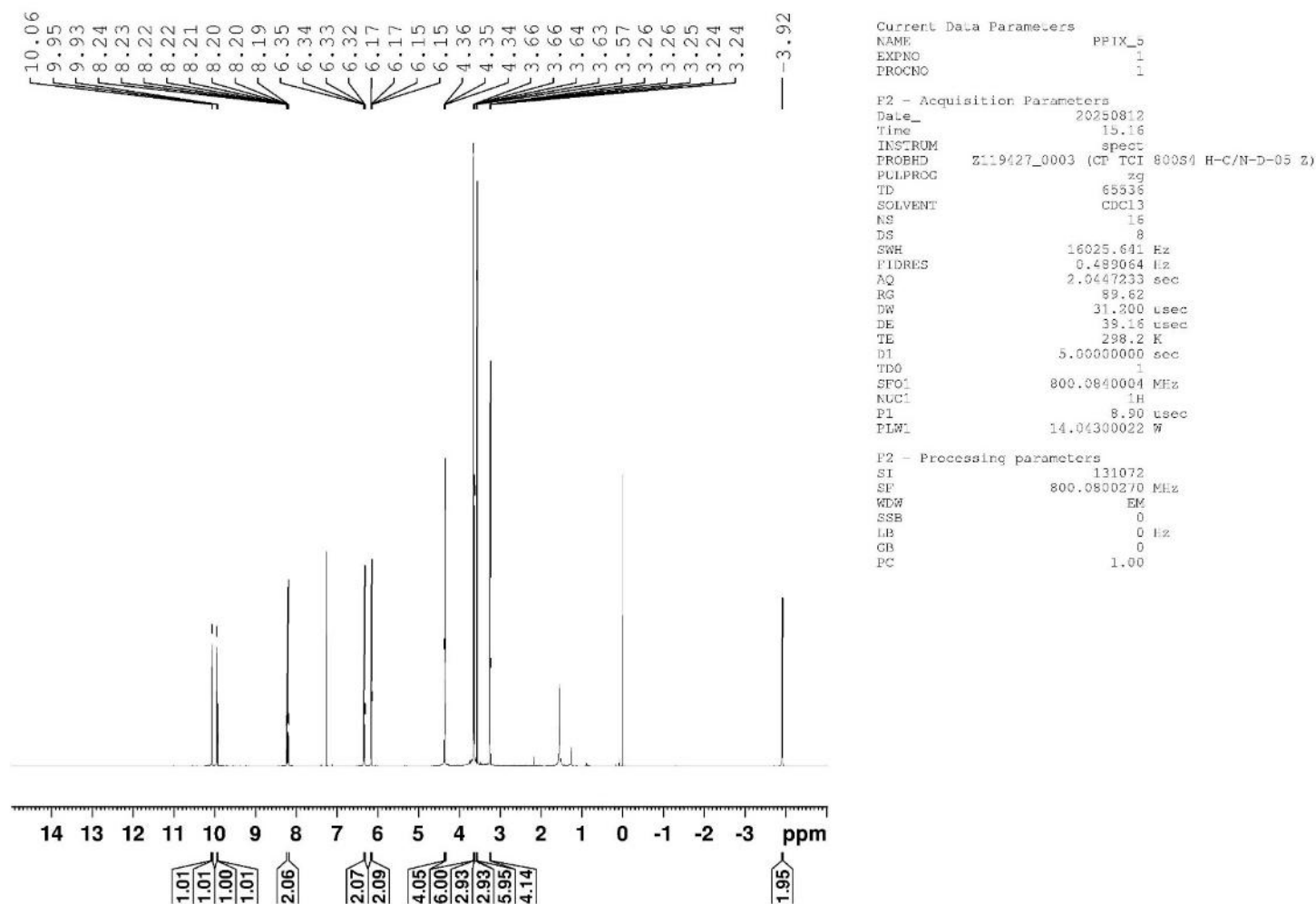
APÊNDICE F – RMN ^1H da PpIX DME 2

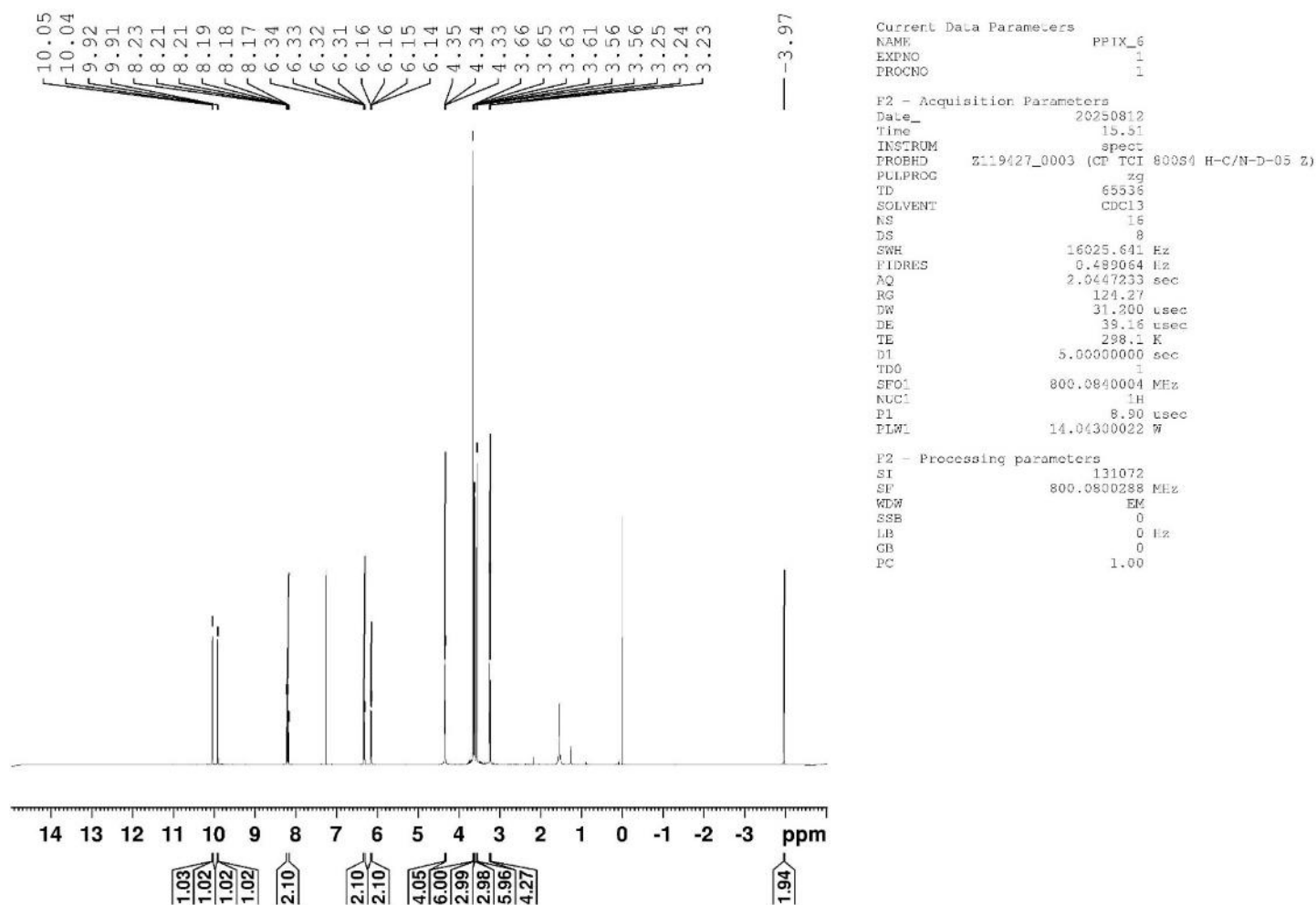
APÊNDICE G – RMN ^1H da PpIX DME 3



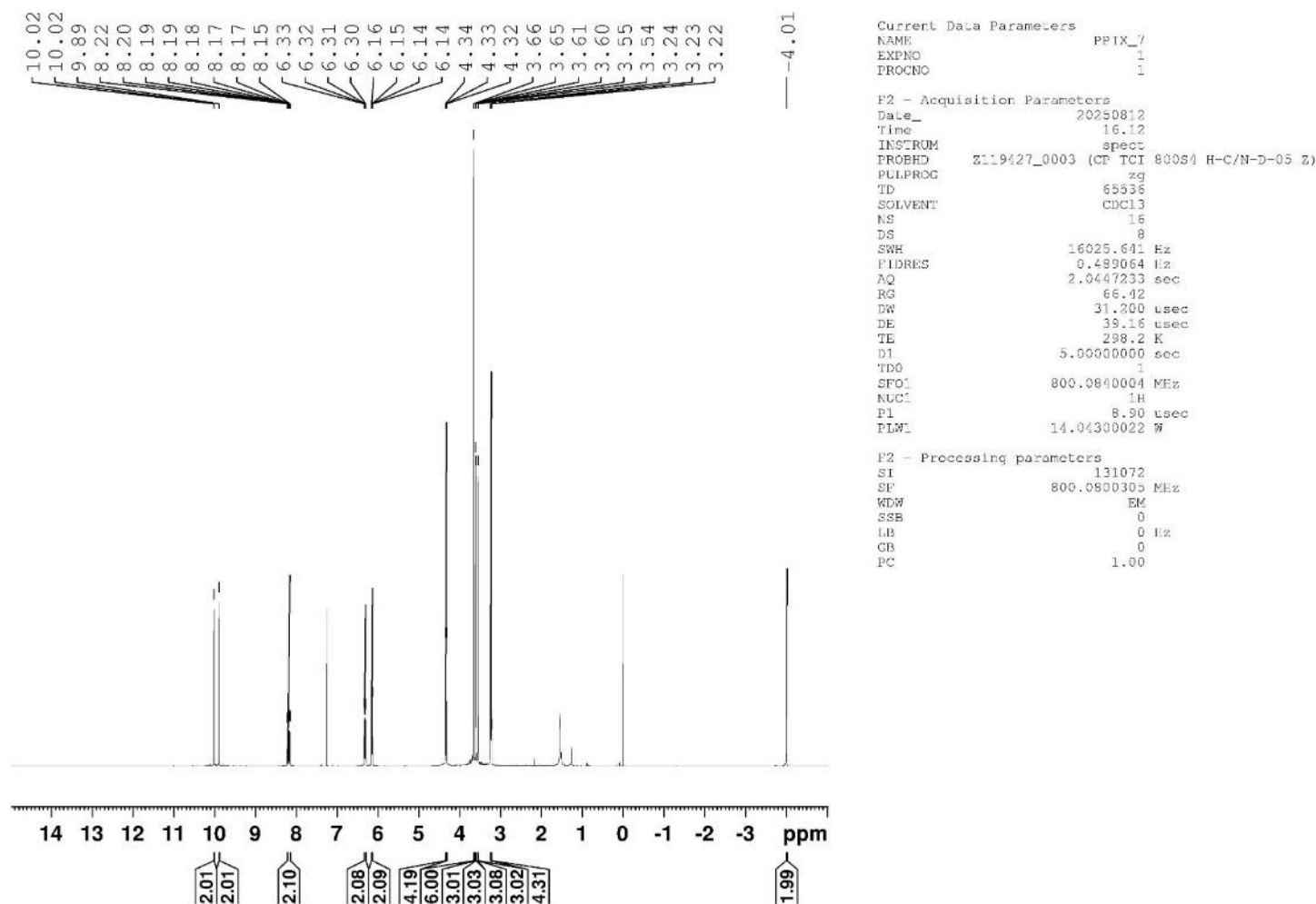
APÊNDICE H – RMN ^1H da PpIX DME 4

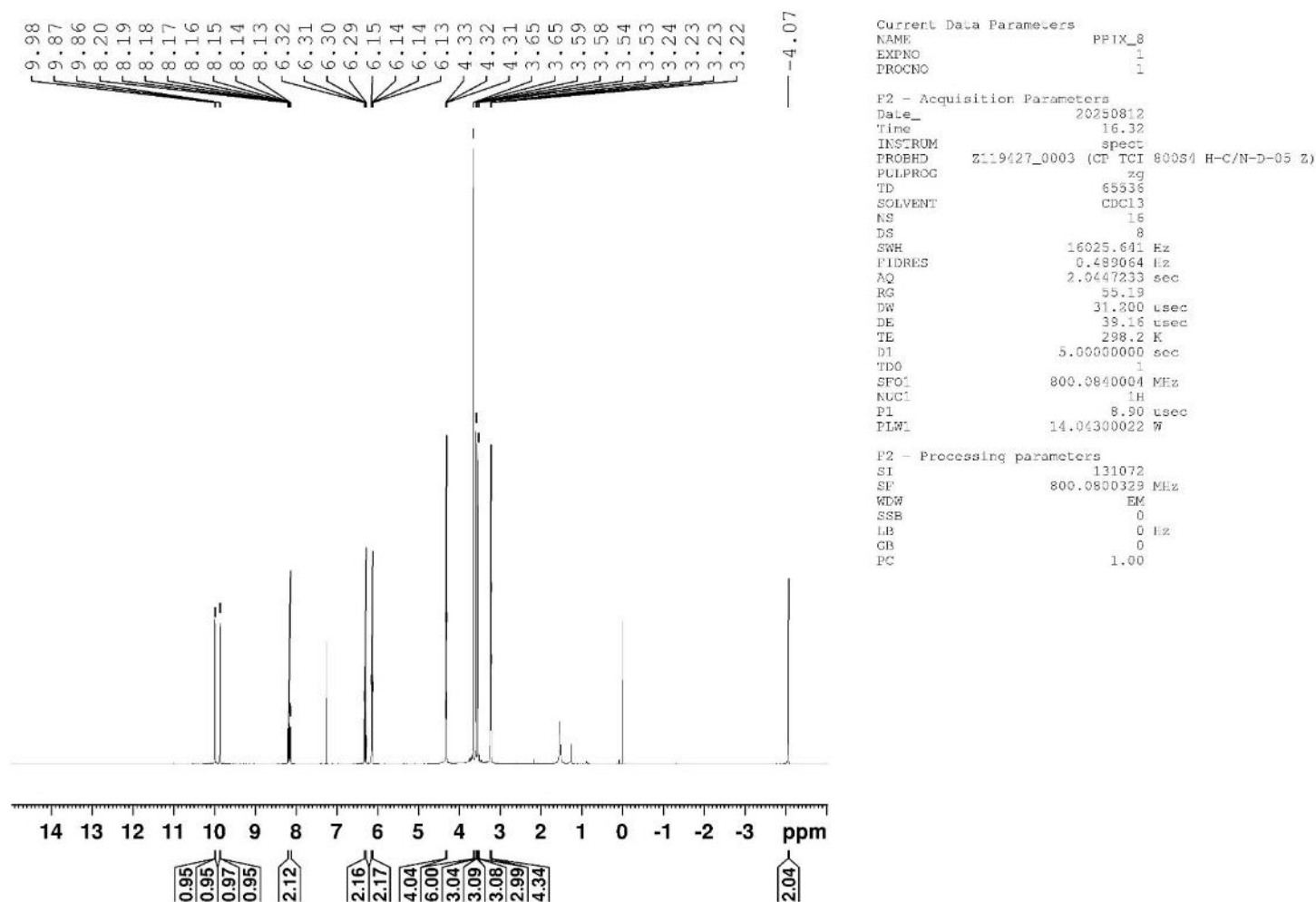
APÊNDICE I – RMN ^1H da PpIX DME 5

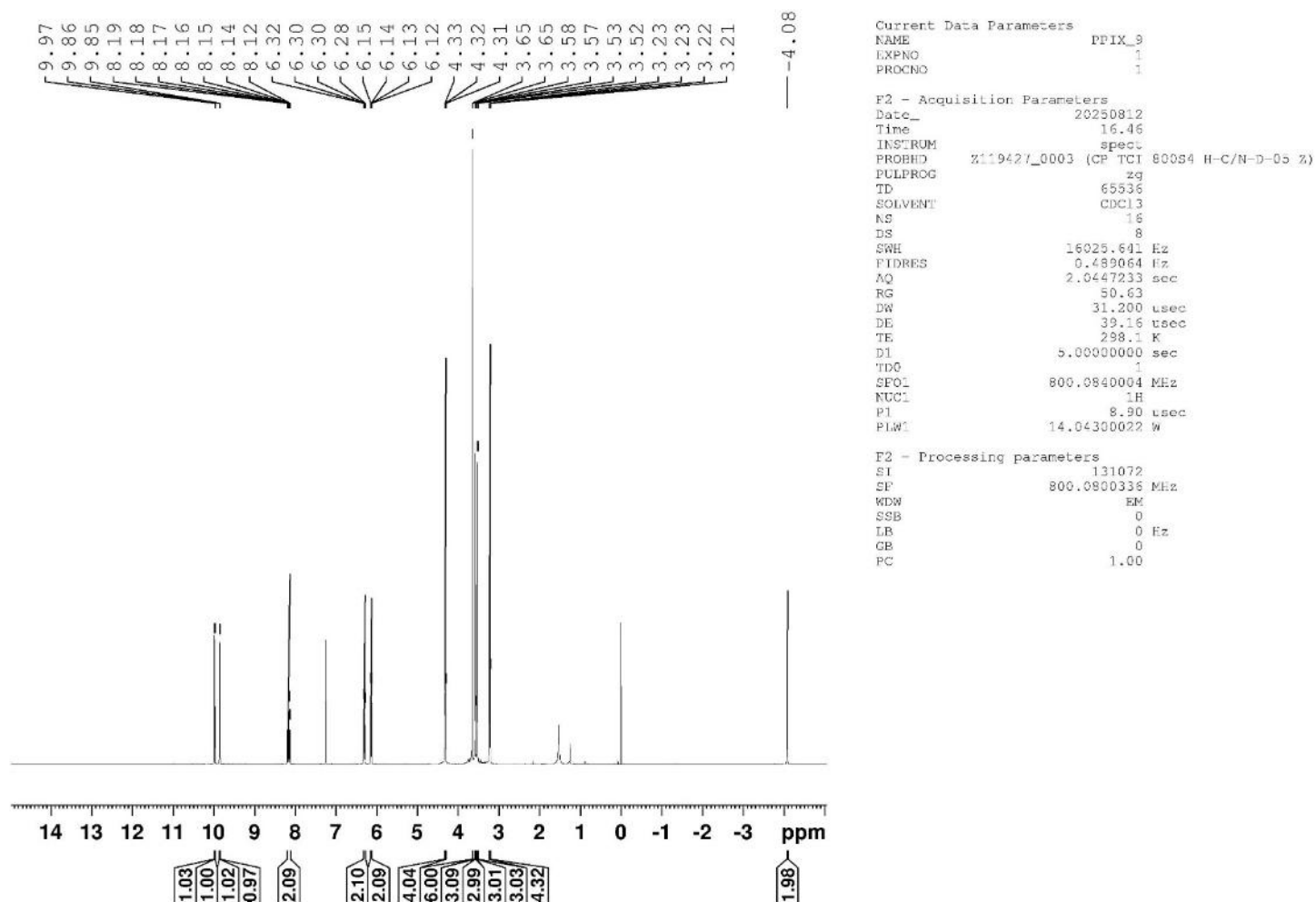


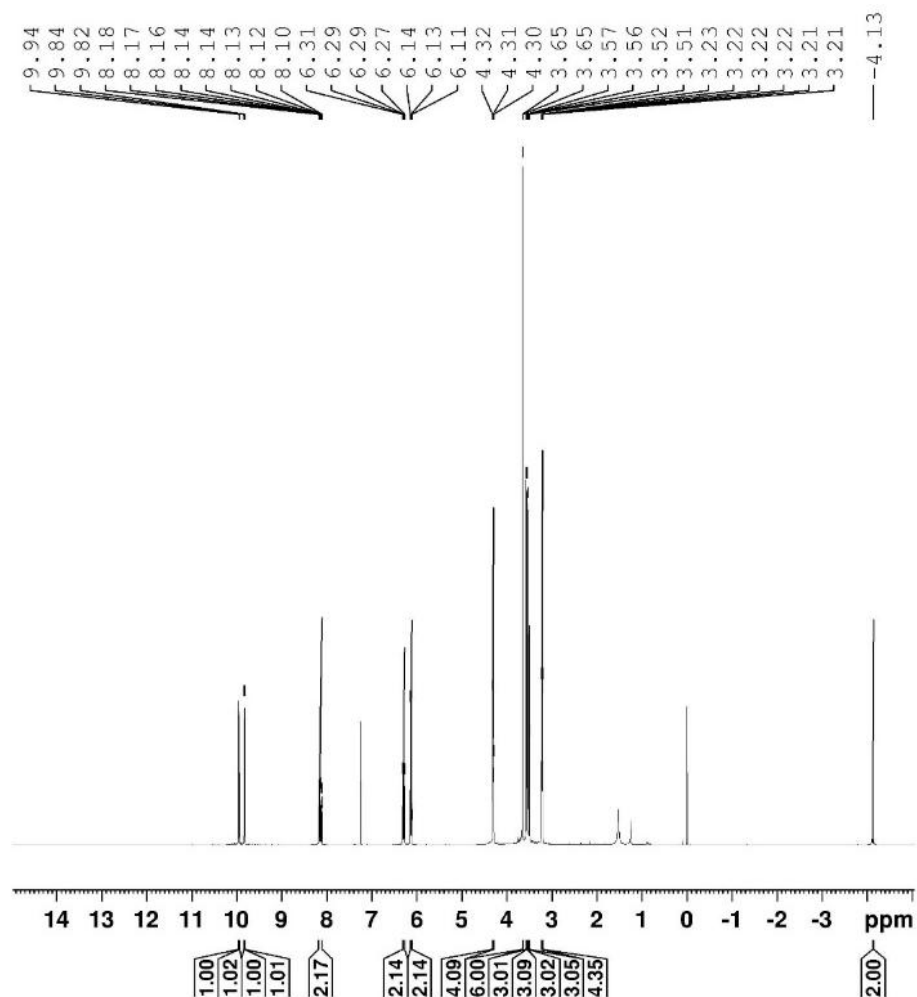
APÊNDICE J – RMN ^1H da PpIX DME 6

APÊNDICE K – RMN ^1H da PpIX DME 7



APÊNDICE L – RMN ^1H da PpIX DME 8

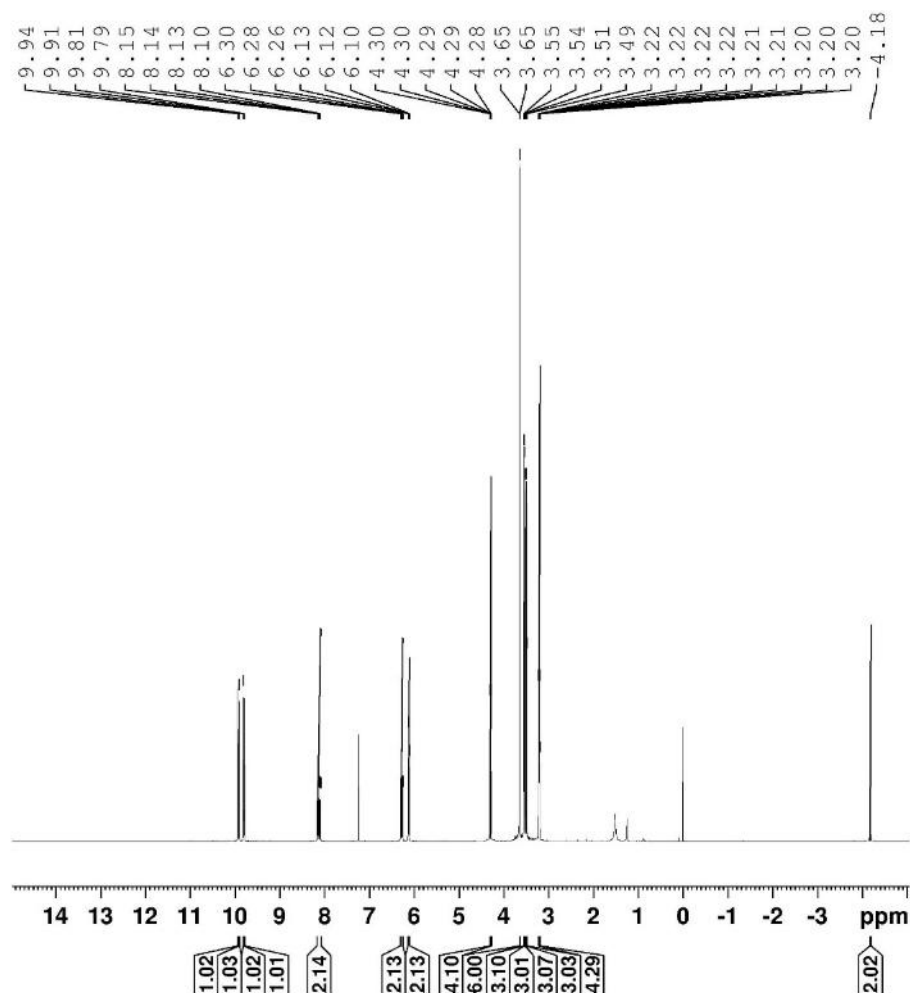
APÊNDICE M – RMN ^1H da PpIX DME 9

APÊNDICE N – RMN ^1H da PpIX DME 10

Current Data Parameters
NAME PPIX_10
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20250812
Time 16.57
INSTRUM spect
PROBHD Z119427_0003 (CP TCI 800S4 H-C/N-D-05 Z)
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 8
SWH 16025.641 Hz
FIDRES 0.489064 Hz
AQ 2.0447233 sec
RG 50.63
DW 31.200 usec
DE 39.16 usec
TE 298.1 K
D1 5.00000000 sec
TD0 1
SFO1 800.0840004 MHz
NUC1 1H
P1 8.90 usec
PLW1 14.04300022 W

F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 800.0800357 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

APÊNDICE O – RMN ^1H da PpIX DME 11

Current Data Parameters

NAME PPIX_11
EXPNO 1
PROCNO 1

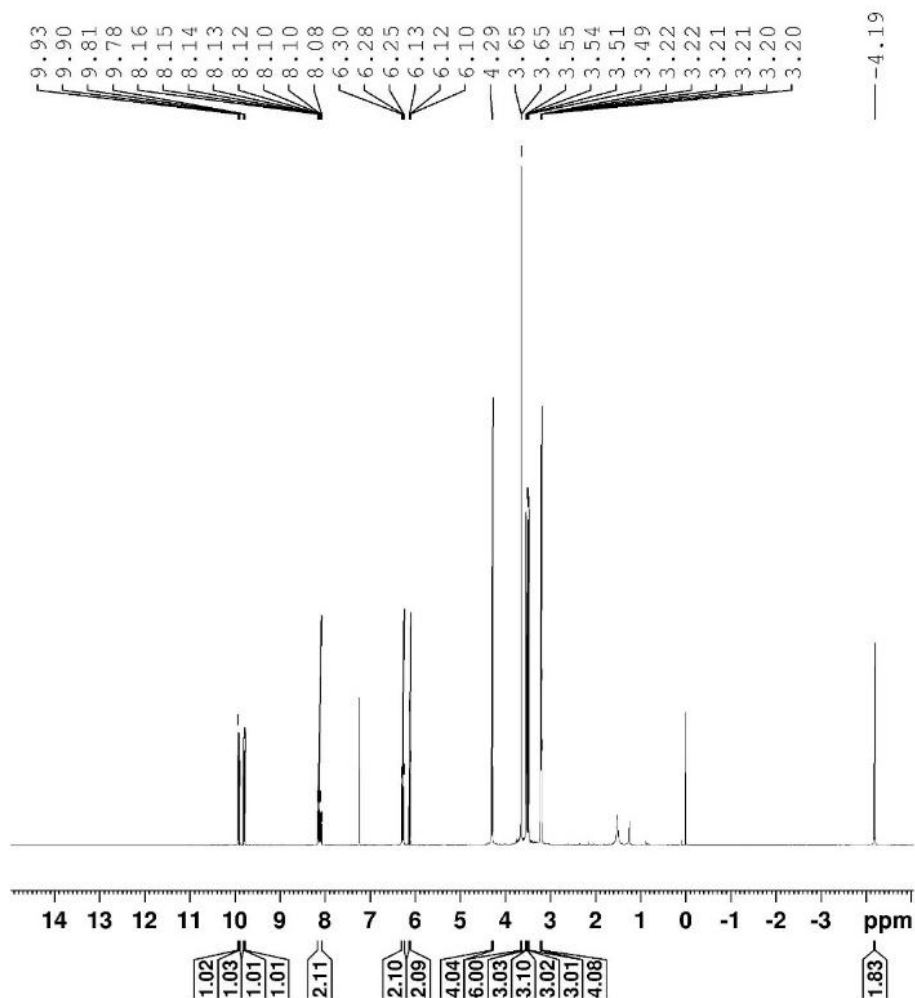
F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20250812
Time 17.09
INSTRUM spect
PROBHD Z119427_0003 (CP TCI 800S4 H-C/N-D-05 %)
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 8
SWH 16025.641 Hz
FIDRES 0.489064 Hz
AQ 2.0447233 sec
RG 50.63
DW 31.200 usec
DE 39.16 usec
TE 298.1 K
D1 5.00000000 sec
TDO 1
SFO1 800.0840004 MHz
NUC1 1H
P1 8.90 usec
PLWT 14.04300022 W

F2 - Processing parameters

SI 131072
SF 800.0800380 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

APÊNDICE P – RMN ^1H da PpIX DME 12

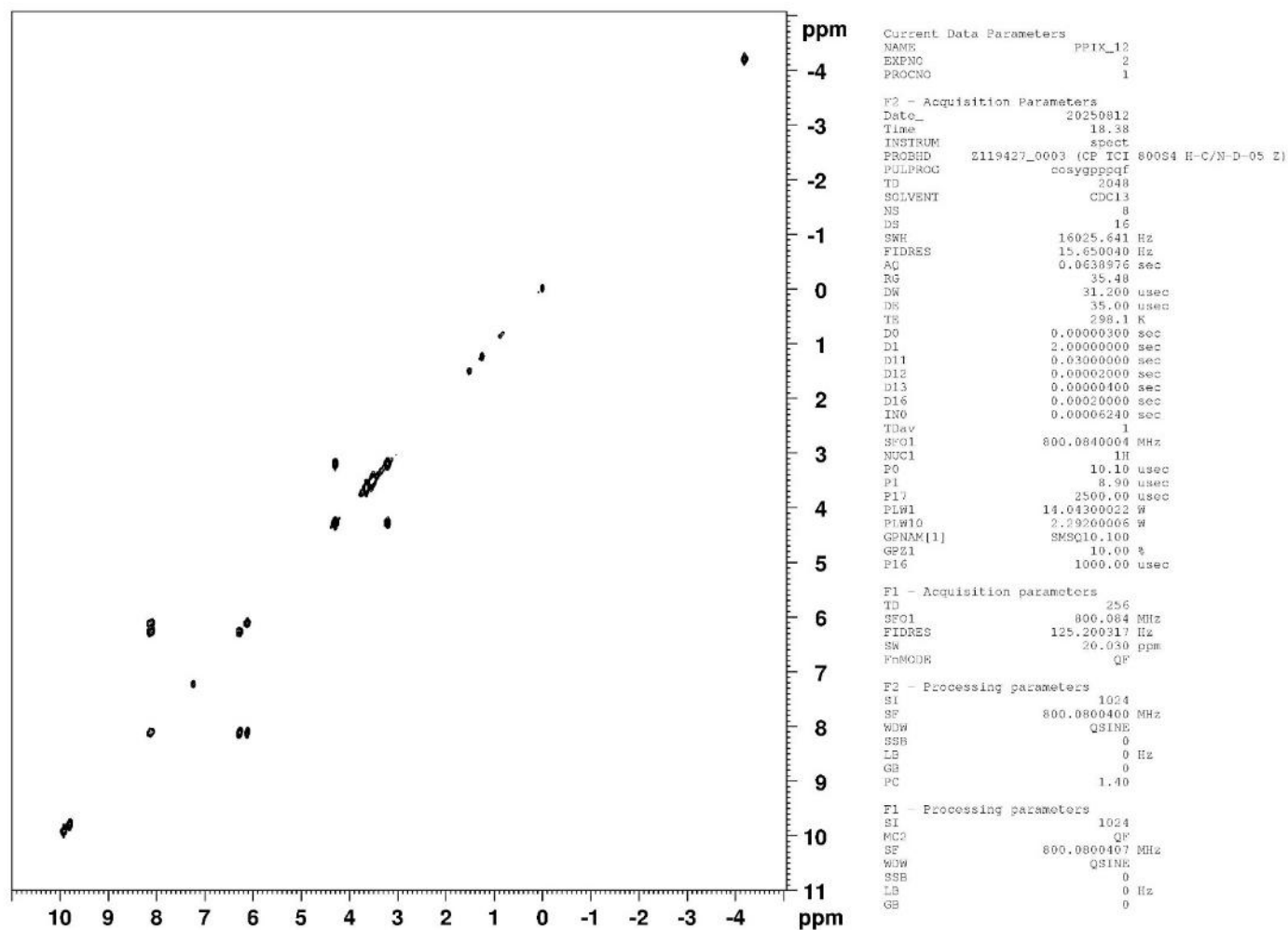


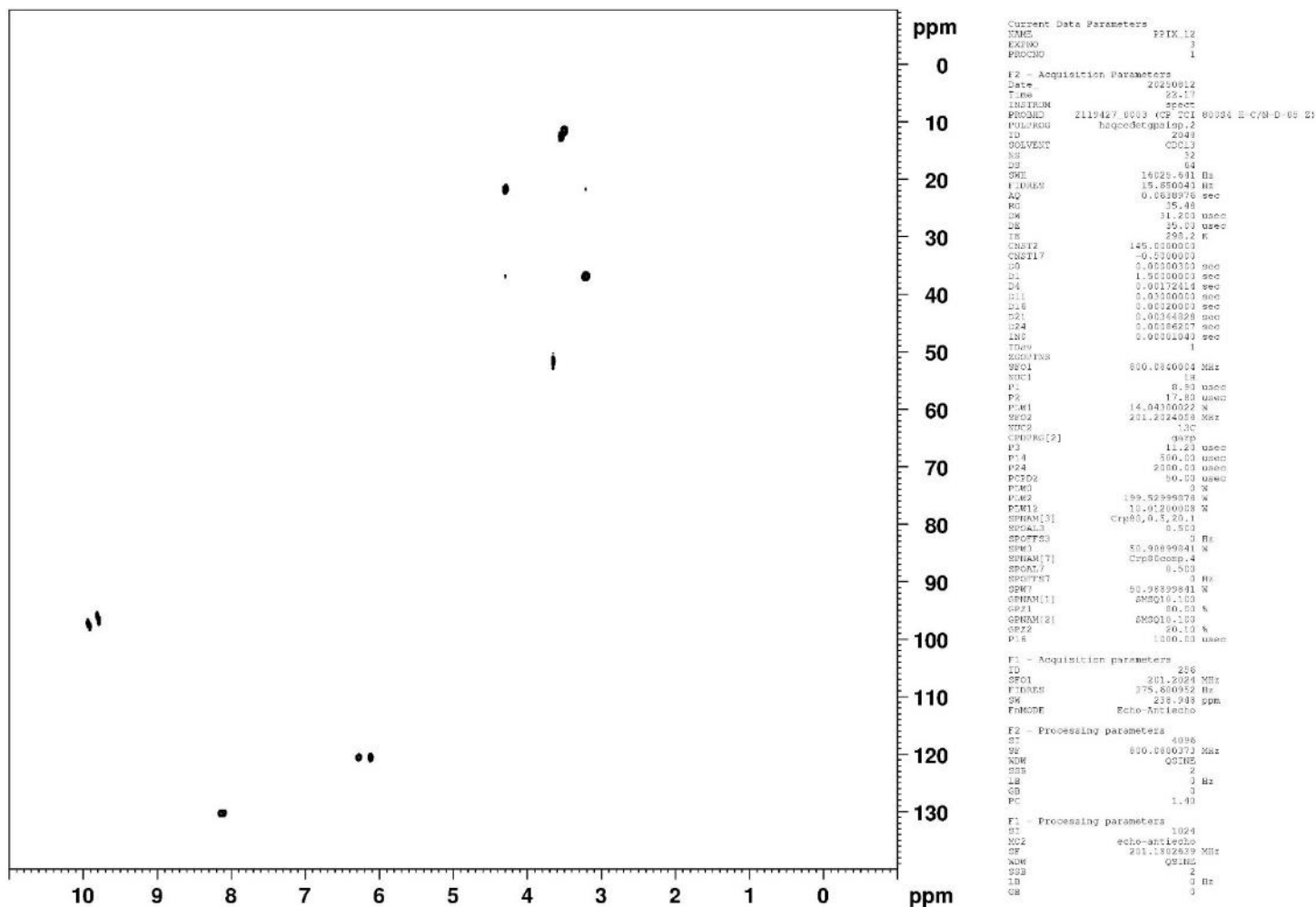
```

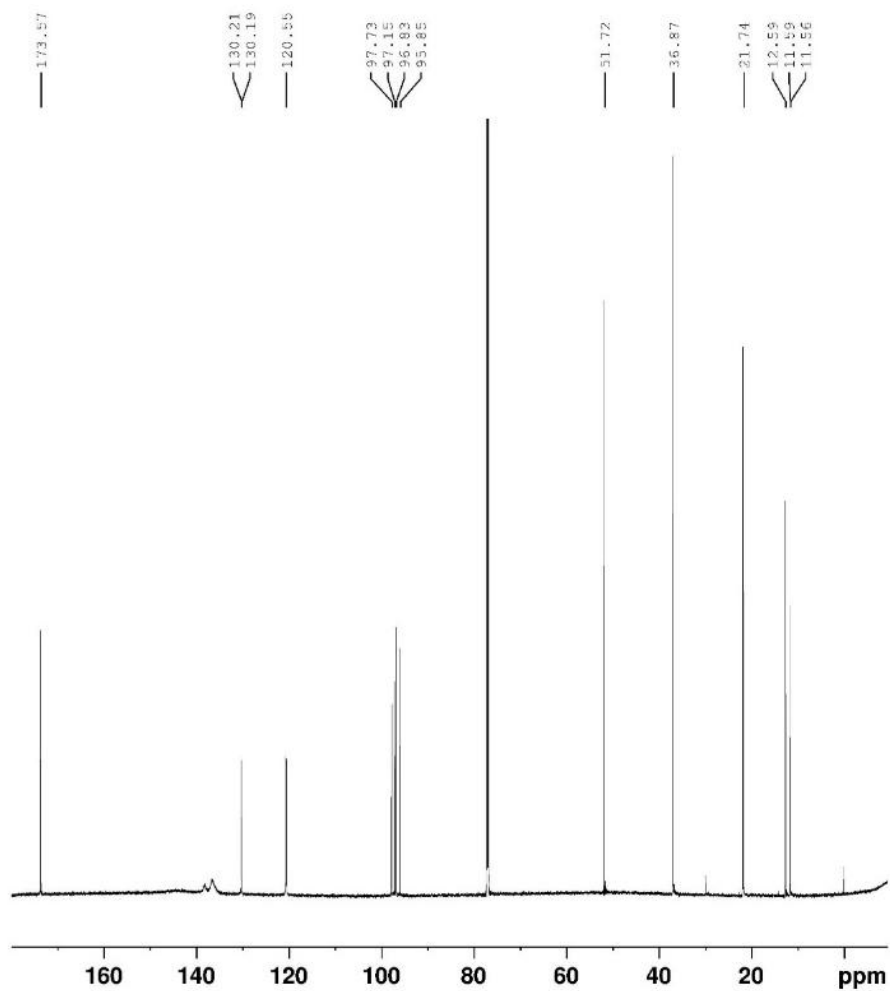
Current Data Parameters
NAME          PPIX_12
EXPNO         1
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20250812
Time          17.24
INSTRUM       spect
PROBHD        Z119427_0003 (CP TCI 800S4 H-C/N-D-05 %)
PULPROG       zg
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            1
DS            0
SWH           16025.641 Hz
FIDRES        0.489064 Hz
AQ            2.0447233 sec
RG            35.48
DW            31.200 usec
DE            39.16 usec
TE            298.1 K
D1            5.00000000 sec
TD0           1
SFO1          800.0840004 MHz
NUC1          1H
P1            8.90 usec
PLW1          14.04300022 W

F2 - Processing parameters
SI            131072
SF            800.0900387 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            0 Hz
GB            0
PC            1.00
  
```

APÊNDICE Q – ^1H - ^1H COSY da PPIX DME 12

APÊNDICE R – ^1H - ^{13}C HSQC da PpIX DME 12

APÊNDICE S – RMN ^{13}C da PPIX DME 12

```

Current Data Parameters
NAME                PPIX_12
EXPNO                6
PROCNO              1

F2 - Acquisition Parameters
Date_                20250813
Time                 7.58
INSTRUM              spect
PROBHD               Z119427_0003 (CP TCI 800S4 H-C/N-D-05 Z)
PULPROG              zgpg30
TD                   32768
SOLVENT              CDCl3
NS                   12288
DS                   4
SWH                  48076.822 Hz
FIDRES               2.934382 Hz
AQ                   0.3407872 sec
RG                   35.48
DW                   10.400 usec
DE                   18.00 usec
TE                   298.2 K
D1                   0.30000001 sec
D11                  0.03000000 sec
TD0                  1
SF01                 201.2024058 MHz
NUC1                 13C
P0                   3.73 usec
P1                   11.20 usec
PLW1                 199.52999878 W
SF02                 800.0832003 MHz
NUC2                 1H
CPDPRG[2]           waltz65
PCPD2                60.00 usec
PLW2                 14.04300022 W
PLW12                0.39791000 W
PLW13                0.20015000 W

F2 - Processing parameters
SI                   32768
SF                   201.1802760 MHz
WDW                  EM
SSB                  0
LB                   1.00 Hz
GB                   0
PC                   1.40

```

APÊNDICE T – ^1H - ^1H NOESY da PpIX DME 12