



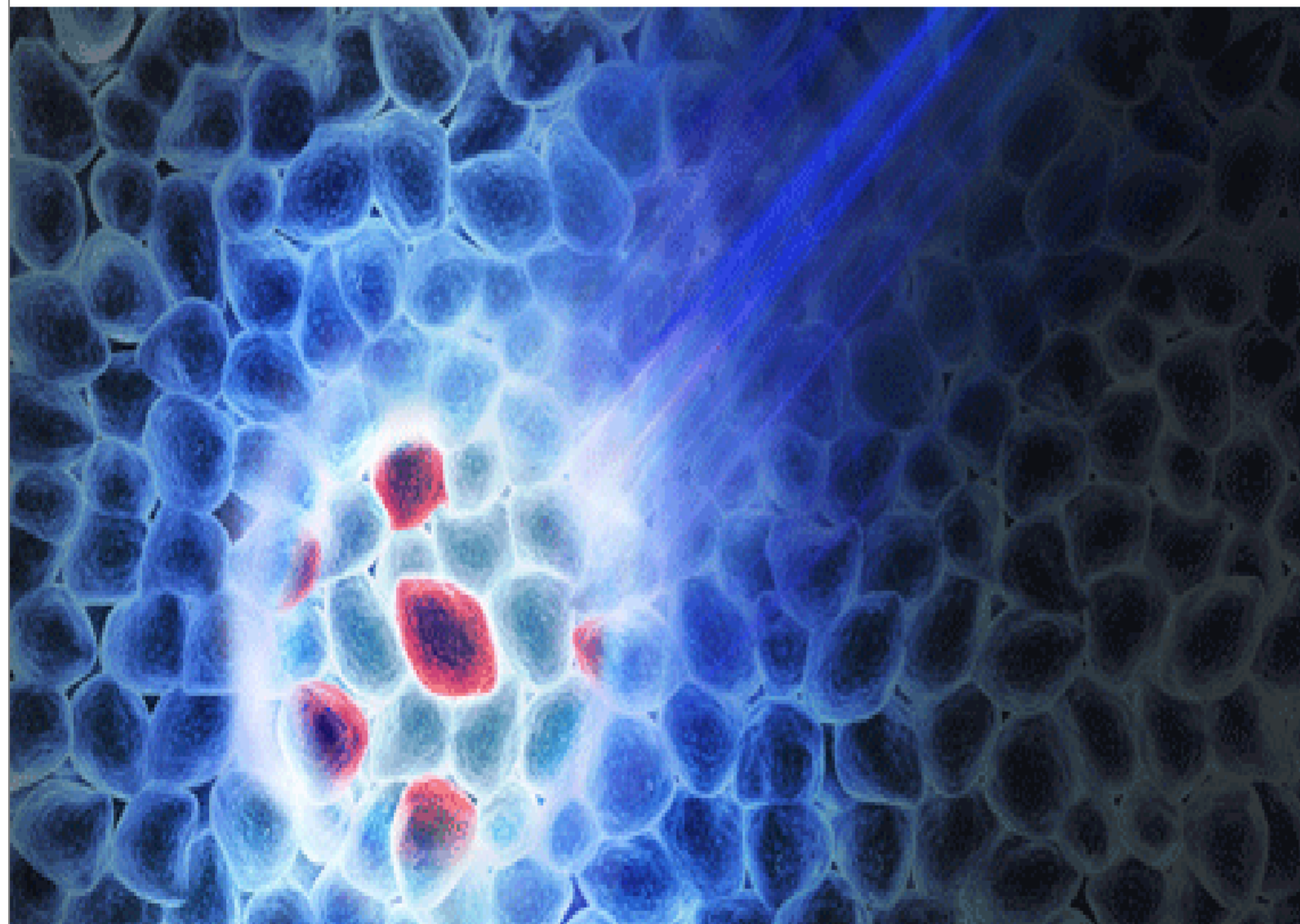
2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PORFIRINAS COMO POTENCIAIS AGENTES FOTOSSENSIBILIZADORES EM TERAPIA FOTODINÂMICA



Síntese e Caracterização de Porfirinas como Potenciais Agentes Fotosensibilizadores em Terapia Fotodinâmica

LETÍCIA DANIELA DA SILVA COSTA

LETÍCIA COSTA

2013



Síntese e Caracterização de Porfirinas como Potenciais Agentes Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Margarida M. P. Urbano (Departamento de Ciências da Vida - FCTUC) e do Professor Doutor Abílio J. F. N. Sobral (Departamento de Química – FCTUC).

Science is not formal logic.
It needs the free play of the mind in as great a degree as any other creative art. It is true that this is a gift which
can hardly be taught, but its growth can be encouraged in those who already possess it.

Max Born (1882-1970)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Abílio J. F. N. Sobral e à Professora Doutora Ana Margarida M. P. Urbano, orientadores desta Dissertação, pela sapiência e disponibilidade, pelo apoio, incentivo, críticas e conselhos e, não menos importante, pela dedicação e confiança que em mim depositaram.

À Doutora Sofia Costa da Fonseca, pela sua disponibilidade e auxílio imprescindível na realização dos estudos de fluorescência e na determinação dos rendimentos quânticos de oxigénio singleto.

Ao Professor Doutor Francisco Campos Gil, que gentilmente cedeu o *Power Meter* utilizado na determinação da potência da luz incidente nas culturas celulares.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial à Cláudia, Joana e Mariana, pela amizade, incentivo e conhecimentos transmitidos na elaboração desta Dissertação.

À Cláudia e à Joana, que me ensinaram a dar os “primeiros-passos” no mundo da Química Orgânica.

À Mariana, pela sua disponibilidade na obtenção dos espectros de massa e cromatogramas de HPLC.

À minha família e ao Daniel, pelo carinho, dedicação e incentivo que sempre me prestaram. Obrigada por todo o apoio e compreensão ao longo destes anos.

À Universidade de Coimbra, em especial ao Departamento de Química e à Unidade de Química Física Molecular, por me ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho científico.

À FCT/QREN/COMPETE pelo apoio financeiro concedido ao Dr. Abílio Sobral através dos Projectos PTDC/AAC-CLI/098308/2008 e PTDC/AAC-CLI/118092/2010, ao centro de Química da Universidade de Coimbra através do Projecto PEst-C/QUI/UI0313/2011 e à Unidade de Química Física Molecular através do Projecto PEst-OE/QUI/UI0070/2011.

ÍNDICE

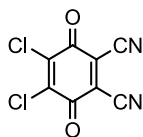
Abreviaturas e símbolos	v
Resumo	viii
Abstract	ix
Nomenclatura dos macrociclos tetrapirrólicos	x
1. Introdução	1
1.1. Cancro: considerações gerais	1
1.1.1. Ciclo celular: implicações na patologia	3
1.2. Terapia Fotodinâmica	7
1.2.1. Contextualização histórica	7
1.2.2. Fundamentos da Terapia Fotodinâmica	9
1.2.3. Componentes activos em PDT: luz, oxigénio e fotossensibilizadores	10
1.2.3.1. Luz	10
1.2.3.2. Oxigénio.....	12
1.2.3.3. Fotossensibilizadores	13
1.2.3.3.1. Fotossensibilizadores aprovados ou em estudos pré-clínicos para uso em PDT	15
1.2.4. Destruição das células tumorais mediada pela PDT	18
1.3. Porfirinas: estrutura e propriedades	20
1.3.1. Métodos de síntese	23
1.3.1.1. Síntese pelo método de Rothemund/Adler-Longo	23
1.3.1.2. Síntese pelo método de Lindsey.....	24
1.3.1.3. Síntese química assistida por tecnologia de microondas	25
2. Objectivos	27
3. Materiais e Métodos	28
3.1. Síntese e caracterização de porfirinas.....	28
3.1.1. Reagentes, equipamentos e materiais utilizados na síntese orgânica	28
3.1.2. Síntese e purificação de porfirinas	30
3.1.2.1. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(cinamil)porfirina (H ₂ TCP)	30
3.1.2.1.1. Estratégia 1: método de Adler-Longo	30
3.1.2.1.2. Estratégia 2: método de Lindsey	32
3.1.2.1.3. Estratégia 3: método de Zakavi	33
3.1.2.2. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(α -hexilcinamaldeído)porfirina	33
3.1.2.3. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis (quinolina-2-il) porfirina (2-TQP)	34
3.1.2.3.1. Síntese pelo método de Adler-Longo	34
3.1.2.3.2. Síntese assistida por tecnologia de microondas	35
3.1.2.4. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina (4-TQP).....	35
3.1.2.5. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina (TCPP).....	36
3.1.3. Caracterização das porfirinas sintetizadas	37
3.1.3.1. Espectroscopia de ultravioleta-visível	37
3.1.3.1.1. Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ)	38
3.1.3.2. Cromatografia de camada fina (TLC)	39
3.1.3.3. Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC)	40
3.1.3.4. Espectrometria de massa	41

3.1.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	42
3.1.3.6. Caracterização fotofísica	44
3.1.3.6.1. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	44
3.1.3.6.2. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ)	44
3.2. Cultura de Células.....	46
3.2.1. Reagentes, materiais e equipamentos utilizados na cultura de células	46
3.2.2. Linha celular	47
3.2.2.1. Linha celular HT29	48
3.2.3. Composição das soluções utilizadas.....	48
3.2.3.1. Soluções usadas na cultura de células HT29	48
3.2.3.2. Soluções usadas nos ensaios de cito e fototoxicidade	49
3.2.4. Armazenamento de células: criopreservação	50
3.2.4.1. Criopreservação de células HT29	50
3.2.5. Iniciação da cultura	51
3.2.6. Manutenção da cultura	51
3.2.7. Método de exclusão do azul de tripano	52
3.2.8. Estudos de solubilidade.....	53
3.2.8.1. Solubilidade do DMSO no meio de cultura RPMI 1640	53
3.2.8.2. Solubilidade das soluções de porfirina no meio de cultura RPMI 1640	53
3.2.8.3. Solubilidade do DCM no meio de cultura RPMI 1640	53
3.2.9. Estudos de citotoxicidade.....	53
3.2.9.1. Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo método do azul de tripano	54
3.2.9.2. Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo método do MTT.....	54
3.2.9.3. Avaliação da citotoxicidade do DCM pelo método do MTT	54
3.2.9.4. Avaliação da citotoxicidade induzida pelas porfirinas 2-TQP e TCPP.....	54
3.2.10. Método do MTT.....	55
3.2.11. Estudos de fototoxicidade	56
3.2.12. Análise estatística	57
4. Resultados e Discussão	58
4.1. Síntese e caracterização de porfirinas.....	58
4.1.1. 5,10,15,20-tetraquis(cinamil)porfirina	58
4.1.1.1. Síntese da H ₂ TCP pelo método de Adler-Longo	59
4.1.1.1.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis	60
4.1.1.1.2. Caracterização por espectrometria de massa	60
4.1.1.1.3. Caracterização por espectroscopia de ¹ H RMN.....	62
4.1.1.1.4. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ)	63
4.1.1.1.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	64
4.1.1.2. Síntese da H ₂ TCP pelo método de Lindsey	65
4.1.1.3. Síntese da H ₂ TCP pelo método de Zakavi	67
4.1.2. 5,10,15,20-tetraquis(α -hexilcinaldeído)porfirina	68
4.1.3. 5,10,15,20-tetraquis (quinolina-2-il) porfirina (2-TQP)	69
4.1.3.1. Síntese pelo método de Adler-Longo	70
4.1.3.1.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis	70
4.1.3.1.2. Caracterização por HPLC-MS.....	71
4.1.3.1.3. Caracterização por espectroscopia de ¹ H RMN.....	73
4.1.3.1.4. Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ)	74
4.1.3.1.5. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)	75

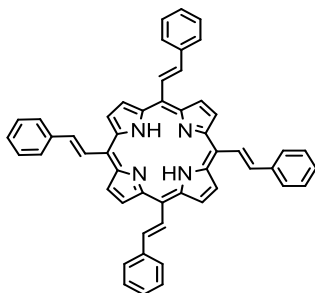
4.1.3.2. Síntese assistida por tecnologia de microondas: ensaio preliminar	76
4.1.4. 5,10,15,20-tetraquis (quinolina-4-il) porfirina (4-TQP)	77
4.1.4.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis	77
4.1.4.2. Caracterização por HPLC-MS	77
4.1.4.3. Caracterização por espectroscopia de ¹ H RMN.....	79
4.1.5. 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina.....	79
4.1.5.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis	80
4.1.5.2. Caracterização por HPLC-MS	81
4.1.5.3. Caracterização por espectroscopia de ¹ H RMN.....	82
4.1.5.4. Rendimento quântico de oxigénio singleto (ϕ_{Δ})	82
4.1.6. Síntese e caracterização de porfirinas: principais conclusões.....	84
4.2. Ensaio biológicos.....	85
4.2.1. Avaliação da citotoxicidade do DMSO nas células HT29	85
4.2.2. Avaliação da citotoxicidade do DCM nas células HT29	87
4.2.3. Avaliação da citotoxicidade induzida pelas porfirinas 2-TQP e TCPP nas células HT29	88
4.2.3.1. Citotoxicidade intrínseca à 2-TQP	88
4.2.3.2. Citotoxicidade intrínseca à TCPP	89
4.2.4. Avaliação da fototoxicidade induzida pelas porfirinas 2-TQP e TCPP nas células HT29.....	90
4.2.4.1. Irradiação com o filtro RG ₆₁₀	91
4.2.4.2. Irradiação com o filtro OG ₅₇₀	92
4.2.4.3. Irradiação na ausência de filtros	94
5. Conclusões	97
6. Bibliografia	99
7. Anexos	108
Anexo I. Mecanismo geral para a síntese de porfirinas meso-substituídas pelo método de Adler-Longo.....	109
Anexo II. Espectro de emissão da lâmpada HLX64640 utilizada na irradiação das culturas de células HT29.....	111
Anexo III. Propriedades ópticas dos filtros RG ₆₁₀ e OG ₅₇₀ e zona de interação com o espectro e absorção das porfirinas 2-TQP e TCPP	112

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Desvio químico
ϵ	Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} cm^{-1}$)
η	Rendimento da reacção de síntese
λ	Comprimento de onda
τ_{Δ}	Tempo de vida do oxigénio singlete
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigénio singlete
A_n	Absorvância medida a n nm
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ATCC	American Type Culture Collection, (banco americano de células em cultura)
ATP	Adenosine triphosphate, (trifosfato de adenosina)
CDK	Cyclin-dependent kinase, (ciclina dependente de cinases)
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor, (inibidor de CDK)
COSY	Espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona

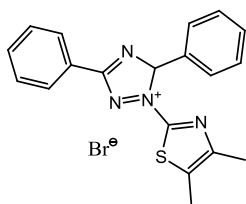


CI	Chemical ionization, (ionização química)
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid, (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid, (ácido etilendiaminotetraacético)
EI	Electron impact, (Ionização por impacto de electrões)
ESI	Electrospray ionization, (ionização por electrospray)
FAB	Fast atom bombardment, (ionização por bombardeamento atómico)
FBS	Fetal bovine sérum, (soro fetal bovino)
FS	Fotossensibilizador
H₂TCP	5,10,15,20-tetraquis(cinamil)porfirina

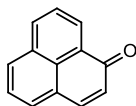


HIF	Hypoxia-inducible factor (factor induzido por hipoxia)
------------	--

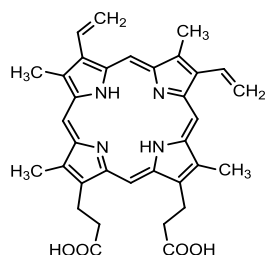
HOMO	Highest occupied molecular orbital, (orbital molecular ocupada de maior energia)
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado da hematoporfirina
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, (cromatografia líquida de elevada performance)
HT29	Linha celular derivada de um adenocarcinoma do cólon humano
IARC	International Agency for Research on Cancer, (Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro)
IC₅₀	Concentração que inibe a proliferação celular em 50%
IT	Ion trap, (“armadilha” de iões)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
J	Constante de acoplamento
LDH	Lactate dehydrogenase, (lactato desidrogenase)
LDL	Low-density lipoprotein, (lipoproteína de baixa densidade)
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital, (orbital molecular desocupada de menor energia)
[M⁺]	ião molecular
[M+H]⁺	ião molecular protonado
[M-H]⁻	ião molecular desprotonado
MP	Metaloporfirina
MS	Mass spectrometry, (espectrometria de massa)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio



m/z	Razão massa/carga
n	Número de experiências independentes
¹O₂	Oxigénio singleto
³O₂	Oxigénio tripleto
DO	Densidade óptica
PBS	Phosphate-buffered saline, (solução salina tamponizada com fosfato)
PH	1 <i>H</i> -Phenalen-1-ona, (Fenalenona)

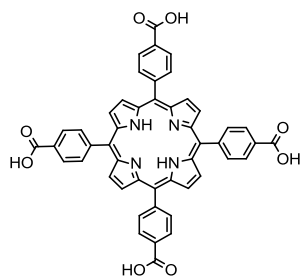


PDT	Photodynamic Therapy, (Terapia Fotodinâmica)
ppm	Partes por milhão
PpIX	Protoporfirina IX

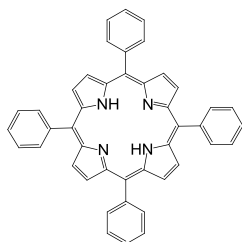


R_f	Retention factor, (factor de retenção)
----------------------	--

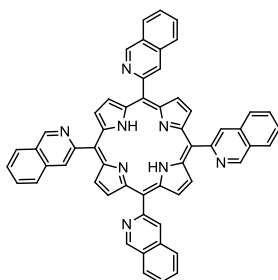
$^1\text{H RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de próton
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
ROS	Reactive oxygen species, (espécies reactivas de oxigénio)
s	Singlete
S₀	Estado fundamental
S₁	Estado excitado singlete
t	Triplete
T₁	Estado excitado tripleto
TAM	Tumor-associated macrophages (macrófagos associados ao tumor)
TCP	5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina



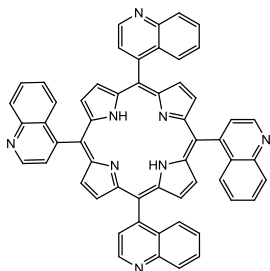
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoracético
TLC	Thin layer chromatography, (cromatografia de camada fina)
TMS	Tetrametilsilano
TPP	5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina



2-TQP 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina



4-TQP 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina



R²	Coeficiente de correlação linear
UV/Vis	Ultravioleta/visível

RESUMO

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, e a sua incidência tem vindo a aumentar. As terapias convencionais como a quimioterapia, cirurgia e radioterapia, possuem efeitos secundários graves que tornam evidente a necessidade de desenvolver uma terapêutica mais eficaz.

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma modalidade promissora para o tratamento de doenças oncológicas. Na PDT, a luz, o oxigénio e o agente fotossensibilizador são combinados para produzir um efeito terapêutico selectivo. Deste modo, a escolha do fotossensibilizador adequado é crucial para potenciar a eficácia do tratamento. Devido às características fotofísicas favoráveis e elevada afinidade para as células cancerígenas, os derivados porfirínicos representam a classe de fotossensibilizadores mais utilizados nas práticas clínicas.

O trabalho experimental subjacente a esta dissertação teve por objectivo a avaliação do potencial fototerapêutico de duas porfirinas, a 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina e a 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina, numa linha celular de adenocarcinoma colorectal humano. Após uma breve introdução às temáticas de maior relevância, a componente de índole experimental foi subdividida em duas partes. Na primeira parte descreveu-se a síntese e caracterização de porfirinas por espectrometria de massa, espectroscopia de UV-Vis e de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN). Determinaram-se também as propriedades fotofísicas destes compostos em termos de emissão de fluorescência e produção de oxigénio singleto. Por sua vez, a segunda parte consistiu na avaliação do perfil de actividade biológica destes derivados porfirínicos na linha celular HT29, mais concretamente na determinação da viabilidade celular antes e após a irradiação das culturas celulares.

Os resultados alcançados indiciam que os derivados porfirínicos estudados são potenciais candidatos para o tratamento fototerapêutico de doenças oncológicas. No entanto, a aplicação clínica destas porfirinas requer a realização de a localização subcelular exacta destes fotossensibilizadores e a via que predomina na destruição estudos adicionais que permitam determinar do tecido tumoral. De igual modo, é fundamental estabelecer a correlação dos resultados obtidos *in vitro* com estudos *in vivo* com modelos animais.

Palavras-Chave: Cancro, Terapia Fotodinâmica, Fotossensibilizador, Porphirinas, Cultura de Células

ABSTRACT

Cancer is one of the main death cause worldwide, and its incidence has been rising. Conventional cancer treatments, such as chemotherapy, surgery and radiotherapy, have serious side effects that make evident the need to develop a most effective treatment.

Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic modality for oncological diseases. In PDT, light, oxygen and a photosensitizing drug are combined to produce a selective therapeutic effect. In this way, the selection of a suitable photosensitizer is crucial to improve the treatment efficiency. Due to the favourable photophysical characteristics and high affinity for cancer cells, porphyrin derivatives represent the class of photosensitizers most widely used in clinical practice.

The experimental work underlying this thesis aimed the phototherapeutic potential evaluation of two porphyrins, the 5,10,15,20-tetrakis(quinolin-2-yl) porphyrin and 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin, in an human colorectal adenocarcinoma cell line.

After a brief introduction to the most relevant topics, the experimental component was subdivided in two parts. The first part describes porphyrin synthesis and its characterization by mass spectrometry, UV-Vis spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance (1H NMR). We also evaluated the photophysical properties of these compounds in terms of fluorescence emission and singlet oxygen production. The second part consisted on the analysis of the biological activity profile of these porphyrin derivatives in the HT29 cell line, more specifically in the cell viability measurement before and after cell cultures irradiation.

The results obtained indicate that the porphyrin derivatives studied are potential candidates for the phototherapeutic treatment of malignancies. However, the clinical application of these porphyrins requires additional studies to determine the precise subcellular localization of these photosensitizers and the predominant pathway in the tumor tissue destruction. Similarly, it is essential to establish the correlation of *in vitro* results to *in vivo* studies with animal models.

Keywords: Cancer, Photodynamic Therapy; Photosensitizer, Porphyrins, Cell Culture

NOMENCLATURA DOS MACROCÍCLOS TETRAPIRRÓLICOS^{i, ii, iii}

O primeiro sistema de nomenclatura para compostos macrocíclicos tetrapirrólicos foi desenvolvido por Hans Fischer. Neste sistema, as unidades pirrólicas são identificadas pelas letras A, B, C e D. Cada unidade pirrólica é constituída pelos carbonos β , numerados de 1 a 8, e pelos carbonos α adjacentes aos azotos, que não se apresentam numerados. Os carbonos das pontes metino interpirrólicas, designados carbonos *meso*, são representados pelas letras gregas α , β , γ e δ . (Figura I). Não obstante o desenvolvimento deste sistema de nomenclatura, Fischer adoptou também denominações triviais, geralmente atribuídas em conformidade com a (dis)função metabólica associada ou a ocorrência natural dos compostos em análise (*e.g.*, uroporfirina isolada da urina de pacientes com porfíria, uma disfunção do metabolismo de porfirinas).

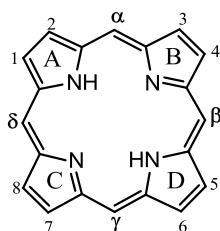


Figura I. Sistema de numeração do macrociclo tetrapirrólico proposto por Hans Fischer.

Com o grande progresso da química das porfirinas, o sistema de Fischer rapidamente se tornou insuficiente. Deste modo, era fundamental desenvolver um sistema de nomenclatura sistemática que eliminasse as ambiguidades resultantes da nomenclatura trivial. Foi neste contexto que surgiu, em 1979, um sistema de nomenclatura proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Neste sistema, os carbonos são numerados de 1 a 20, onde as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 correspondem aos carbonos β , as posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 aos carbonos α pirrólicos e as posições 5, 10, 15 e 20 aos carbonos *meso*. Este sistema inclui também a numeração dos azotos pirrólicos de 21 a 24 (Figura II). Quando o macrociclo é substituído, os grupos substituintes são ordenados alfabeticamente e referenciados pelo(s) número(s) do(s) átomo(s) de carbono no(s) qual(ais) ocorreu a substituição, sendo o número de carbonos do grupo substituinte representado em expoente.

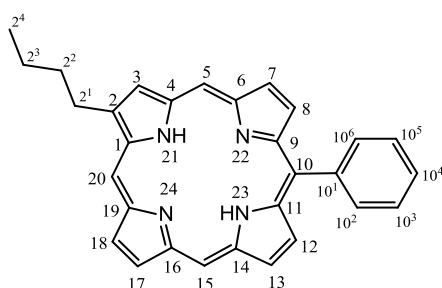


Figura II. Sistema de numeração do macrociclo base e substituintes proposto pela IUPAC.

Nesta dissertação adoptou-se preferencialmente a nomenclatura sistemática proposta pela IUPAC. Porém, e por uma questão de simplicidade, em casos pontuais utilizou-se a nomenclatura de Fisher.

ⁱ Moss G.P. (1987), *Nomenclature of Tetrapyrroles*, Pure & Appl. Chem. **59**, 779

ⁱⁱ Milgrom L.R. (1987), *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press

ⁱⁱⁱ Dolphin, D. (1978), *The Porphyrins: Structure and Synthesis Part A*, vol.1, Academic Press Inc, Nova Iorque

1. Introdução

1.1. Cancro: Considerações gerais

O crescimento e desenvolvimento normal de um organismo depende de um equilíbrio altamente regulado entre as vias de sinalização que promovem o crescimento celular e as vias que promovem a inibição do crescimento e a morte celular. Como consequência, a perturbação desta homeostase traduz-se por situações patológicas ^[1-3].

A transformação de uma célula normal numa célula cancerígena é um processo gradual que resulta da acumulação progressiva de alterações genéticas e epigenéticas, nomeadamente a aquisição de mutações com ganho de função que resultam na activação de genes que estimulam a proliferação celular, os proto-oncogenes, e a aquisição de mutações com perda de função que resultam na inactivação de genes envolvidos na inibição da proliferação celular, os genes supressores de tumores ^[1,2,4-7]. O cancro é assim definido como um processo patológico que ocorre em várias etapas e que envolve alterações dinâmicas do genoma. À luz da teoria evolutiva de Darwin, estas alterações conferem vantagens ao nível do crescimento e sobrevivência celular e, por isso, ao serem seleccionadas, promovem a transformação maligna ^[8,9].

No final do século XX, Hanahan e Weinberg propuseram que o genótipo das células cancerígenas era a manifestação de pelo menos seis alterações fundamentais na fisiologia celular: aquisição de um potencial replicativo ilimitado; auto-suficiência em termos de sinais de crescimento; insensibilidade aos sinais inibitórios do crescimento e evasão à morte celular programada; capacidade angiogénica; invasão de tecidos e metástase ^[8]. Recentemente, em 2011, Hanahan e Weinberg reformularam as características anteriormente propostas e adicionaram a reprogramação do metabolismo energético e a evasão à

destruição pelo sistema imunitário. Estas características são comuns à maioria ou talvez a todos os tipos de tumores humanos e podem, por isso, ser consideradas como uma espécie de assinatura da doença ^[6].

Com base nas características das células tumorais podemos definir dois tipos de tumores: os benignos e os malignos. Enquanto os tumores benignos são geralmente inofensivos porque não invadem os tecidos adjacentes, os tumores malignos proliferam muito rapidamente, invadem os tecidos adjacentes e formam tumores secundários. A metastização é favorecida pela angiogénese, um processo complexo que envolve a formação de novos vasos sanguíneos, e facilita o fornecimento contínuo de nutrientes e oxigénio ao tumor, responsáveis pela sua rápida proliferação ^[1,2]. Contudo, as células mais distantes dos capilares sanguíneos experimentam um microambiente hipóxico, caracterizado pela carência de nutrientes e oxigénio, e por um pH ácido ^[7,11]. Ainda assim, estas células têm a capacidade de reprogramar o seu metabolismo energético para se adaptarem ao novo microambiente ^[6].

Deste modo, enquanto em normóxia as células geram a energia necessária à sua proliferação e sobrevivência através do metabolismo aeróbio, levando a cabo a glicólise e o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa mitocondriais, as células em hipóxia passam do metabolismo aeróbio para a fermentação láctica ^[6,7,11]. Apesar de os mecanismos subjacentes a esta adaptação não estarem totalmente elucidados, a activação de factores induzidos por hipoxia (HIFs), em especial do HIF-1, desempenha um papel determinante ^[12]. De facto, existem estudos que comprovam que o HIF-1 promove a sobreexpressão de genes que codificam a expressão de enzimas glicolíticas, dos transportadores membranares de glicose (*e.g.*, Glut-1) e da lactato desidrogenase (LDH) que catalisa a conversão do piruvato resultante da glicólise a lactato ^[7,11,13].

Curiosamente, as células cancerígenas reprogramam o seu metabolismo energético e, mesmo na presença de oxigénio, produzem energia necessária à sua proliferação através do mecanismo glicolítico. Este fenómeno, designado glicólise aeróbia ou efeito de Warburg em homenagem a Otto Warburg, o cientista que observou este efeito pela primeira vez e em 1931 recebeu o Prémio Nobel da Medicina pelos seus estudos sobre o metabolismo energético das células neoplásicas ^[14,15], ainda hoje é paradoxal. Warburg supôs que estas células possuíam danos permanentes no metabolismo oxidativo, responsáveis pelo aumento do fluxo glicolítico ^[12]. No entanto, esta hipótese foi posteriormente posta em causa pela realização de estudos exaustivos em linhas celulares tumorais hiperproliferativas que não revelaram anomalias no seu metabolismo oxidativo ^[12,13]. Assim, a preferência pela glicólise aeróbia é, à primeira vista, um processo incompreensível, uma vez que, além de energeticamente menos eficaz que metabolismo aeróbio, este processo resulta na produção de uma quantidade bastante significativa de ácido láctico, responsável pela acidificação do meio extracelular e pela consequente degradação da matriz extracelular. Contudo, a desvantagem aparente é, na verdade, uma vantagem de sobrevivência e proliferação. Na verdade, apesar do rendimento energético ser bastante reduzido, o fluxo glicólico é extraordinariamente elevado e, dessa forma, a percentagem de ATP sintetizada pela glicólise pode exceder significativamente a percentagem sintetizada pela fosforilação oxidativa. Adicionalmente, a degradação da matriz extracelular favorece o processo de invasão dos tecidos adjacentes ^[11,12].

De acordo com a Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC), em 2008 foram detectados cerca de 12,7 milhões de novos casos e mais de 7,6 milhões de mortes por cancro.

O cancro representa a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento. Contudo, apesar da taxa de incidência verificada nos países desenvolvidos ser de aproximadamente o dobro da verificada nos países em desenvolvimento, as taxas de mortalidade não acompanham a mesma tendência. Estas discrepâncias reflectem as diferenças existentes nas práticas de diagnóstico e tratamento aplicadas em ambas as classes demográficas ^[16,17].

Factores endógenos como, por exemplo, a ocorrência de erros durante a replicação, a instabilidade das bases azotadas que constituem a dupla hélice do DNA ou a acção de radicais livres formados durante o metabolismo celular, são responsáveis pelo aumento da taxa de incidência do cancro. Adicionalmente, também a hereditariedade e a acção de agentes exógenos, nomeadamente a radiação ionizante e de agentes cancerígenos químicos e ambientais, em particular de substâncias presentes no fumo do tabaco e nas emissões industriais, são factores preponderantes para o aumento da incidência [1,2,18]. De igual modo, também o estilo de vida (*e.g.*, dieta e sedentarismo) representa um factor determinante no desenvolvimento da patologia [16,18].

O cancro é considerado o maior problema de saúde pública. Ainda assim, devemos adoptar medidas que permitam reduzir os comportamentos de risco. Com efeito, apenas 5 a 10% do total de casos são causados pela “herança” de genes mutados, enquanto os restantes 90 a 95% estão relacionados com o ambiente e o estilo de vida. Desses, cerca de 30% são atribuídos ao fumo do tabaco, 35% à dieta, 14 a 20% à obesidade, 18% às infecções e 7% à radiação e poluentes ambientais, como sílica e asbestos [18,19]. No caso específico da dieta, foram efectuados estudos epidemiológicos que comprovaram a existência de uma relação directa entre a ingestão de gorduras e o desenvolvimento de cancro e uma relação inversa entre a ingestão de fibras dietéticas, frutas e vegetais e o desenvolvimento de adenomas colorectais. Estes últimos constituem uma excelente fonte de fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos (*e.g.*, polifenóis), com capacidade para suprimir o processo inflamatório associado ao desenvolvimento e progressão tumoral [18-20].

A compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na etiologia da patologia, nomeadamente os aspectos relativos à regulação do ciclo celular e das vias de sinalização envolvidas na regulação da morte celular programada, são fundamentais para a detecção precoce e sucesso do tratamento [2,7,10]. As terapias convencionais (*e.g.*, cirurgia, radioterapia e quimioterapia), apesar de eficazes em alguns estadios da doença, são invasivas e apresentam efeitos secundários dramáticos para os pacientes. De facto, estas terapias danificam não só as células cancerígenas mas também os tecidos circundantes, promovendo o aparecimento de uma resposta inflamatória, geralmente associada à resistência à terapia [19,20]. Neste sentido, é fundamental desenvolver protocolos terapêuticos mais selectivos que permitam a diminuição dos efeitos secundários. Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma abordagem terapêutica bastante promissora, na medida em que é não-invasiva e é bastante localizada, possibilitando a destruição selectiva das células cancerígenas.

1.1.1. Ciclo celular: implicações na patologia

A reprodução, crescimento e desenvolvimento de um organismo funcional requer a ocorrência de diversas divisões celulares. A divisão celular é um processo altamente regulado que compreende a duplicação do material genético da *célula-mãe* e a sua posterior divisão em duas *células-filha*, cada uma com um cromossoma igual ao da célula parental. A este processo de duplicação e divisão designa-se ciclo celular [2,10,21-23].

O ciclo celular eucariota encontra-se dividido em duas grandes fases: a interfase e a mitose (M) (Figura 1.1).

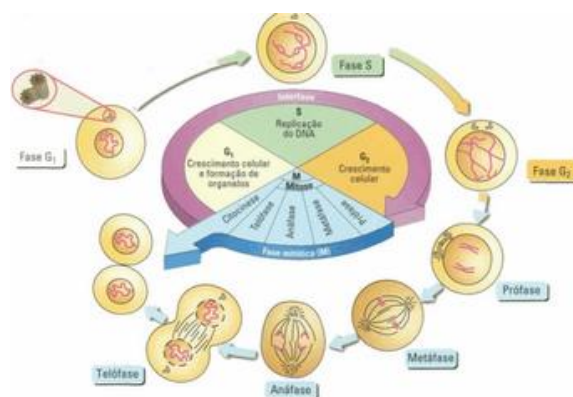


Figura 1.1. Representação dos eventos que constituem o ciclo celular eucariota.

A interfase, definida como o período que decorre entre o fim de uma fase M e o início da seguinte, é constituída pelas sub-fases G1, S e G2, nas quais ocorrem eventos distintos e bem definidos. Assim, durante a fase G1 verifica-se uma intensa actividade biossintética, em especial de RNA e proteínas necessárias à replicação do DNA durante a fase de síntese (S). A replicação do DNA tem início em locais específicos da molécula, as origens de replicação, onde se dá a abertura da dupla hélice e a exposição do DNA às enzimas que levam a cabo a sua duplicação. Na sequência da duplicação do DNA, é também necessária a síntese de histonas, proteínas que permitem um melhor empacotamento do DNA. Após a replicação do DNA dá-se a fase G2, uma fase na qual se verifica o crescimento da célula e esta se prepara para a divisão, sintetizando as moléculas necessárias ao processo (*e.g.*, centríolos^a). Após a fase G2 a célula entra na fase M. Esta fase é constituída por duas grandes etapas: a mitose, um processo que permite a divisão nuclear e que compreende quatro sub-fases: profase, metáfase, anáfase e telófase, e a citocinese, um processo que permite a divisão da célula. De forma sumária, durante a profase ocorre a condensação dos cromossomas, constituídos por dois cromátídeos unidos pelo centrómero, e a migração dos centríolos para pólos opostos da célula, dando-se início à formação do fuso acromático. O nível máximo de condensação é atingido na metáfase, na qual os cromossomas se encontram dispostos na placa equatorial. A clivagem dos centrómeros e segregação dos cromossomas ocorre na anáfase, à qual se segue a telófase, a sub-fase em que há a reorganização da membrana nuclear. Por fim, a citocinese permite separação do citoplasma e a individualização das duas células, que apresentam exactamente a mesma informação genética^[2,9,10,22,24].

O destino de cada célula que constitui um organismo é determinado não só por sinais internos mas também por sinais provenientes do meio envolvente, nomeadamente a presença ou ausência de factores de crescimento (mitogénicos), a existência de sinais inibitórios ou a quantidade de nutrientes disponíveis. Assim sendo, após o fim de um ciclo celular a célula decide, consoante a natureza do estímulo recebido, se inicia um novo ciclo ou se deixa de proliferar e entra numa fase não-proliferativa designada G₀, onde pode permanecer por tempo indeterminado até que as condições sejam favoráveis^[2,3,9,10,22].

O ciclo celular envolve uma sequência complexa de eventos, que estão sujeitos a vários pontos de controlo que têm por objectivo detectar possíveis defeitos na síntese do DNA e segregação dos cromossomas^[2,25,26]. A passagem à fase seguinte do ciclo sem que a anterior esteja devidamente concluída leva à acumulação de anomalias sucessivas no DNA, as quais podem culminar na instabilidade

^a Os centríolos são estruturas cilíndricas constituídas por microtúbulos. Estas estruturas estão envolvidas na formação do fuso mitótico.

genómica que está na origem da transformação maligna ^[2,3]. Apesar de em situações normais a detecção de erros promover a interrupção do ciclo, facultando o tempo necessário à sua reparação, há casos em que tal não é possível, quer devido ao dano excessivo do DNA, quer devido à falha dos mecanismos de reparação. Nestas circunstâncias, a célula pode entrar em senescência ou induzir a sua própria morte por um processo designado apoptose. Todavia, há casos em que também estes mecanismos falham e as células proliferam indefinidamente, adquirindo uma série de alterações genéticas responsáveis pela progressão tumoral ^[2,26,27].

O primeiro ponto de controlo, designado ponto de restrição (Arthur Pardee, 1974), ocorre no final de G1, e avalia a qualidade do material genético. Este ponto de controlo tem como desígnio evitar a replicação de DNA danificado durante a fase S. O ponto de controlo seguinte dá-se na fase S e permite averiguar a fidelidade da replicação e induzir a activação dos mecanismos de reparação caso seja necessário (*e.g.*, quebras na cadeia do DNA). Por fim, o ponto de controlo G2/M garante que todo o material genético foi replicado sem erros e que a célula está apta para entrar em mitose, onde ocorrem outros pontos de controlo que avaliam se as condições continuam favoráveis à divisão ^[2,25,27].

O ciclo celular é regulado por uma subfamília de cinases dependentes de ciclinas (CDK), cuja actividade é modulada por activadores, as ciclinas, e inibidores, designados CDKIs (*e.g.*, as proteínas supressoras de tumores p15, p21, p57) ^[2,26,28,29]. Apesar de existirem múltiplos *loci* que codificam CDKs e ciclinas, apenas alguns complexos ciclina-CDK estão envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular (*e.g.*, CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 e as ciclinas do tipo A, B, D e E) ^[26,30]. O modelo bioquímico actualmente aceite para explicar a regulação do ciclo celular, modelo clássico, defende que todos os eventos (G1, S, G2 e M) são regulados por complexos ciclina-CDKs específicos. Assim, enquanto os complexos ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 e ciclina E-CDK2 regulam a progressão através do ponto de restrição, a fase S é controlada pelo complexo ciclina A-CDK2 e a progressão de G2 para a mitose pelo complexo ciclina B-CDK1 ^[25,26,31].

Para além dos complexos ciclina-CDK existem outros elementos essenciais à regulação do ciclo celular, dos quais se destaca, pela sua importância, o factor de transcrição p53. O p53, conhecido como o “guardião do genoma”, é um factor-chave na detecção de erros no DNA e inibição da sua propagação às gerações celulares subsequentes. De forma sucinta, o p53 é activado na sequência da detecção de danos no DNA, induzindo o aumento da transcrição de uma série de genes-alvo, nomeadamente os inibidores das CDK responsáveis pela paragem do ciclo celular até à completa reparação do DNA. Porém, há casos em que os danos são tão severos ou envolvem um custo energético tão excessivo que não é possível efectuar a sua reparação. Nestas circunstâncias, o P53 regula a activação de proteínas envolvidas no controlo da apoptose, nomeadamente de proteínas pró-apoptóticas responsáveis pela remoção das células danificadas. Com base nos aspectos supramencionados pode dizer-se que o p53 apresenta um carácter dual ao permitir, por um lado, a activação de proteínas de reparação do DNA ou, por outro lado, desencadear a morte das células cujos danos são irreparáveis ^[1,3,10,32-38].

O cancro pode ser entendido como uma doença do ciclo celular ^[3,37]. De facto, a análise tumoral a nível molecular revelou que a frequência de mutações nos elementos reguladores do ciclo celular era muito significativa, com especial relevo para a perda de função do factor de transcrição p53, mutado em mais de 50% dos cancros humanos. Esta mutação desencadeia consequências drásticas, na medida em que permite que células geneticamente danificadas proliferem de forma indiscriminada, acumulando uma série de danos genéticos ^[1,10,33,39]. Além da perda de função do p53, também a sobreexpressão das ciclinas e a perda de função dos seus inibidores endógenos são evidentes. Estas alterações traduzem-se directamente numa proliferação celular descontrolada e na instabilidade genómica e cromossómica que caracterizam o cancro (Figura 1.2).

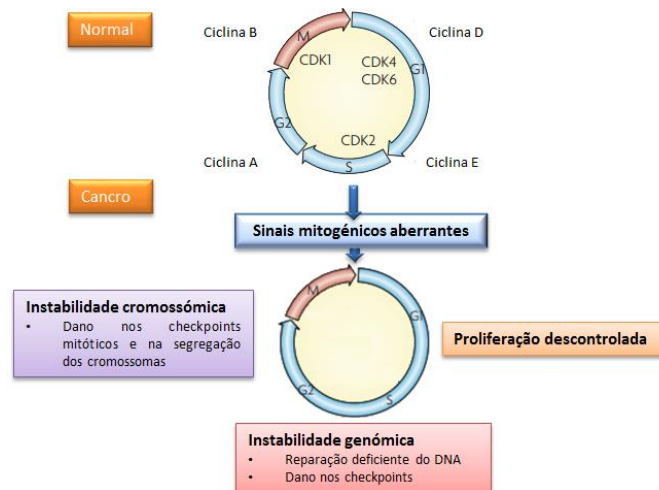


Figura 1.2. Representação esquemática dos processos envolvidos na transformação neoplásica [adaptado de 26].

A resistência às terapias convencionais é uma das principais causas de insucesso no tratamento de pacientes com cancro e, por conseguinte, o tratamento destes pacientes é considerado o maior desafio da medicina moderna ^[2,39].

As diferenças entre células normais e cancerígenas, assim como a compreensão dos mecanismos moleculares associados à patologia permitiram descobrir alguns dos elementos essenciais à regulação das vias de sinalização envolvidas no processo neoplásico. Estas descobertas contribuíram não só para a percepção da patologia em si, mas também para o desenvolvimento de terapêuticas que tirem partido da instabilidade genómica inerente ao cancro e tenham por base esses alvos moleculares ^[2,3,32,39]. Como já referido, a progressão tumoral está relacionada com o desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Por conseguinte, os elementos envolvidos na regulação do ciclo celular apresentam-se como alvos bastante apetecíveis para intervenção terapêutica ^[35,37,40]. No entanto, e devido à heterogeneidade tumoral, a realização de perfis de expressão génica identifiquem a activação/desactivação de genes específicos permite direccionar o tratamento e, por conseguinte, diminuir os efeitos secundários e melhorar a qualidade de vida dos pacientes ^[4,32,41].

1.2. Terapia Fotodinâmica

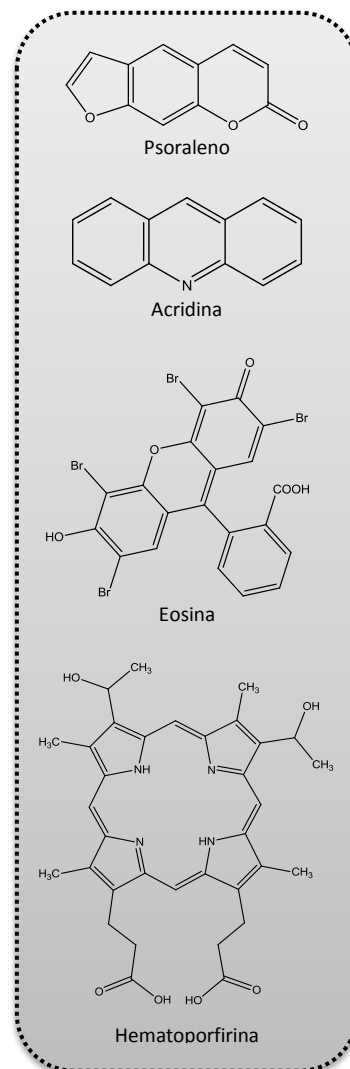
A Terapia Fotodinâmica (PDT), cujos fundamentos são pormenorizados na secção 1.2.2, é actualmente aceite para o tratamento de doenças oncológicas e não-oncológicas, como acne, eczema, psoríase, arteriosclerose e artrites, entre outras.

1.2.1. Contextualização Histórica

As propriedades terapêuticas da luz são conhecidas há mais de 4000 anos no seio das antigas civilizações Egípcia, Romana, Chinesa e Grega, onde o efeito dos extractos de plantas (*e.g.*, psoraleno) era combinado com a luz solar para o tratamento de doenças como vitiligo, psoríase e cancro de pele [42-46]. Os primórdios da Terapia Fotodinâmica datam de 1900, quando Oscar Raab, estudante de medicina sob orientação do Professor Hermann von Tappeiner, observou que a acção combinada da acridina com a luz era letal para as paramécias, enquanto a acção isolada destes agentes era inócua [45,46,49]. Em 1901 Niels Filsen usou luz vermelha e UV no tratamento de pacientes com varíola e tuberculose cutânea, e o seu trabalho em fototerapia foi laureado com o Prémio Nobel da Medicina em 1903. Ainda em 1901, Prime utilizou eosina no tratamento de pacientes com epilepsia, e evidenciou o aparecimento de reacções cutâneas. Esta observação esteve na base do trabalho desenvolvido por von Tappeiner e Jesionek, que em 1903 combinaram a eosina com a luz para o tratamento de tumores de pele. Após identificarem o oxigénio como um elemento fundamental da reacção de fotossensibilização, von Tappeiner e Jodlbauer introduziram, em 1907, o termo “acção fotodinâmica” para descrever este fenómeno [43,45,46,48].

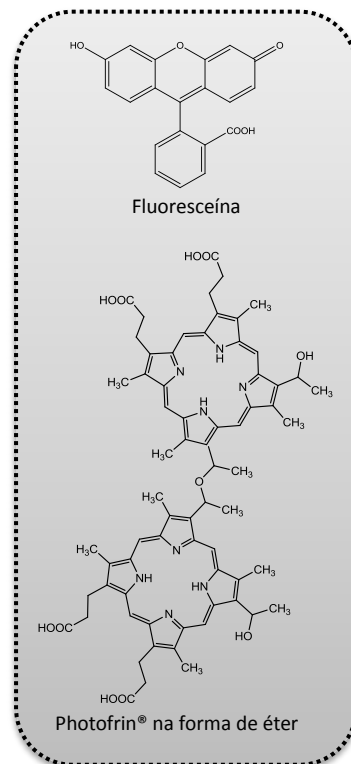
Não obstante as primeiras aplicações médicas da PDT envolverem a utilização da eosina, a hematoporfirina (HP) passou ser o fotossensibilizador (FS) de eleição. Esta porfirina, descoberta em 1841 por Scherer, foi obtida por tratamento do sangue seco com ácido sulfúrico concentrado, para remoção do ferro. Contudo, as propriedades espectroscópicas desta porfirina (*e.g.*, espectro de absorção e de fluorescência) só foram determinadas em 1867, por Thudichum [48]. Em 1911, Hausmann descreveu a ocorrência de reacções de fotossensibilidade após o tratamento de ratinhos com hematoporfirina. Os efeitos secundários em Humanos foram confirmados por Friedrich Meyer-Betz em 1913, após auto-administração de 200 mg de HP [45,46,48,49].

Em 1924, e após observar que a fluorescência intrínseca ao tecido tumoral irradiado era consideravelmente superior à dos tecidos saudáveis, Policard deduziu que as porfirinas se acumulavam preferencialmente nos tumores. Esta observação foi posteriormente corroborada por Auler e Banzer em 1942, que verificaram que a HP administrada intravenosamente a ratinhos apresentava grande afinidade para os tumores primários e metastáticos. A interpretação destes resultados fez supor que a acumulação do fotossensibilizador no tumor protege os tecidos saudáveis envolventes dos danos provocados pela irradiação [46-48]. Durante vários anos utilizou-se a Hp como agente fotossensibilizador. Porém, em 1955 Samuel Schwartz demonstrou que esta porfirina era, na verdade, uma mistura de porfirinas com diferentes propriedades físico-químicas, e derivatizou-a por dissolução do crude numa mistura de ácido



acético glacial com ácido sulfúrico concentrado e posterior neutralização da solução resultante com acetato de sódio. A porfirina obtida é designada por “derivado da hematoporfirina” (HpD) [45,46]. No início de 1960, Richard Lipson e Edward Baldes utilizaram a HpD obtida por Schwartz na detecção de tumores, e demonstraram que este derivado era eficazmente captado pelos tecidos tumorais [45,48].

Não obstante a importância das experiências preliminares levadas a cabo por von Tappeiner e Jesionek, o potencial terapêutico da PDT foi amplamente negligenciado até 1972, ano em que Ivan Diamond destruiu células de glioma de rato, *in vitro* e *in vivo*, por activação da HP pela luz [50]. Em 1975, Thomas Dougherty demonstrou que a fluoresceína podia ser usada de modo similar para o tratamento do cancro mamário em ratinhos [46,51]. Em 1976, o urologista John F. Kelly eliminou células Humanas de carcinoma da bexiga, transplantadas em ratinhos imunossuprimidos, por acção combinada da luz com HpD. Motivado pelo sucesso obtido, Kelly realizou, em colaboração com Snell, o primeiro estudo clínico em Humanos [43,51,52]. Em 1978, Dougherty coordenou o primeiro ensaio clínico em grande escala e descreveu a resposta de vários tipos de tumores, incluindo carcinomas da mama, cólon, próstata e de melanomas, ao tratamento mediado por HpD [53]. Não obstante a sua utilização em ensaios clínicos, David Kessel comprovou, no início da década de 80 do século XX, que o HpD era constituído por monómeros inactivos e por dímeros activos que se localizavam no tecido tumoral, e nos quais as unidades de porfirina se interligavam por ligações éster ou éter [54]. Dougherty efectuou a purificação parcial do HpD por remoção dos monómeros, e a mistura resultante foi denominada de Photofrin II [44,48,49]. O Photofrin® foi o primeiro fotossensibilizador aprovado, pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1993, e comercializado para o tratamento do cancro [44,47,53,55].



A realização de ensaios clínicos em Humanos impulsionou a criação de uma série de protocolos clínicos, e estabeleceu um ponto de viragem na investigação clínica do cancro e na consolidação do potencial da Terapia Fotodinâmica [43,45,55]. Com esta evolução surgiu a necessidade de desenvolver novos fotossensibilizadores que permitissem colmatar as insuficiências do Photofrin®. Com efeito, este FS de 1ª geração, apesar de eficaz e amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de cancro, é quimicamente heterogéneo e apresenta um coeficiente de absorção molar muito baixo. Por conseguinte, a necessidade de aumentar substancialmente a dose de luz e de fármaco para que se consiga erradicar o tumor, resulta numa fotossensibilidade da pele excepcionalmente prolongada [56]. A Figura 1.3 representa o cronograma dos principais eventos que marcaram a história da PDT.

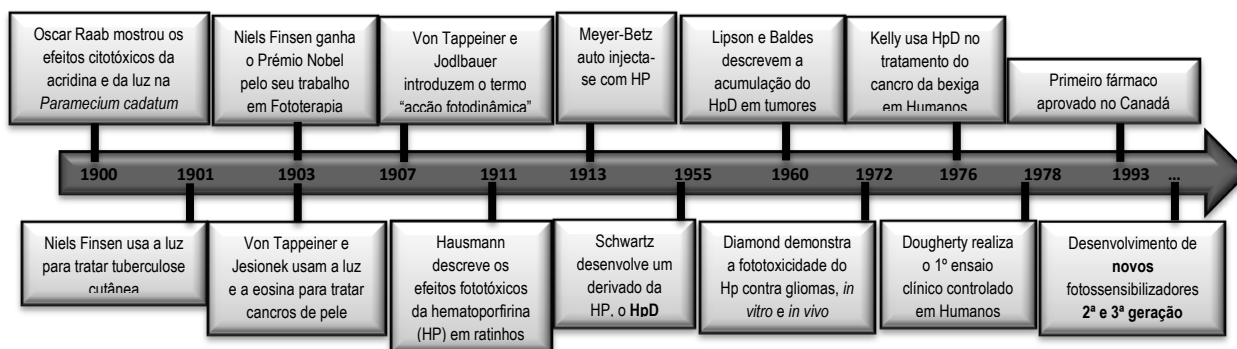


Figura 1.3. Eventos que marcaram a evolução histórica da Terapia Fotodinâmica. Do fundamento da técnica ao desenvolvimento de novos fotossensibilizadores [adaptado de 53].

1.2.2. Fundamentos da Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade terapêutica, minimamente invasiva, clinicamente aprovada para o tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas (*e.g.*, dermatológicas, oftalmológicas, etc) [58-60]. De forma sumária, o procedimento consiste na administração de um agente fotossensibilizador (FS) e posterior irradiação do local com luz visível de comprimento de onda adequado (Figura 1.4). Esta terapia, que resulta na destruição selectiva do tumor, permite minimizar os danos nos tecidos adjacentes e os efeitos secundários inerentes às terapias convencionais [58, 61].

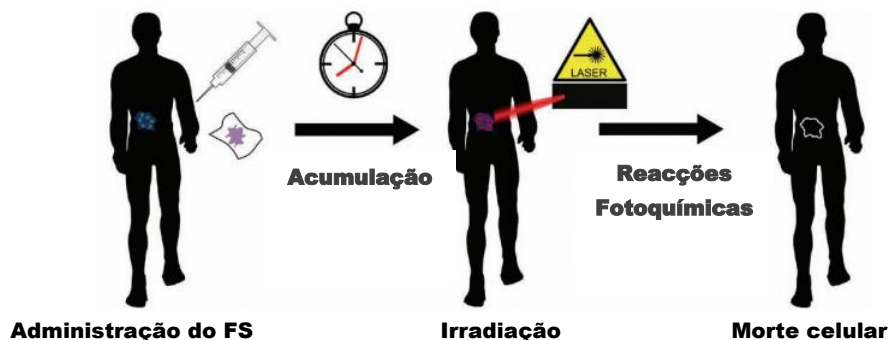


Figura 1.4. Princípio da Terapia Fotodinâmica. Após a administração e acumulação do fotossensibilizador no tecido alvo, efectua-se a irradiação do tecido com luz de comprimento de onda adequado. A activação do FS, por absorção da luz, desencadeia uma série de reacções fotoquímicas responsáveis pela destruição das células cancerígenas.

Numa perspectiva clínica, o FS é administrado de forma tópica ou sistémica, e acumula-se preferencialmente no tecido tumoral. Os factores que determinam esta acumulação selectiva não estão ainda completamente elucidados [62]. Porém, diversos estudos apontam para uma dependência com as características estruturais do FS e com as propriedades fisiológicas intrínsecas às células tumorais [48,62]. Este aspecto é abordado com maior detalhe na secção 1.2.3.3. Algum tempo após a administração do FS, que depende da farmacocinética do fármaco e permite maximizar a sua retenção no tumor, efectua-se a irradiação localizada do tecido lesado com luz visível de comprimento de onda adequado. A absorção de energia promove a activação e transição do FS do estado fundamental (^1FS) para o estado excitado singleto ($^1\text{FS}^*$) (Figura 1.5). O FS no estado excitado singleto é bastante instável (tempo de vida de 10^{-6} a 10^{-9} segundos) e pode reverter ao estado fundamental ou transitar para o estado tripleto, mais estável (tempo de vida de 10^{-3} segundos), por conversão intersistemas^a. O retorno ao estado fundamental pode ocorrer com dissipação de calor (processo não-radiativo) ou por emissão de fluorescência, um processo radiativo que permite determinar a localização exacta do FS na célula, e possibilita a sua utilização como marcador tumoral em fotodiagnóstico [57,60,63-65]. Porém, o efeito terapêutico só é alcançado quando o fotossensibilizador se encontra no estado excitado tripleto ($^3\text{FS}^*$), e interage com o oxigénio molecular ($^3\text{O}_2$). Neste estado, existem dois mecanismos que elucidam a destruição das células tumorais após o tratamento fotodinâmico: a reacção do tipo I e a reacção do tipo II. A reacção do tipo I caracteriza-se pela transferência de electrões ou prótons do $^3\text{FS}^*$ para um substrato (*e.g.*, membrana celular ou biomoléculas) e formação de radicais livres que, ao interagirem com o oxigénio molecular, dão origem a produtos oxigenados, nomeadamente a aniões superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radicais hidroxilo (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Por sua vez, a reacção do tipo II envolve a transferência de energia do $^3\text{FS}^*$ para o

^a Transição entre dois estados electrónicos com diferentes multiplicidades de spin.

oxigénio molecular, e a formação de oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$). O $^3\text{FS}^*$ no estado excitado tripleto pode retornar ao estado fundamental com emissão de fosforescência [59,64-67,69].

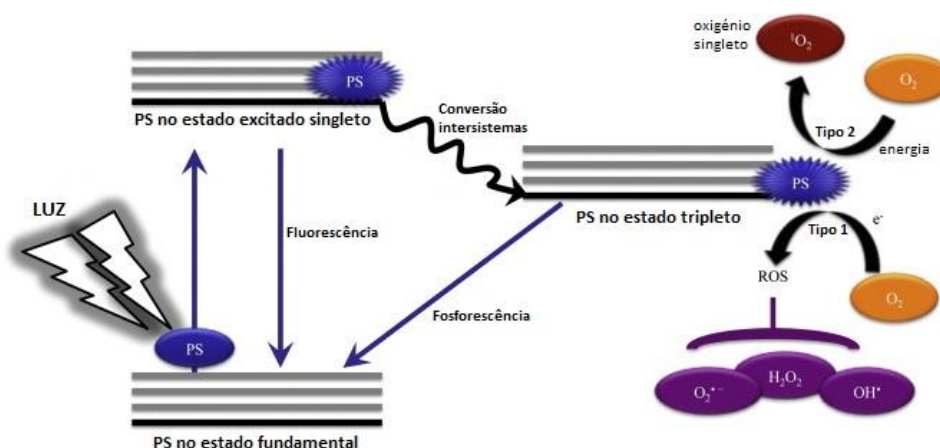


Figura 1.5. Diagrama de Jablonski representativo do processo de fotossensibilização. A absorção de um fóton de luz promove a excitação e transição do FS do estado fundamental para o estado excitado singleto. Neste estado, o FS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou passar ao estado excitado tripleto onde pode reagir com o oxigénio molecular de duas formas distintas (reação tipo I e reação tipo II) e formar espécies reactivas de oxigénio [adaptado de 66].

Não obstante as reacções do tipo I e do tipo II poderem ocorrer em simultâneo, a contribuição individual de cada reacção depende de factores como as características e localização do fotossensibilizador, e a concentração intracelular do oxigénio molecular [53,57,58,63,65,68,69]. Porém, e independentemente de qual das reacções é a predominante, o efeito global de ambas consiste na oxidação e destruição das células alvo [69].

1.2.3. Componentes activos em PDT: luz, oxigénio e fotossensibilizadores

A Terapia Fotodinâmica é uma técnica selectiva que depende da acção de três componentes essenciais: o fotossensibilizador (FS), a luz visível e o oxigénio molecular ($^3\text{O}_2$). A combinação destes elementos, inócuos *per se*, desencadeia a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) responsáveis pela inactivação e destruição das células tumorais [57,68,70,71].

1.2.3.1. Luz

A intensidade da luz que incide no tecido alvo determina a eficácia do tratamento fotodinâmico e o tipo de resposta anti-tumoral [68,72]. Por conseguinte, é essencial compreender que o modo de propagação da luz nos tecidos está sujeita a processos de reflexão, absorção e dispersão. A extensão com que estes processos ocorrem depende do comprimento de onda utilizado, que determina a profundidade de penetração da luz no tecido (Figura 1.6), e das propriedades e heterogeneidades do tecido (*e.g.*, macromoléculas, organelos) [68,70].

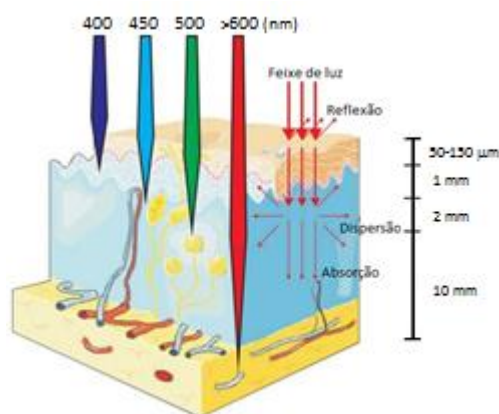


Figura 1.6. Penetração da luz nos tecidos em função do comprimento de onda de excitação [adaptado de 60].

A absorção de luz pelos cromóforos biológicos (Figura 1.7), nomeadamente a hemoglobina (Hb), a mioglobina, a melanina e os citocromos, delimita o comprimento de onda adequado à PDT a uma gama compreendida de 650 a 1000 nm ^[73]. A excitação do fotossensibilizador com luz cujo comprimento de onda esteja incluído neste intervalo permite assegurar que as moléculas endógenas não sofrem perturbações. Porém, o limite superior deste intervalo foi posteriormente restringido a 850 nm, após se ter comprovado que comprimentos de onda superiores não possuem a energia mínima necessária para desencadear a produção de oxigénio singleto ^[60,68,73]. Em suma, à gama de comprimentos de onda compreendida de 650 a 850 nm é usualmente atribuída a designação de “Janela Terapêutica”.

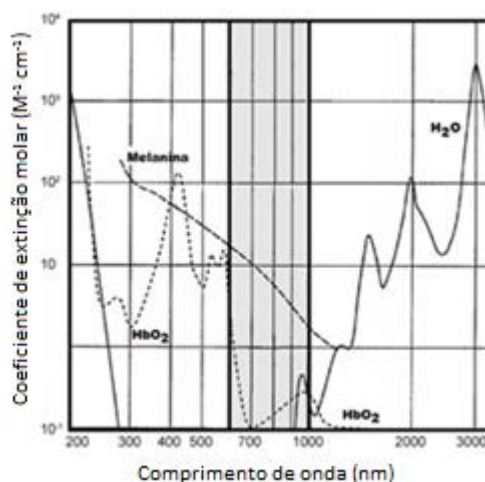


Figura 1.7. Espectro de absorção dos cromóforos biológicos, em função do comprimento de onda. A absorção destas moléculas define o comprimento de onda susceptível de aplicação em PDT (zona a cinzento) [adaptado de 73].

O comprimento de onda óptimo para PDT deve ser seleccionado com base no espectro de absorção do fotossensibilizador e nas propriedades do tecido lesado (localização, tamanho da lesão e acessibilidade), de modo a que se estabeleça um compromisso entre a activação do FS e a profundidade de penetração com mínima dispersão ^[60,68]. A dosimetria da luz é um factor de grande importância na eficácia do tratamento e depende da área e profundidade da lesão. Este parâmetro é geralmente expresso pela taxa de fluência da luz, que se define em função da energia que incide numa determinada área da lesão por unidade de tempo (W/m^2 , $W=J.s^{-1}$) ^[59].

Ao longo dos anos assistiu-se a uma rápida evolução das fontes de luz com aplicações clínicas. As primeiras fontes de luz, utilizadas principalmente no tratamento de lesões superficiais, eram lâmpadas

convencionais, que produziam uma luz heterogénea e com uma grande componente térmica, e a energia emitida era delimitada por filtros ópticos ^[43, 64]. Na actualidade, os lasers (*e.g.*, árgon, díodo) e os LEDs, que produzem uma luz monocromática altamente homogénea, são as fontes de luz mais utilizadas. O acoplamento destas fontes de luz à tecnologia de fibras ópticas revolucionou o conceito da PDT e expandiu a sua aplicabilidade a locais de difícil acesso ^[43,59,60,64,74].

1.2.3.2. Oxigénio

As espécies reactivas de oxigénio, formadas na sequência da reacção fotoquímica (tipo I e tipo II), desempenham papel preponderante nos efeitos citotóxicos que desencadeiam a destruição das células tumorais ^[59,63]. As porfirinas, alvo de investigação desta dissertação, são predominantemente consideradas fotossensibilizadores do tipo II, que exercem o seu efeito citotóxico por intermédio do oxigénio singlete ^[59, 75,76].

O ¹O₂ é uma espécie altamente reactiva e oxidante, que reage com biomoléculas (Figura 1.8) como lípidos insaturados, nomeadamente triacilgliceróis, fosfolípidos e o colesterol presentes nas membranas biológicas (*e.g.*, plasmática, mitocondrial, lipossomal, nuclear e do retículo endoplasmático), resíduos de aminoácidos (*e.g.*, triptofano, histidina, metionina e cisteína) presentes em diversas proteínas e bases nucleotídicas que constituem os ácidos nucleicos (*e.g.*, guanina e guanosina) ^[65,67,75].

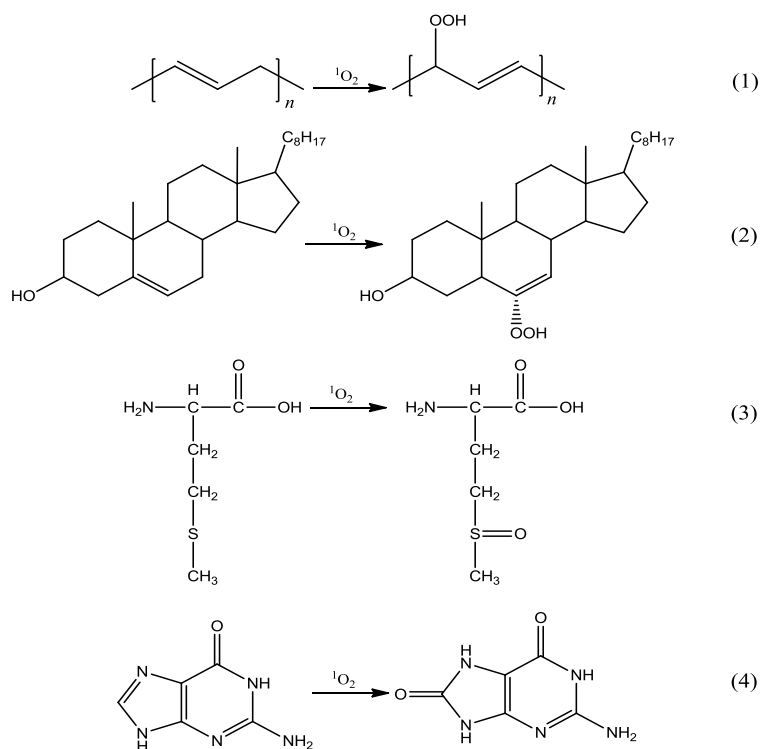


Figura 1.8. Mecanismo de oxidação de (1) lípidos insaturados, (2) do colesterol, (3) do aminoácido metionina e (4) da base azotada guanina, por acção do oxigénio singlete formado pela reacção de fotossensibilização do tipo II [adaptado de 75].

As membranas biológicas e organelos como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomas, mitocôndrias e o núcleo, são considerados os principais alvos da acção oxidativa pelo ¹O₂ ^[43,70,74]. Com efeito, as alterações na permeabilidade e fluidez membranar comprometem a sua organização estrutural e funcional. Estas perturbações são geralmente acompanhadas pela inactivação de enzimas, receptores e transportadores que lhe estão associados. Adicionalmente, também a inactivação oxidativa de enzimas

mitocondriais e de proteínas envolvidas na reparação do DNA, são eventos vitais na destruição das células tumorais ^[65].

Apesar da elevada reactividade, esta ROS possui um tempo de vida (τ_{Δ}) bastante curto e bastante influenciável pelo ambiente químico externo (e.g., solvente) ^[43,57-60]. Em 2007, Hatz *et al.* efectuaram a detecção do $^1\text{O}_2$ em água pura, por medição directa da fosforescência a 1270 nm e obtiveram um tempo de vida de aproximadamente 3,0 μs ^[73,77]. Contudo, a determinação do τ_{Δ} em sistemas celulares ainda não reuniu o consenso na comunidade científica. Assim, enquanto alguns investigadores defendem que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares não sofre grandes alterações ($\approx 3,0 \mu\text{s}$), porque é definido quase exclusivamente pelas interações que estabelece com a água ^[77], a maioria dos cientistas defende que o seu valor é substancialmente inferior ($< 300 \text{ ns}$) devido à presença e interação com diversas macromoléculas ^[58-60,73].

O tempo de vida restringe o raio acção do $^1\text{O}_2$ a $\approx 0,02 \mu\text{m}$, uma distância considerada irrisória à escala celular ($\approx 10\text{--}100 \mu\text{m}$). Por conseguinte, e como a resposta oxidativa ocorre predominantemente nas imediações do fotossensibilizador, a determinação da sua localização exacta é crucial para a avaliação do efeito citotóxico ^[43,58-60,70,73,78].

O oxigénio é um elemento chave em PDT e a sua concentração intracelular tem um efeito inquestionável no sucesso do tratamento. A hipoxia tumoral é responsável pela resistência à Terapia Fotodinâmica, quimio e radioterapia, e está associada à progressão maligna e ao mau prognóstico ^[43,68]. Curiosamente, o próprio tratamento fotodinâmico pode induzir hipoxia tumoral aguda, uma situação atribuída ao elevado consumo de oxigénio durante a reacção fotoquímica e à destruição do sistema vascular que impede o fornecimento de oxigénio no tumor ^[68,71]. Adicionalmente, também a intensidade elevada da luz incidente e a duração da irradiação influenciam a oxigenação do tumor ^[72].

1.2.3.3. Fotossensibilizadores

A eficácia do tratamento fotodinâmico depende da selecção do fotossensibilizador adequado a cada condição patológica. Nas últimas décadas assistiu-se a uma procura intensiva de novos agentes fotossensíveis, cujo *design* requer um conhecimento prévio das suas características ideais ^[57-60,67,73,79,80].

- (i) Composto puro, estável e estruturalmente bem definido, de síntese fácil, reprodutível e economicamente viável,
- (ii) Acumulação e retenção selectiva no tecido alvo,
- (iii) Forte absorção na gama dos 600–800 nm, onde a penetração no tecido é ideal.
- (iv) Inócuo na ausência de luz e nas doses fototerapêuticas utilizadas, mas altamente citotóxico na presença de luz de comprimento de onda adequado,
- (v) Elevado rendimento quântico na formação do estado tripleto (ϕ_T),
- (vi) Elevado rendimento quântico do oxigénio singleto (ϕ_{Δ}),
- (vii) Solubilidade nos fluídos corporais. A agregação do FS diminui ϕ_T e ϕ_{Δ} ,
- (viii) Depuração rápida que permita minimizar a fotossensibilidade prolongada da pele,
- (ix) A metabolização celular ou a fotodegradação do FS não deve gerar produtos tóxicos. O FS não deve causar efeitos mutagénicos ou carcinogénicos

Os fotossensibilizadores tetrapirrólicos, cujas propriedades fotossensibilizantes e farmacocinéticas têm sido amplamente investigadas desde o início do século XX, constituem a principal classe de agentes fototerapêuticos em desenvolvimento clínico e pré-clínico ^[45,57,58]. Com efeito, a capacidade que estes compostos exibem para se acumularem selectivamente no tecido tumoral, em

associação com as suas propriedades químicas e fotofísicas favoráveis e elevada versatilidade de síntese, torna-os especialmente atractivos para utilização em PDT ^[62]. A acumulação selectiva no tecido alvo é a característica chave de qualquer fotossensibilizador ^[62,69]. Ainda que os mecanismos envolvidos neste processo não estejam completamente elucidados, vários estudos afirmam que as características estruturais do FS (*e.g.*, natureza dos grupos substituintes, peso molecular, carga electrónica, carácter hidrofóbico/hidrofílico, estado de agregação e afinidade para os locais de ligação biológicos), e as propriedades intrínsecas ao tecido tumoral desempenham um papel crucial ^[62,65,67,81,82].

A natureza do fotossensibilizador influencia não só a sua captação e distribuição intracelular, mas também os seus parâmetros fotofísicos, nomeadamente a capacidade de absorção de luz e de produção de oxigénio singleto ^[65,67]. Assim, enquanto a hidrofílicidade dificulta a difusão do fotossensibilizador através da membrana plasmática, a hidrofóbicidade pode promover a sua agregação em condições fisiológicas. Ainda assim, as células cancerígenas dispõem de mecanismos (*e.g.*, endocitose, macrófagos) que lhes permitem internalizar eficazmente estes fotossensibilizadores ^[67,83]. É com base nestes efeitos antagónicos que vários investigadores defendem que o fotossensibilizador ideal deve apresentar um carácter anfifílico.

As células cancerígenas requerem uma quantidade suplementar de colesterol para levarem a cabo a biossíntese das membranas celulares. Para esse efeito, estas células sobreexpressam o receptor das lipoproteínas de baixa densidade, consideradas as principais transportadoras do colesterol no sangue. Em acréscimo, a grande afinidade com que os FS hidrofóbicos e anfifílicos se ligam a estas lipoproteínas sugere que a endocitose mediada por estes receptores é provavelmente o mecanismo de internalização mais relevante ^[62,82-86]. Com efeito, este mecanismo é confirmado por diversos estudos experimentais que estabelecem uma correlação entre a biodistribuição do FS e o número de receptores de LDL ^[62]. De modo análogo, também o aumento do número de receptores de transferrina ^a nos tecidos tumorais pode contribuir para a captação selectiva dos fotossensibilizadores ligados a esta glicoproteína ^[62,83]. Uma vez endocitado, o FS acumula-se preferencialmente em compartimentos lipofílicos da célula tumoral como as membranas plasmática, mitocondrial, nuclear, lisossomal e do retículo endoplasmático. Por sua vez, os FS hidrofílicos ligam-se a proteínas como a albumina ou proteínas de elevada densidade (HDP). No entanto, como a hidrofílicidade diminui a capacidade dos fotossensibilizadores se difundirem através da membrana plasmática, e estes tendem a acumular-se preferencialmente no espaço intersticial e na vasculatura do tecido tumoral ^[62,80].

Para além do aumento da expressão de receptores, o tecido tumoral é também caracterizado por um pH ácido, uma elevada permeabilidade vascular e depuração linfática ineficaz e pela presença de macrófagos associados ao tumor ^b (TAM) ^[62,80,86].

A alteração da microvasculatura tumoral está na origem da redução do fluxo sanguíneo e do oxigénio disponível. Por consequência, as células neoplásicas adoptam um metabolismo glicolítico anaeróbio, responsável pela formação de ácido láctico e acidificação da região intersticial do tumor ^[87]. O pH ácido influencia a ionização e o estado de agregação do FS, que por sua vez determinam o seu modo de internalização pela célula cancerígena ^[62,83,86].

^a A transferrina é uma glicoproteína plasmática constituída por dois domínios homólogo, cada um com um local de alta afinidade de ligação ao Fe(III). Esta proteína é responsável pelo transporte de ferro dos locais de absorção e armazenamento até ao local de uso.

^b Os macrófagos associados ao tumor (TAM) possuem múltiplas funções. Acredita-se que estes têm uma relação de simbiose com as células tumorais, produzindo factores de crescimento e facilitando a angiogénese. Por outro lado, os TAM têm potencial para inibir o crescimento tumoral e promover a destruição selectiva das células neoplásicas, motivo pelo qual foram propostos como alvo para intervenção terapêutica ^[62].

Os macrófagos associados ao tumor contribuem para a captação e acumulação dos FS, incluindo dos que sofreram agregação. Por conseguinte, o teor de macrófagos encontra-se substancialmente aumentado nos locais de acumulação do FS ^[62,86]. De igual modo, também a elevada permeabilidade vascular e a depuração linfática ineficiente contribuem para a acumulação de fotossensibilizador, geralmente no espaço intersticial ^[83].

Em suma, são várias as vias envolvidas na acumulação selectiva do FS nas células-alvo. Algumas dessas vias encontram-se ilustradas na Figura 1.9.

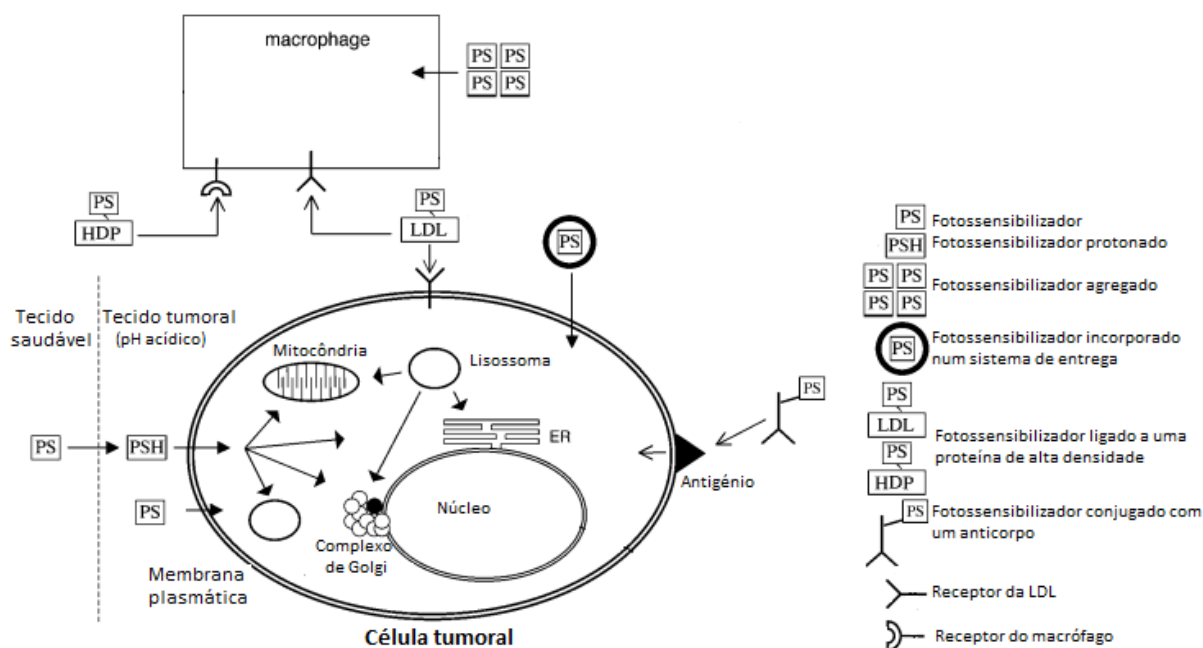


Figura 1.9. Representação das principais vias envolvidas na captação de fotossensibilizadores pelas células cancerígenas [adaptado de 62].

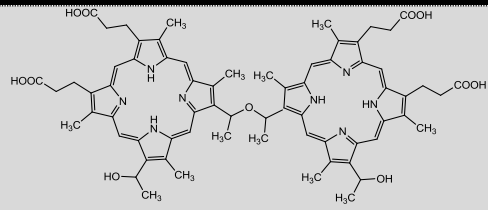
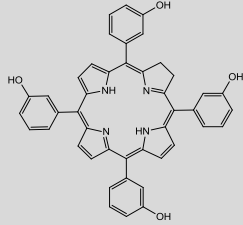
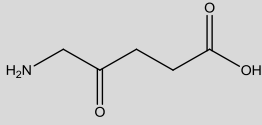
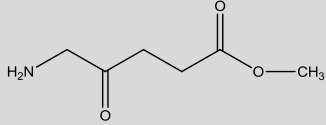
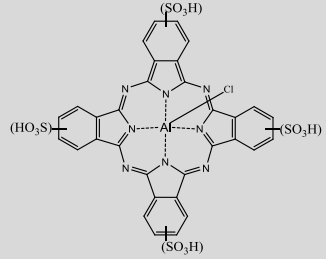
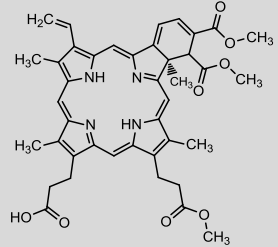
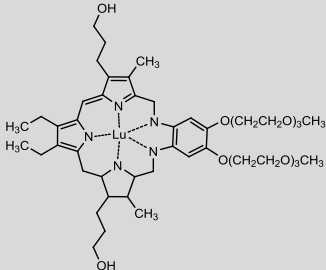
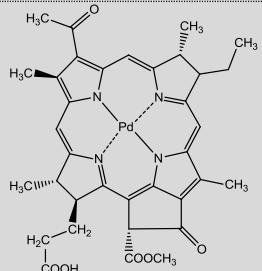
A especificidade da PDT pode ser potenciada por de sistemas de transporte e entrega direccionada (*e.g.*, dendrímeros, micelas, lipossomas, proteínas e lipoproteínas, polímeros, em especial o polietilenoglicol, nanopartículas, anticorpos, entre outros), que previnem a agregação e intensificam a internalização do FS ^[62,67,71]. Com efeito, a localização intracelular, definida com base no carácter hidrofóbico/hidrofílico do FS, decreta o modo como se desencadeia a destruição do tecido neoplásico ^[62]. Sumariamente, enquanto os FS hidrofílicos promovem a morte do tecido tumoral através da destruição dos vasos sanguíneos que fornecem oxigénio e outros nutrientes essenciais ao tumor (modo indirecto), os FS hidrofóbicos actuam directamente sobre as células tumorais ^[71,88].

O conhecimento destes mecanismos permite o desenvolvimento de fármacos mais selectivos e eficazes, que propiciam a redução da dose a administrar ao paciente e dos efeitos secundários indesejáveis ^[62,65].

1.2.3.3.1. Fotossensibilizadores aprovados ou em estudos pré-clínicos para uso em PDT

Ainda que possível desenvolver um amplo leque de excelentes fotossensibilizadores, apenas alguns estão disponíveis comercialmente para utilização clínica (Tabela 1.1) ^[73,89].

Tabela 1.1. Alguns dos principais fotossensibilizadores aprovados ou em estudos pré-clínicos para uso em PDT.

Fotossensibilizador	Geração	Aprovação	Substância	Estrutura
Photofrin®	1	Sim (1993)	Dímero de HpD	
Foscan®, m-THPC	2	Sim (2001)	Clorina	
Levulan®	2	Sim (1999)	Ácido aminolevulínico (ALA)	
Metvix®	2	Sim (2001)	Metil-ALA (M-ALA)	
Photosense®	2	Sim (1994)	Metaloftalocianina	
Visudyne®	2	Fase clínica	Verteoporfina	
Antrin®, Lu-Tex	2	Fase clínica	Lutexafirina	
Tookad	2	Fase clínica	Bacteriofeoforbideo (derivado da bacterioclorofila)	

Os fotossensibilizadores podem ser classificados como de primeira, segunda ou terceira geração [57,79,90].

Os FS de 1ª geração incluem o derivado da hematoporfirina (HpD), considerado o “pai” dos fotossensibilizadores modernos, e o Photofrin® [57,67,89]. A heterogeneidade química destes FS, aliada aos baixos coeficientes de absorção (ϵ) e efeitos colaterais como a fotossensibilidade prolongada da pele (\approx até 12 semanas), incentivaram o desenvolvimento de uma segunda geração de FS [57,64,67]. Os FS incluídos nesta 2ª geração exibem uma grande capacidade de absorção e produção de oxigénio singlete [67].

O Foscan® (5,10,15,20-tetraquis(3-hidroxifenil)clorina) foi inicialmente aprovado para o tratamento paliativo de pacientes com cancro da cabeça. Este FS é 25–30 vezes mais eficaz que o Photofrin®, e permite uma redução da fotossensibilidade até um máximo de 2–3 semanas [57,64]. Estudos preliminares sugerem que a utilização deste FS poderá vir a estender-se ao tratamento do cancro do pulmão, estômago e pâncreas [89].

O ácido 5-aminolevulínico (ALA), metabolito endógeno sintetizado na mitocôndria por condensação da succinil-coenzima A e da glicina por acção da ALA sintetase, é enzimaticamente convertido na protoporfirina IX (PpIX), precursora do grupo heme. O mecanismo envolvido na biossíntese do heme encontra-se detalhado na secção 1.2.5. A administração de ALA exógeno desencadeia, devido à menor disponibilidade de ferro e à actividade limitada da ferroquelatase^a dos tecidos tumorais, uma acumulação da protoporfirina IX nas células [91]. Este efeito foi descrito pela primeira vez em 1956, por N. Berlin [91]. Assim, ainda que o ALA *per se* não apresente qualquer efeito fotossensibilizante, a PpIX resultante da sua metabolização é fotodinamicamente activa [54,57,64,89,91].

Os primeiros ensaios de fotossensibilização *in vitro* mediados por ALA foram realizados em 1987 por Malik e Lugaci, que destruíram selectivamente células de eritroleucémia. Motivados pelo sucesso dos resultados *in vitro*, em 1990 Kennedy e Pottier conduziram os primeiros ensaios clínicos em pacientes com carcinomas basocelulares superficiais [54,91]. Passados 9 anos, o Levulan®, designação comercial do ALA, foi aprovado para o tratamento da queratose actínica, uma lesão pré-cancerosa da pele [57,64].

Porém, a hidrofílicidade deste pró-fármaco limita a sua permeabilidade celular. Com efeito, a esterificação do ALA proporciona um aumento da lipofílicidade e da eficácia de penetração na pele. [57,70,91]. O Metvix®, éster de metil do ALA, é desmetilado pelas esterases das células alvo e convertido na PpIX [89]. O Levulan® e o Metvix® são actualmente utilizados com sucesso em dermatologia oncológica [57,91]. Para este sucesso contribuí também o facto de a PpIX ser parte integrante de uma via metabólica natural que, ao permitir a sua rápida metabolização e eliminação da célula, se reflecte numa menor fotossensibilidade da pele (24 a 48 h) [54]. A eficácia da PDT mediada pelo ALA pode ser intensificada pela utilização de agentes quelantes de ferro, que ao captarem o ferro necessário à formação do grupo heme originam uma acumulação da PpIX na célula [54].

O Photosense® é uma ftalocianina sulfonada de alumínio, utilizada no tratamento de infecções e de vários tipos de tipos de cancro, nomeadamente do pulmão e da mama. A eficácia deste FS advém da elevada capacidade de absorção, aliada à presença dos grupos sulfonados, que diminuem o carácter hidrofóbico inerente ao macrociclo, e do alumínio, que aumenta a produção de ROS [89].

Apesar de ainda se encontrar em estudos pré-clínicos, o Toodak® (bacteriofeoforbideo de paládio (Pd) derivado da bacterioclorofila) é considerado um dos FS de 2ª geração mais promissores. Com efeito, este FS hidrofóbico penetra eficientemente nos tecidos e está indicado para o tratamento de lesões mais profundas como o cancro da próstata [57,89].

^a A ferroquelatase catalisa a inserção de Fe²⁺ na protoporfirina IX. Esta enzima é responsável pela conversão da PpIX no heme.

A terceira geração de FS corresponde à conjugação dos FS de 2ª geração com anticorpos, polímeros, lipossomas, ou outras moléculas que permitam direccionar selectivamente o FS para o tecido tumoral [57,67]. Esta classe de fotossensibilizadores, que procura tirar partido de propriedades das células cancerígenas que as diferencie das células normais, representa uma área de investigação em expansão [79]. O Foslip® e o Fospeg®, resultantes da encapsulação do Foscan® em lipossomas convencionais e peguilados, respectivamente, têm-se revelado muito promissores para aplicação futura em PDT [90,92].

1.2.4. Destruição das células tumorais mediada pela PDT

O efeito anti-tumoral induzido pela PDT resulta dos danos directos sobre as células tumorais em combinação com a destruição da vasculatura tumoral e a activação do sistema imunitário. A destruição directa das células tumorais pode ocorrer por diversas vias: apoptose, autofagia e necrose (Figura 1.10). A contribuição de cada um destes fenómenos para a destruição do tumor depende de factores como as propriedades físico-químicas, a concentração e a localização intracelular do FS, assim como a concentração de oxigénio intracelular, a intensidade da luz incidente e as propriedades inerentes a cada tipo de células [58,78,68,162,245].

Enquanto a quimioterapia e a radioterapia são imunossupressoras, a PDT tem a capacidade de activar o sistema imunitário [58]. Na verdade, a terapia ideal deve não só destruir as células tumorais, como também deve prevenir possíveis recorrências ou metástases [58,245]. Neste sentido, o modo como a PDT estimula o sistema imune é uma área de investigação activa e muito promissora [58].

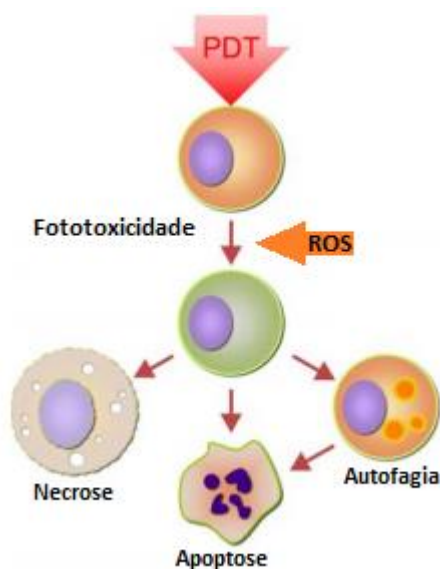


Figura 1.10. O tratamento fotodinâmico promove danos celulares que culminam na destruição das células cancerígenas por diferentes vias [adaptado de 245].

A apoptose, também conhecida por morte celular programada, é essencial ao correcto desenvolvimento e funcionamento de um organismo [2]. Este processo caracteriza-se por diversas alterações na morfologia da célula, nomeadamente pela contracção celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Neste processo não ocorre perda da integridade membranar [60,63,78,228]. A apoptose pode ser activada por uma via intrínseca, onde a mitocôndria desempenha um papel central, ou por uma via extrínseca, que envolve receptores da membrana celular [245]. Os eventos associados a cada uma das vias não são alvo do estudo desta

dissertação. Em PDT, a via intrínseca é predominante. Esta via caracteriza-se pela perda do potencial de membrana mitocondrial e libertação do citocromo c para o citosol ^[245,78].

Enquanto a apoptose representa o modo de morte celular predominante em resposta a menores doses de luz e a danos celulares mais suaves, a necrose ocorre tipicamente em consequência de danos celulares excessivos ^[78,228]. Adicionalmente, também a localização intracelular do FS é preponderante. Com efeito, vários estudos comprovam que os FS que se localizam na mitocôndria ou no retículo endoplasmático são bons indutores da apoptose, enquanto os FS que se localizam nos lisossomas ou na membrana plasmática induzem a destruição das células tumorais predominantemente por necrose ^[58].

A necrose é uma forma de morte rápida que se caracteriza pela formação de um edema celular e ruptura da membrana plasmática, com a consequente libertação do conteúdo intracelular e de moléculas pró-inflamatórias que desencadeiam um processo inflamatório ^[60,63,68,245].

Ainda que a apoptose e a necrose representem as principais vias de morte celular, a importância da autofagia, responsável pela remoção dos organelos danificados pelas ROS, só recentemente foi clarificada ^[245].

A autofagia é um processo altamente regulado, no qual os componentes celulares, e até mesmo organelos, são internalizados em vesículas que se fundem com os lisossomas, onde são degradados por acção enzimática ^[228,245]. Este processo pode ser estimulado por condições de *stress* crónico, como as que se verificam no microambiente tumoral (*e.g.*, stress oxidativo), ou na sequência de danos em componentes celulares vitais ^[60,228].

Como supramencionado, para além dos efeitos directos sobre as células tumorais, também os efeitos sobre o sistema vascular e a activação do sistema imunitário são fundamentais para a destruição eficaz das células tumorais ^[58,162]. Deste modo, enquanto a destruição do sistema vascular impossibilita a formação de novos vasos sanguíneos e promove a morte das células tumorais por privação de nutrientes e oxigénio, a libertação de citocinas e de proteínas de resposta ao *stress* resultantes do processo inflamatório são responsáveis pela infiltração de células imunitárias como linfócitos, macrófagos e células dendríticas, que contribuem para a destruição do tumor. A activação do sistema imunitário permite o reconhecimento das células tumorais e previne possíveis recorrências da patologia ^[63,68].

A compreensão do modo como cada um destes mecanismos influencia a resposta anti-tumoral é fundamental para delinear novas estratégias terapêuticas que potenciem a destruição das células alvo ^[60,63].

1.3. Porfirinas: estrutura e propriedades

As porfirinas, cujo nome deriva do grego *porphura* (púrpura), são compostos intensamente corados. Do ponto de vista químico, as porfirinas apresentam uma estrutura macrocíclica composta por quatro anéis de pirrol unidos por pontes metino (=CH–), cujos carbonos, com hibridização sp^2 , são usualmente designados *meso* porfirínicos [93-96,99]. A estrutura tetrapirrólica foi sugerida em 1912 por Wilhelm Küster. Contudo, esta proposta foi de imediato refutada pela comunidade científica, que considerou que um anel de tais dimensões seria extremamente instável. Ironicamente, Hans Fischer ^a, um químico orgânico que havia questionado a validade da estrutura proposta por Küster, viria a receber, em 1930, o Prémio Nobel da Química pela síntese e elucidação da estrutura do heme, o grupo prostético da hemoglobina. Fisher é inclusive considerado o pai da química moderna das porfirinas [93,94,96].

Os macrociclos tetrapirrólicos englobam uma série de compostos que podem ser classificados com base no grau e na posição de insaturações das unidades pirrólicas (Figura 1.11). Estes compostos, que resultam da hidrogenação/redução da porfirina, apresentam propriedades biológicas de extrema relevância. Um exemplo bastante elucidativo é a clorofila, uma clorina complexada a um ião magnésio que, apesar de ser considerada um subproduto indesejado na síntese de porfirinas, é essencial ao metabolismo das plantas [93,94,97,100].

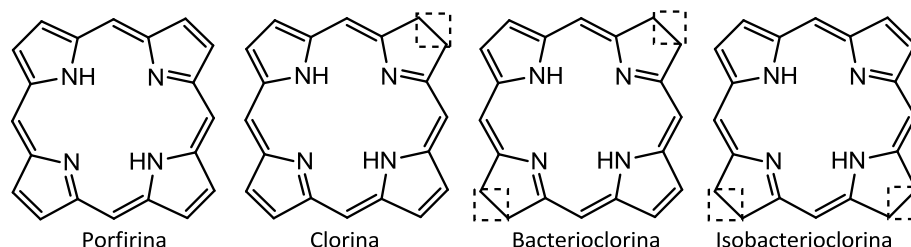


Figura 1.11. Representação estrutural dos principais macrociclos tetrapirrólicos. Os quadrados a tracejado representam a localização da insaturação [adaptado de 97].

O macrociclo porfirínico apresenta-se como um sistema completamente conjugado, que obedece à regra de aromaticidade de Hückel ($4n+2$ electrões π , $n = 1, 2, 3, \dots$). Este sistema é constituído por 22 electrões π ($n=5$), dos quais apenas 18 ($n=4$) se encontram deslocalizados e contribuem para a aromaticidade do macrociclo (Figura 1.12) [93-96,102].

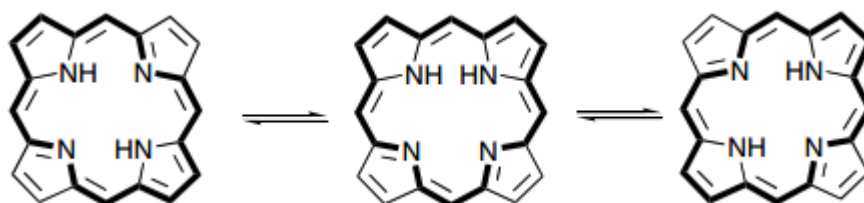


Figura 1.12. Formas de ressonância: deslocalização electrónica do macrociclo porfirínico.

A conjugação e aromaticidade do macrociclo porfirínico influênciam as suas propriedades físico-químicas, ao mesmo tempo que permite a sua identificação inequívoca. Estes compostos, altamente corados e fluorescentes, exibem espectros de absorção e de emissão de fluorescência bastante peculiares [93,98]. O espectro de absorção na região UV/Vis, caracterizado por transições $\pi \rightarrow \pi^*$, é

^a http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1930/ (acedido a 7 de Janeiro de 2013)

composto por uma banda de absorção de grande intensidade próxima dos 400 nm, denominada banda Soret ou banda B ($S_0 \rightarrow S_2$), e por um conjunto de quatro bandas de menor intensidade entre os 500–650 nm, designadas por bandas Q ($S_0 \rightarrow S_1$). A absorção de radiação electromagnética e transição de um electrão do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_n) é geralmente acompanhada por um processo de decaimento $S_n \rightarrow S_0$, geralmente com emissão de fluorescência (processo radiativo). O espectro de fluorescência das porfirinas caracteriza-se pela presença de duas bandas de emissão, usualmente designadas Q(0,0) e Q(0,1), por ordem decrescente de energia ^[93,98,99].

O carácter aromático do núcleo porfirínico pode ser também comprovado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O espectro 1H RMN das porfirinas caracteriza-se por efeitos anisotrópicos, que se traduzem pela forte blindagem dos prótons internos NH e pelo aparecimento dos respectivos sinais de ressonância a campos muito altos (δ entre -2 e -4), e pela desblindagem dos prótons *meso* e β -pirrólicos, cujos sinais surgem a campos significativamente baixos (δ 10–11 ppm e δ 8–9 ppm, respectivamente) ^[93,94].

Os macrociclos tetrapirrólicos são ubíquos na Natureza, onde são preponderantes a vários processos bioquímicos fundamentais à vida. É por este motivo que estes compostos são usualmente denominados “pigmentos da vida”. Com efeito, uma das razões que levou a Natureza a seleccionar estes compostos está relacionada com a sua elevada flexibilidade conformacional, a qual lhes permite adoptar a conformação, planar ou não-planar, necessária à realização da função pretendida ^[100]. Destes, o heme e clorofila são os mais representativos. O heme, complexo protoporfirina IX-Fe (II), é o grupo prostético presente na hemoglobina e na mioglobina (Figura 1.13), onde é responsável pelo transporte e armazenamento de oxigénio, respectivamente. Esta estrutura pode ser também encontrada nos citocromos, envolvidos no transporte de electrões ao longo da cadeia respiratória mitocondrial, e em enzimas como a peroxidase, que catalisa a oxidação de substratos por acção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e a catalase, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. A via envolvida na biossíntese do grupo heme encontra-se representada na Figura 1.14 ^[54,93,95,100,102].

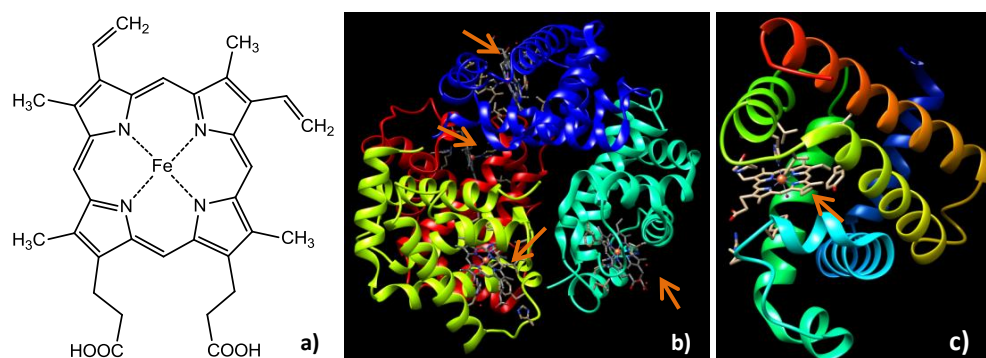


Figura 1.13. (a) Representação da estrutura do grupo heme que constitui (b) a hemoglobina e (c) a mioglobina, responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigénio. Nestas estruturas, os grupos heme encontram-se assinalados pelas setas a laranja.

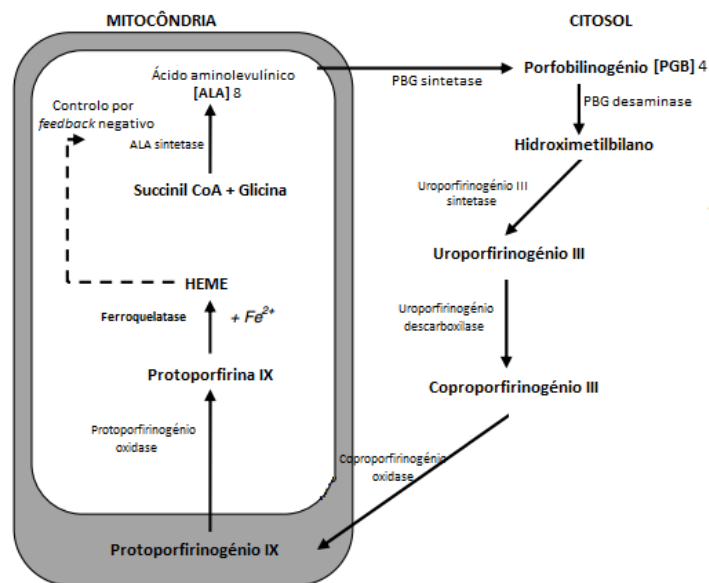


Figura 1.14. Representação esquemática da biossíntese do grupo heme [adaptado de 54].

De modo conciso, o ALA sintetizado na mitocôndria por acção da ALA sintetase é transportado para o citosol, onde 2 moléculas se condensam para formar o porfobilinogénio (PGB). Por sua vez, a condensação de quatro moléculas de PGB dá origem ao hidroximetilbilano (HMB), um intermediário de cadeia aberta que, por intermédio da uroporfirinogénio co-sintase, sofre ciclização e se converte no uroporfirinogénio III. Este intermediário é descarboxilado e forma o coproporfirinogénio III, que é transportado para a mitocôndria e se transforma, por descarboxilação oxidativa, em protoporfirinogénio IX que é posteriormente oxidado para formar a protoporfirina IX, precursora do heme e da clorofila [21,54]. A biossíntese do heme é um processo altamente regulado. Porém, qualquer alteração genética que interfira com esta regulação, pode desencadear a acumulação de qualquer um dos intermediários biossintéticos e dar origem a situações patológicas, como a porfíria^a [101].

A clorofila (Figura 1.15), clorina coordenada a um ião de magnésio, é um pigmento fotossintético presente nos cloroplastos de plantas e algumas algas. Este pigmento é responsável pela conversão da energia solar em energia química, essencial ao metabolismo da planta. Durante este processo há também formação de oxigénio molecular, imprescindível à respiração celular [97,100].

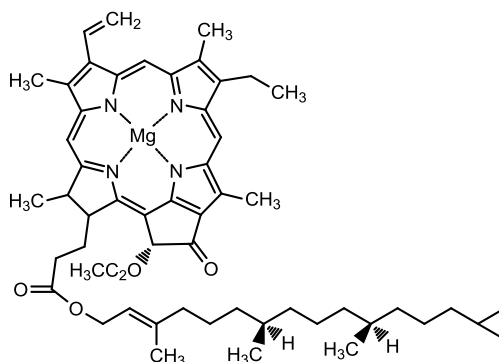


Figura 1.15. Representação da estrutura da clorofila a, o principal pigmento fotossintético das plantas.

^a A porfíria é uma doença genética rara associada a anomalias na biossíntese do grupo heme. Entre as alterações mais frequentes encontra-se a sobre-expressão da ALA sintetase e a sob-expressão da sintetase do uroporfirinogénio. Esta patologia caracteriza-se pelo aumento da fotossensibilidade e lesões da pele. O fígado torna-se disfuncional devido à acumulação de ferro e, em situações mais graves podem surgir desordens neurológicas graves [101].

A coordenação a diferentes iões metálicos, que funcionam como centros de reacção, assim como a natureza dos substituintes presentes nas posições β -pirrólicas, confere uma grande diversidade de funcionalidades aos sistemas porfirínicos^[93,94,102].

1.3.1. Métodos de Síntese

As porfirinas possuem uma estrutura bastante versátil, que possibilita a introdução de grupos substituintes, responsáveis pela modulação das suas propriedades físico-químicas^[100]. Com efeito, o envolvimento das porfirinas em processos biológicos de extrema importância motivou o interesse pela manipulação das porfirinas já existentes na natureza e pela síntese artificial de novos macrociclos. Nas últimas décadas assistiu-se ao desenvolvimento e optimização dos métodos de síntese de porfirinas, em especial das *meso*-substituídas, com origem no pirrol e em aldeídos aromáticos^[93]. Alguns desses métodos são coligidos nas subsecções seguintes.

Actualmente, as porfirinas sintéticas são empregues em áreas tão diversas como a catálise, os sistemas de transporte artificial de oxigénio, sensores químicos, células fotovoltaicas, e em medicina como agentes de contraste para imagiologia por ressonância magnética ou como fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica^[102,103].

1.3.1.1. Síntese pelo método de Rothmund/Adler-Longo^a

A síntese de porfirinas *meso*-substituídas teve início em 1935 por intermédio de Paul Rothmund, que em 1941 descreveu a síntese detalhada da 5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina (TPP) (Figura 1.16). Neste método, a reacção de condensação do benzaldeído com o pirrol decorreu por um período de 48 h a 220 °C, num vaso reaccional selado em atmosfera inerte (ausência de oxigénio), e usando piridina como solvente^[103-106]. Apesar de a metodologia descrita por Rothmund primar pela simplicidade e a porfirina precipitar directamente no meio reaccional após um longo período de arrefecimento lento, o rendimento da reacção era ínfimo (< 5%), e a porfirina obtida encontrava-se contaminada pela clorina correspondente. Adicionalmente, as condições reaccionais extremamente adversas, nas quais apenas alguns aldeídos aromáticos conseguem reagir, limitaram a aplicação deste método e impulsionou a procura de condições reaccionais mais favoráveis^[104,106].

Na década de 60 do século passado, Adler e Longo modificaram o protocolo desenvolvido por Rothmund e sintetizaram a TPP em meio ácido (*e.g.*, ácido propiónico, ácido acético) e atmosfera oxidante (Figura 1.16), partindo de quantidades equimolares de pirrol e benzaldeído. A reacção foi realizada sob refluxo a 140 °C, por um período de 0,5–1 h^[104-106]. Apesar do considerável aumento do rendimento da reacção (\approx 20%), a contaminação pela clorina persiste. Contudo, esta é facilmente convertida na porfirina correspondente por acção de agentes oxidantes como a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ). Ademais, verifica-se também a formação de outros subprodutos, que se assemelham a uma espécie de alcatrão, que dificultam o processo de purificação. Este método é ainda limitado pelo facto de alguns aldeídos poderem conter grupos funcionais sensíveis ao ácido^[106,107].

^a O mecanismo envolvido na síntese de porfirinas pelo método de Adler-Longo encontra-se detalhado no Anexo I.

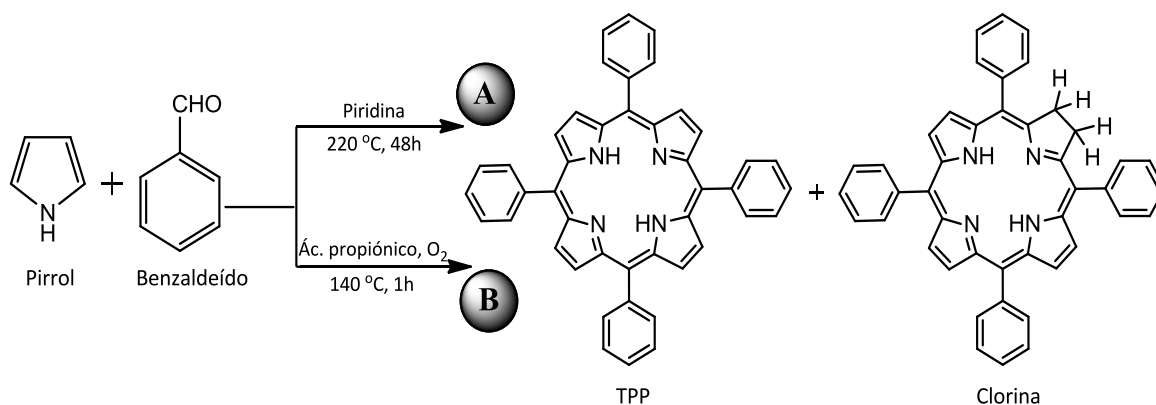


Figura 1.16. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina segundo as condições reaccionais estabelecidas (a) pelo método de Rothmund e (b) pelo método de Adler-Longo.

1.3.1.2. Síntese pelo método de Lindsey

Com base na premissa de que as condições reaccionais adoptadas nas metodologias desenvolvidas por Rothmund e Adler-Longo influenciavam negativamente o rendimento da reacção, em 1987 Jonathan Lindsey propôs uma nova metodologia para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas. Este método é realizado em dois passos consecutivos. Na primeira etapa, a reacção de condensação do pirrol com um aldeído em concentrações equimolares (10^{-2} M), efectuada sob atmosfera inerte, à temperatura ambiente, durante 1h na ausência de luz, num solvente clorado e na presença de um catalisador ácido (BF_3 ou TFA) (10^{-3} M), resulta na formação de um intermediário reduzido, o porfirinogénio. Na etapa seguinte, a oxidação deste intermediário, por acção de quinonas de elevado potencial oxidativo (DDQ ou cloranil), resulta na obtenção da porfirina de interesse (Figura 1.17).

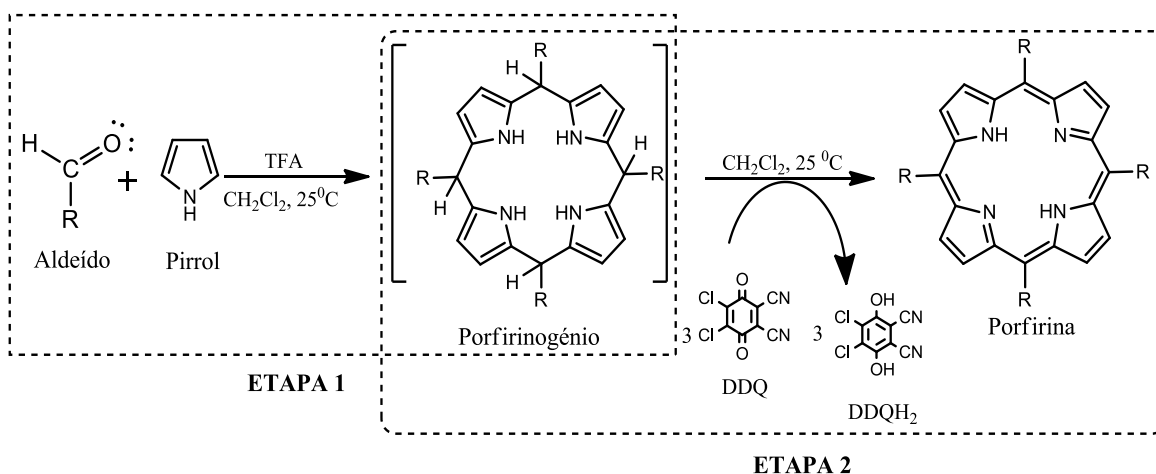


Figura 1.17. Método de dois passos proposto por Lindsey em 1987 para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas.

As condições reaccionais suaves e a elevada diluição dos reagentes permitiram reduzir a formação dos produtos secundários indesejados, o que facilita o processo de purificação e contribuí para o aumento do rendimento da reacção (35–40%). Em contrapartida, as quinonas utilizadas na oxidação do porfirinogénio implicam um maior impacto ambiental e económico.

1.3.1.3. Síntese química assistida por tecnologia microondas

A síntese química assistida por tecnologia microondas não é um conceito novo (Gedye e Guiere, 1986), mas só nos últimos anos foi devidamente explorado com o desenvolvimento dos primeiros equipamentos especialmente concebidos para este efeito. Efectivamente, as primeiras sínteses orgânicas foram realizadas em microondas domésticos (2,45 GHz), que não permitiam um controlo rigoroso nem da pressão nem da temperatura e, por conseguinte, os resultados obtidos não eram reprodutíveis^[110,111]. Comparativamente com a síntese pelos métodos convencionais supramencionados, a síntese assistida por tecnologia de microondas permite a diminuição drástica do tempo de reacção (de horas para minutos) e das reacções secundárias, um efeito que se reflecte directamente na obtenção de compostos mais puros e mais fáceis de isolar do meio reaccional e, por conseguinte, no aumento do rendimento da reacção. Adicionalmente, esta tecnologia permite melhor a reprodutibilidade das sínteses orgânicas e reduzir substancialmente os custos do processo, na medida em que as reacções ocorrem num volume mínimo de solvente. Este efeito tem também grandes repercussões a nível ambiental, uma vez que a maioria dos solventes utilizados em síntese orgânica são tóxicos e prejudiciais ao ambiente^[110-117]. Estas vantagens são atribuídas ao modo como se processa o aquecimento da mistura reaccional (Figura 1.18)^[111,112].

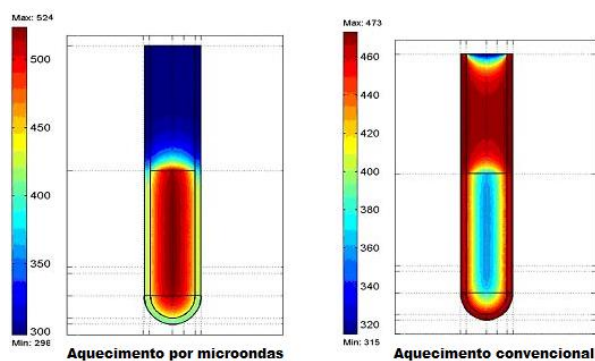


Figura 1.18. Representação ilustrativa das diferenças no perfil de aquecimento obtido por tecnologia microondas e pelo método convencional [adaptado de 111].

O método de aquecimento tradicional, efectuado com recurso a uma fonte de calor externa, como, por exemplo, um banho de parafina, é um método lento e ineficaz para transferir energia para o sistema reaccional, na medida em que está dependente da condutividade térmica de vários materiais (*e.g.*, balão de reacção). Por conseguinte, a temperatura da mistura reaccional em contacto directo com as paredes do balão é superior à temperatura efectiva da mistura reaccional^[111,113]. Por sua vez, a irradiação por microondas é um método de aquecimento interno, rápido e eficaz, que acopla a energia microondas com as moléculas (solvente, reagentes, catalisador) presentes na mistura reaccional. Este fenómeno, responsável pelo aumento homogéneo da temperatura da mistura reaccional, está na origem do aumento da reactividade^[111]. A Tabela 1.2 colige as principais diferenças entre o aquecimento convencional e o aquecimento por microondas.

Tabela 1.2. Principais características que diferenciam o aquecimento convencional do aquecimento alcançado por irradiação com energia de microondas [adaptado de 112].

Aquecimento convencional	Aquecimento por microondas
Condução/convecção	Acoplamento energético
Lento	Rápido
Não-selectivo	Selectivo
Menor dependência em relação às propriedades dos solventes/reagentes	Maior dependência em relação às propriedades dos solventes/reagentes

Apesar das vantagens incontestáveis da tecnologia de microondas, é fundamental determinar a influência de parâmetros como a concentração de reagentes e solventes, o tipo de catalisador ou agente oxidante mais adequado, a temperatura e o tempo de reacção óptimos, no rendimento da reacção ^[113]. Com efeito, é actualmente aceite que o solvente influencia consideravelmente a cinética e a selectividade da reacção ^[112]. Na verdade, enquanto nas reacções convencionais o ponto de ebulição do solvente é determinante, na síntese química assistida por tecnologia de microondas o solvente é seleccionado com base nas suas propriedades dieléctricas, isso é, na capacidade que apresenta para converter a energia electromagnética em calor. ^[111,112].

2. Objectivos

O objectivo dos investigadores na área oncológica é o desenvolvimento de terapêuticas e normas de orientação clínica que permitam a destruição selectiva das células tumorais, a redução dos efeitos secundários adversos e o aumento da qualidade de vida dos pacientes. A Terapia Fotodinâmica é actualmente considerada uma das técnicas mais selectivas e promissoras para o tratamento de doenças oncológicas. A selectividade desta modalidade terapêutica provém do efeito cooperativo entre a acumulação do fotossensibilizador nos tecidos cancerígenos e a posterior irradiação localizada desse tecido ^[42,118].

A afinidade e interacção das porfirinas com as células cancerígenas, em associação com as suas propriedades químicas e fotofísicas únicas, confere-lhes grande importância a nível farmacológico, nomeadamente em aplicações como o fotodiagnóstico e a Terapia Fotodinâmica ^[57,118,119].

A presente dissertação teve por objectivo a síntese e caracterização de derivados porfirínicos, com vista à sua potencial aplicação em PDT. Porém, a utilização de um composto em PDT requer o cumprimento de alguns requisitos básicos, os quais foram o objecto de análise. De modo a simplificar o estudo desses requisitos, a presente dissertação foi subdividida em duas partes distintas:

1. Síntese e caracterização química e fotofísica das porfirinas.
2. Avaliação do perfil de actividade biológica dos compostos previamente sintetizados na linha celular HT29, uma linha celular de adenocarcinoma colórectal.

Concisamente, a primeira parte incidiu na síntese, confirmação da pureza e da composição estrutural das porfirinas, e avaliação da sua capacidade para absorver na designada janela terapêutica (600–800 nm) e produzir oxigénio singleto. Estes dois requisitos são fundamentais para a eficácia do processo fotoquímico. Por sua vez, a segunda parte centrou-se na investigação do efeito tóxico e fototóxico das porfirinas anteriormente sintetizadas, na linha celular HT29.

3. Materiais e Métodos

3.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PORFIRINAS

O trabalho experimental subjacente a esta dissertação foi subdividido em duas partes distintas. A primeira parte consistiu na síntese e caracterização de porfirinas (secção 3.1), cuja caracterização biológica e avaliação do potencial fototerapêutico foi posteriormente determinado, numa segunda fase, com recurso à linha celular HT29 (secção 3.2).

3.1.1. Reagentes, equipamento e materiais utilizados na síntese orgânica

Todos os procedimentos descritos para a síntese, purificação e caracterização das porfirinas requereram a utilização de reagentes, equipamentos e materiais, cujas características se encontram descritas nas Tabelas 3.1 a 3.3, respectivamente.

Tabela 3.1. Características dos reagentes e solventes utilizados na síntese, purificação e caracterização de porfirinas.

REAGENTES/SOLVENTES	CAS	MARCA	FABRICANTE
Acetonitrilo ≥ 99,9%	75-05-8	Fluka Analytical	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Ácido acético D4 99,5% D	1186-52-3	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Ácido fórmico ~ 98%	64-18-6	Fluka Analytical	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Ácido propiónico 99%	79-09-4	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Anidrido acético 99%	108-24-7	Panreac	Panreac Química, Barcelona, Espanha
Bicarbonato de sódio ≥ 99%	144-55-8	Fluka	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
4-Carboxibenzaldeído 97%	619-66-9	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Cinamaldeído 98%	104-55-2	GPR	-
Cloreto de sódio ≥ 99%	7647-14-5	Absolve	-
D-Clorofórmio, 99,8% D	865-49-6	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
DDQ 98%	84-58-2	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Diclorometano ≥ 99,8%	75-09-2	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
DMF-d7, 99,5% D	4472-41-7	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Etanol ≥ 99,5%	64-17-5	Panreac	Panreac Química, Barcelona, Espanha
α-Hexilcinamaldeído ≥ 95%	101-86-0	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Metanol ≥ 99,9%	67-56-1	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
n-Hexano 95%	110-54-3	Panreac	Panreac Química, Barcelona, Espanha
Pirrol 98%	109-99-7	Panreac	Panreac Química, Barcelona, Espanha
2-Quinolinacarboxaldeído 97%	5470-96-2	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
4-Quinolinacarboxaldeído ≥ 98%	4363-93-3	Fluka	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Sulfato de sódio anidro ≥ 99%	7757-82-6	Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha
THF ≥ 99,9%	109-99-9	Sigma	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
TFA 99%	76-05-1	Acros Organics	Thermo Fisher Scientific New Jersey, USA
Tolueno 98%	108-88-3	Panreac	Panreac Química, Barcelona, Espanha

Tabela 3.2. Especificações dos equipamentos utilizados na síntese, purificação e caracterização de porfirinas.

EQUIPAMENTO	MODELO	FABRICANTE
Balança analítica	ACL 310.3	Acculab, Nova Iorque, USA
Bomba de vácuo	V700	Buchi, Suíça
Espectrofotômetro UV/Vis	USB4000	Ocean Optics Inc, USA
Espectrômetro de massa	AmaZon SL	Bruker, Alemanha
Espectrômetro de RMN	Avance III de 400 MHz	Bruker, Alemanha
Espectrômetro <i>flash Kinetic</i>	LKS.60	Applied Photophysics Ltd, Inglaterra
Espectrofluorímetro	SPEX Fluorolog 3-22	Horiba-Jobin-Yvon Inc, USA
Evaporador rotativo	WB 2000	Heidolph, Germany
Fotomultiplicador	R5509-42	Hamamatsu Photonics, Japão
Lâmpada UV/Vis	4LC	Vilber Lourmat, França
Laser Nd:YAG	Quanta Ray GCR130	Spectra-Physics, USA
Placa de aquecimento	A250684	FALC Instruments, Itália
Reactor de microondas	Mars 5	CEM Corporation, USA
Sistema de HPLC	Ultimate 3000	Dionex, USA
Sistema de purificação de água	NHP	Human Corporation, Coreia

Tabela 3.3. Especificações dos materiais utilizados na síntese, purificação e caracterização de porfirinas.

MATERIAL	MARCA	REFERÊNCIA	FABRICANTE
Cartucho de celulose	Whatman	2800280	Whatman Ltd, Maidstone, Inglaterra
Coluna C18 150x4,6 mm	Hichrom 5	HI-3.5C18-150A	Hichrom Limited, Berkshire Inglaterra
Placas de TLC com indicador	Fluka	60778	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Papel de filtro Ø 9 cm Papel de filtro Ø 15 cm	Whatman	8561 5541	Whatman Ltd, Maidstone, Inglaterra
Areia 0,25–0,30 nm	Panreac	211160	Panreac Química, Barcelona, Espanha
Sílica 200–500 µm	Sigma	242179	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Sílica 40–63 µm	Panreac	176448	Panreac Química, Barcelona, Espanha
Sílica gel 60H	Fluka Analytical	60770	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Parafina	Sigma	18512	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA

3.1.2. Síntese e purificação de porfirinas

Todos os reagentes utilizados na síntese das porfirinas apresentavam grau de pureza de síntese. Por sua vez, e os solventes apresentavam, na sua maioria, pureza analítica ou espectroscópica. Todos os reagentes e solventes foram utilizados tal como adquiridos, à excepção do pirrol que necessitou de ser destilado previamente a cada utilização.

A monitorização das reacções foi efectuada por cromatografia de camada fina (tlc) e/ou espectroscopia de ultravioleta/visível (UV/Vis).

3.1.2.1. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(cinamil)porfirina (H₂TCP)

A síntese desta porfirina foi tentada por três metodologias distintas: adaptação do método de Adler-Longo (estratégia 1), método de Lindsey (estratégia 2) e adaptação do método de Zakavi ^[120] (estratégia 3).

3.1.2.1.1. Estratégia 1: Método de Adler-Longo

Esta estratégia consistiu numa adaptação do método de Adler-Longo, descrito na secção 1.3.1.1 (Figura 3.1).

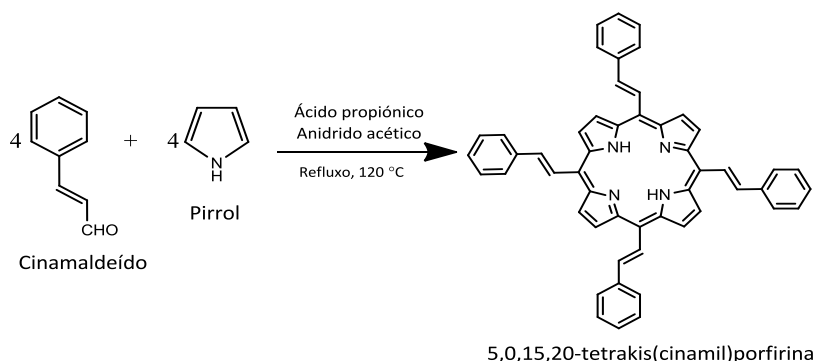


Figura 3.1. Reacção de síntese da H₂TCP por adaptação do método de Adler-Longo.

A um balão de duas tubuladuras contendo uma mistura de ácido propiónico e anidrido acético (100:25 mL), adicionaram-se 4,8 mL de cinamaldeído (0,036 mol). A mistura reaccional foi colocada em

refluxo a 120 °C e só depois se adicionaram, gota a gota, 2,5 mL (0,036 mol) de pirrol. Após 2 h em refluxo, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer.

O ácido foi evaporado até à secura e o sólido resultante dissolvido em diclorometano (DCM). A solução resultante foi posteriormente filtrada para um kitasato e lavada em contínuo com água corrente (Figura 3.2 a). Durante o processo de lavagem, adicionou-se bicarbonato de sódio até deixar de se observar efervescência, facto indicativo da completa neutralização do ácido. Após esta lavagem, efectuou-se uma lavagem tradicional com recurso a uma ampola de decantação (Figura 3.2 b). Para o efeito, utilizou-se água destilada e uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Recolheu-se a fase orgânica e removeu-se o excesso de água por adição de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro. Este sal foi posteriormente removido por filtração e o solvente foi evaporado num evaporador rotativo.



Figura 3.2. Montagens experimentais utilizadas para efectuar as lavagens (a) em contínuo e (b) com uma ampola de decantação.

Seguidamente realizou-se uma extracção de Soxhlet usando metanol^a como solvente extractor. O sistema de extracção de Soxhlet, desenvolvido em 1879 por Franz von Soxhlet, é um método simples de extracção sólido-líquido que permite a separação de compostos com base na solubilidade que apresentam no solvente extractor. Por conseguinte, a escolha adequada do solvente é um aspecto crítico na eficácia desta técnica. Adicionalmente, as temperaturas elevadas da extracção permitem aumentar a solubilidade das impurezas no solvente extractor.

A insolubilidade da porfirina em metanol foi previamente assegurada por tlc (DCM) e espectroscopia de UV/Vis. A porfirina sólida foi posteriormente colocada num cartucho de celulose apropriado, e efectuou-se extracção num banho de parafina a 100 °C, como representado na montagem experimental da Figura 3.3.

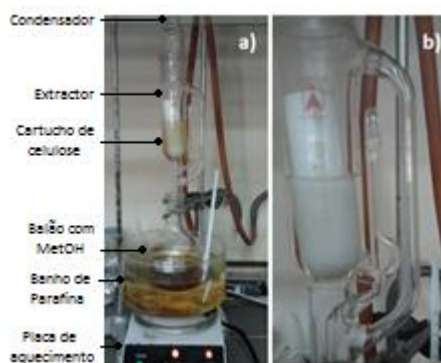


Figura 3.3. (a) Montagem experimental adoptada na realização da extracção de Soxhlet. (b) Detalhe do extractor de Soxhlet onde se inseriu o cartucho de celulose com a amostra sólida.

^a A temperatura de ebulição do metanol é de 65 °C.

Quando o solvente extractor em contacto com o cartucho adquiriu um aspecto límpido desligou-se a placa de aquecimento, retirou-se o cartucho e dissolveu-se o sólido em DCM. A realização de um tlc (DCM) e de um espectro de UV/Vis do sólido dissolvido em DCM e do metanol usado na extracção permitiu confirmar que a porfirina se encontrava presente apenas na fracção correspondente ao sólido. O DCM usado para dissolver o sólido foi parcialmente evaporado e prosseguiu-se com a purificação da porfirina recorrendo à cromatografia em camada fina preparativa (sílica gel 60 H), usando DCM como eluente (Figura 3.4). Terminada a cromatografia, raspou-se a mancha correspondente à porfirina para um copo, adicionou-se tetrahidrofurano (THF) e removeu-se a sílica por filtração a pressão normal.

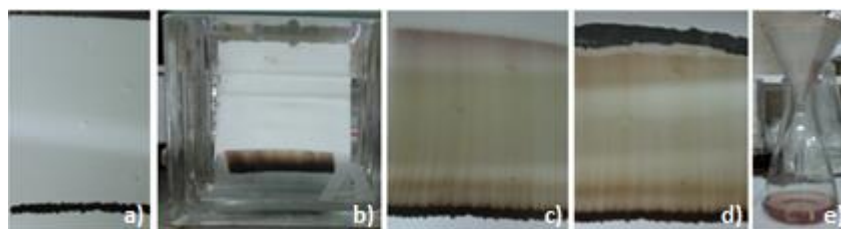


Figura 3.4. Representação dos vários passos envolvidos na purificação da H₂TCP por cromatografia em camada fina preparativa. (a) A solução contendo a porfirina foi aplicada na extremidade da placa preparativa. (b) A placa foi inserida no interior de uma tina de cromatografia contendo o eluente. (c) Os diferentes componentes da mistura foram arrastados com base nas diferenças de afinidade pela fase estacionária. (d) A mancha correspondente à porfirina foi raspada para um copo ao qual se adicionou THF. (e) A sílica foi removida por filtração.

Após a purificação, efectuou-se a caracterização da porfirina obtida por espectroscopia de UV/Vis (secção 3.1.3.1), espectrometria de massa (secção 3.1.3.4) e ressonância magnética nuclear de protão (secção 3.1.3.5). Efectuou-se também a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência (secção 3.1.3.6.1) e de oxigénio singlete (secção 3.1.3.6.2).

3.1.2.1.2. Estratégia 2: Método de Lindsey

A síntese da H₂TCP foi também efectuada com base no método de dois passos (Figura 3.5) proposto por Lindsey, descrito na secção 1.3.1.2.

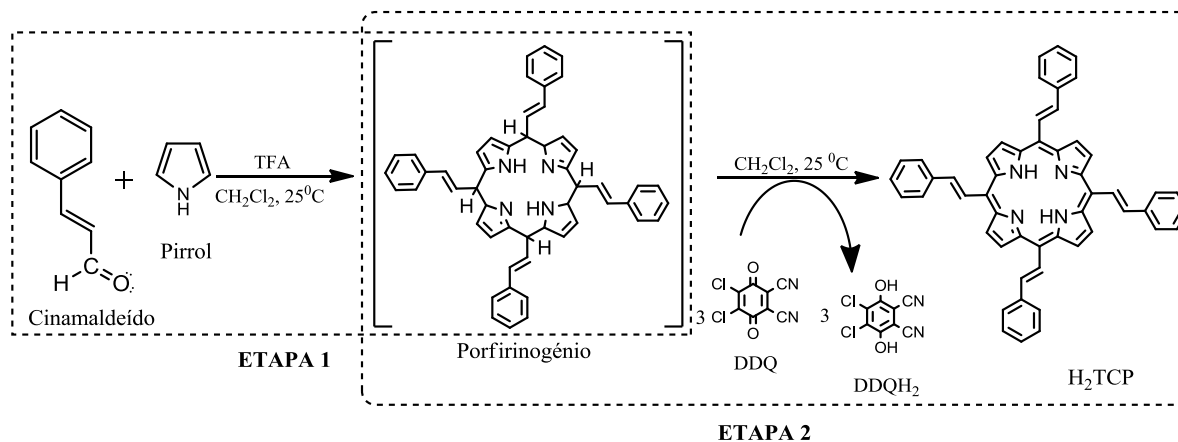


Figura 3.5. Reacção de síntese da H₂TCP pelo método de dois passos proposto por Lindsey.

Num balão de duas tubuladuras adicionaram-se 300 mL de DCM, previamente passado por uma coluna de alumina neutra para remoção da água vestigial, 0,8 mL de cinamaldeído (6 mmol), 0,42 mL de

pirrol (6 mmol) e 4 a 5 gotas de TFA. A reacção decorreu sob atmosfera de azoto à temperatura ambiente, durante 1 h, no escuro (Figura 3.6)



Figura 3.6. Montagem experimental adoptada na síntese da H₂TCP pelo método de Lindsey.

Seguidamente, efectuou-se um espectro de UV/Vis e um espectro de massa para caracterizar o produto formado. De seguida, adicionou-se à mistura reaccional uma quantidade equimolar, relativamente ao aldeído, do agente oxidante 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ). Este agente oxidante promove a oxidação do porfirinogénio e a consequente conversão na porfirina correspondente. Efectuou-se um tlc (DCM) e um espectro de UV/Vis para confirmar a presença da porfirina.

Esta reacção foi posteriormente repetida usando as mesmas quantidades de solvente/reagentes. Todavia, foram introduzidas duas alterações relativamente ao método agora descrito: o DCM utilizado como solvente apresentava grau de pureza espectroscópica e os reagentes foram adicionados através de um septo com recurso a seringas.

3.1.2.1.3. Estratégia 3: Método de Zakavi

A terceira estratégia adoptada na síntese H₂TCP consistiu numa adaptação do protocolo descrito por Zakavi em 2010^[120].

Num balão de duas tubuladuras adicionaram-se 6 mL de água destilada, 130 mL de ácido propiónico, 0,5 mL de piridina, 1,5 mL de cinamaldeído (12 mmol) e 2,1 mL de pirrol (30 mmol). A mistura foi colocada em refluxo a 140 °C. Decorridos 30 min, adicionaram-se mais 0,6 mL de cinamaldeído (4,76 mmol). Após 2 h de refluxo, desligou-se o aquecimento e adicionaram-se 150 mL de clorofórmio. A lavagem da solução foi efectuada com água destilada e uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 50 mM para neutralização do ácido. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado até à secura. Adicionou-se água destilada e colocou-se em refluxo a 100 °C. Ao fim de 2 h, filtrou-se a solução a pressão reduzida e efectuou-se um tlc (DCM) do sólido dissolvido em DCM e da água utilizada no refluxo.

3.1.2.2. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(α-hexilcinamaldeído) porfirina

A síntese da 5,10,15,20-tetraquis(α-hexilcinamaldeído)porfirina (Figura 3.7) foi efectuada por adaptação do método de Adler-Longo.

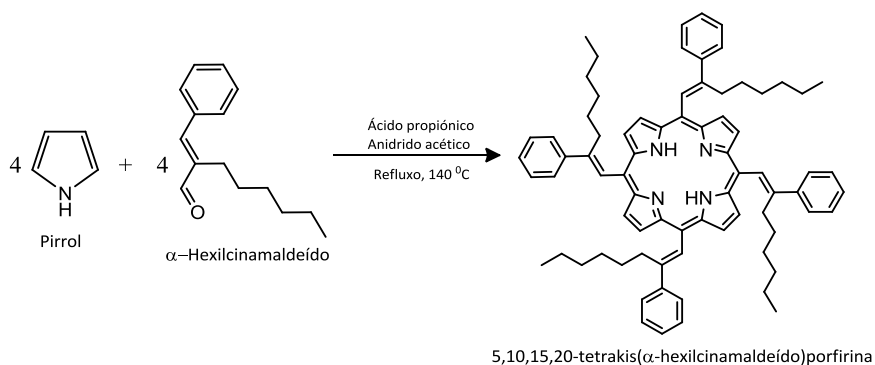


Figura 3.7. Reacção de síntese da 5,10,15,20-tetraquis(α-hexilcinamaldeído)porfirina por adaptação do método de Adler-Longo.

Num balão de duas tubuladuras adicionaram-se 100 mL de ácido propiónico, 20 mL de anidrido acético e 4,3 mL de α-hexilcinamaldeído (0,019 mol). A mistura reaccional foi colocada em refluxo a 140 °C, e de seguida adicionou-se, gota a gota, 1,4 mL de pirrol (0,019 mol). Após 3 h em refluxo efectuou-se um espectro de UV/Vis com e sem DDQ na cuvette.

Como se verificou a ausência da banda Soret, prosseguiu-se o refluxo por mais 2 h e efectuou-se um novo espectro que, contudo, não revelou qualquer alteração.

Apesar dos espectros indicarem a ausência do composto, evaporou-se o ácido e dissolveu-se o sólido em DCM. A solução foi neutralizada por uma solução saturada de bicarbonato de sódio e lavada com água destilada. Recolheu-se a fase orgânica, secou-se com Na₂SO₄ e efectuou-se um tlc (DCM/EtOH 9:1) e um espectro de massa.

3.1.2.3. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina (2-TQP)

A síntese da 2-TQP foi efectuada por adaptação do método de Adler-Longo (Figura 3.8) e por tecnologia de microondas.

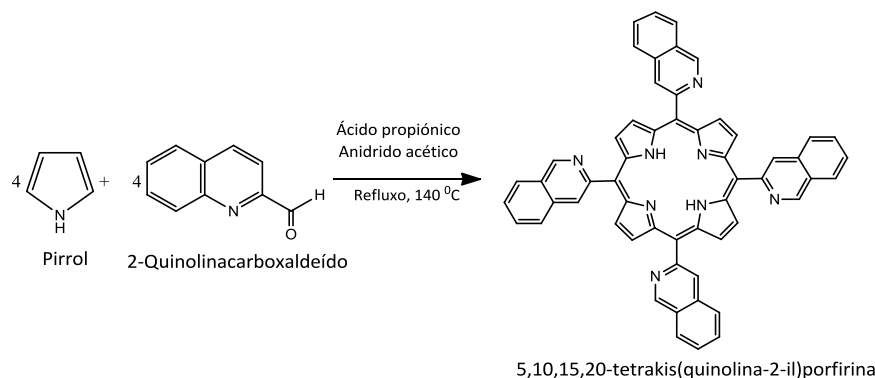


Figura 3.8. Representação da reacção de síntese da 2-TQP por adaptação do método de Adler-Longo.

3.1.2.3.1. Síntese pelo método de Adler-Longo

A 1,14 g de 2-quinolinacarboxaldeído (0,007 mol) adicionaram-se 150 mL de ácido propiónico, 50 mL de anidrido acético e 0,5 mL de pirrol (0,007 mol). Após 4 h em refluxo a 140 °C, efectuou-se um tlc (DCM/THF 9:1) e um espectro de UV/Vis para confirmar a presença de porfirina na mistura reaccional. Desligou-se o aquecimento e evaporou-se o ácido até à secura.

O sólido foi dissolvido em DCM e a solução lavada com água destilada e uma solução saturada de bicarbonato de sódio para neutralização do ácido. Por fim adicionou-se uma solução concentrada de cloreto de sódio (NaCl), recolheu-se a fase orgânica e removeu-se a água por adição de sulfato de sódio anidro. Após filtrar, evaporou-se parcialmente o solvente e efectuou-se um tlc (DCM/THF 9:1).

A purificação da 2-TQP foi efectuada por cromatografia em camada fina preparativa, usando DCM como eluente. A mancha correspondente à porfirina foi raspada e dissolvida em THF. Efectuou-se a filtração da solução para remover a sílica e transferiu-se a solução para um frasco de amostra. O solvente foi evaporado por exposição ao ar.

Após a purificação, efectuou-se a caracterização da porfirina obtida por espectroscopia de UV/Vis, espectrometria de massa e ^1H RMN. Efectuou-se também a determinação do rendimento quântico de fluorescência e de oxigénio singleto.

3.1.2.3.2. Síntese assistida por tecnologia de microondas

Num vaso de teflon adicionaram-se 0,5 g de 2-quinolinacarboxaldeído (0,003 mol), 3 mL de ácido propiónico e 220 μL de pirrol (0,003 mol). A adição de apenas 0,5 g do aldeído deve-se às especificações de segurança do reactor de microondas Mars 5 (CEM Corporation) relativas à quantidade máxima de conteúdo orgânico permitido.

O vaso reaccional foi introduzido no equipamento e este foi programado para potência de 300 W, temperatura de 120 $^{\circ}\text{C}$, com uma rampa de aquecimento de 5 minutos (25–120 $^{\circ}\text{C}$) e 5 minutos de reacção a 120 $^{\circ}\text{C}$. Após o arrefecimento do equipamento, que demorou cerca de 15 minutos, retirou-se o vaso reaccional e dissolveu-se o sólido em DCM. Efectuou-se um tlc (DCM/THF 9:1) e um espectro de UV/Vis.

3.1.2.4. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina (4-TQP)

A síntese da 4-TQP foi efectuada por adaptação do método de Adler-Longo (Figura 3.9) e em concordância com o descrito na secção 3.1.2.3.1. para a 2-TQP.

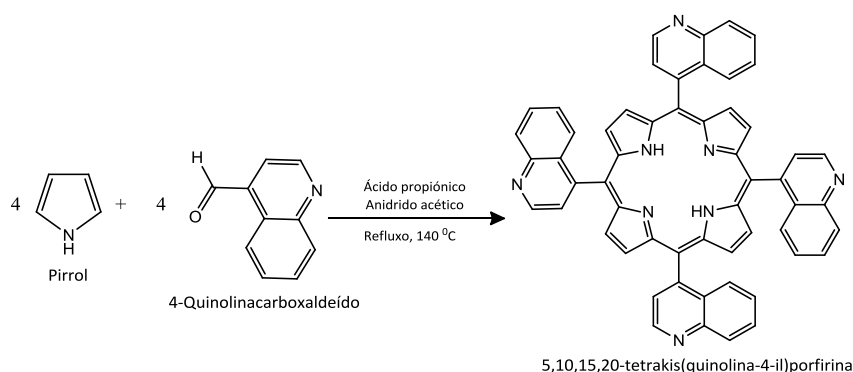


Figura 3.9. Representação da reacção de síntese da 4-TQP por adaptação do método de Adler-Longo.

A 0,5 g de 4-quinolinacarboxaldeído (0,003 mol) adicionaram-se 65 mL de ácido propiónico, 22 mL de anidrido acético e 0,2 mL de pirrol (0,003 mol). Após 4 h em refluxo a 140 $^{\circ}\text{C}$, efectuou-se um tlc (DCM/THF 9:1) para confirmar a presença da porfirina na mistura reaccional. Desligou-se o aquecimento e evaporou-se o ácido até à secura. O sólido foi dissolvido em DCM e a solução resultante foi lavada com água destilada e uma solução saturada de bicarbonato de sódio para neutralização do ácido. Recolheu-se

a fase orgânica e removeu-se a água pela adição de Na_2SO_4 anidro. Efectuou-se um tlc (DCM/THF 9:1) e evaporou-se parcialmente o solvente. Tentou-se efectuar a purificação por cromatografia em coluna, usando uma mistura de DCM e THF (9:1) como eluente. Como este método se revelou insuficiente, a purificação da 4-TQP foi efectuada por cromatografia de camada fina preparativa, usando a mesma mistura como eluente. Após a purificação do composto efectuou-se a sua caracterização por espectroscopia de UV/Vis, espectrometria de massa e ^1H RMN.

3.1.2.5. Síntese da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina (TCPP)

A síntese da TCPP foi efectuada de acordo com o método de Adler-Longo (Figura 3.10).

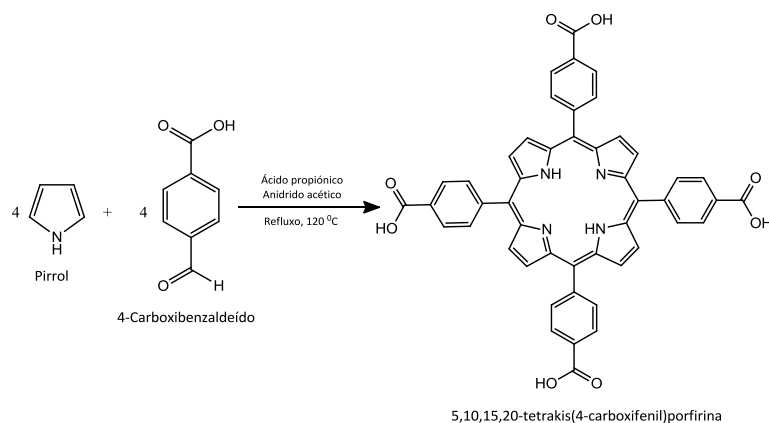


Figura 3.10. Representação da reacção de síntese da TCPP por adaptação do método de Adler-Longo.

A 5 g de 4-carboxibenzaldeído (0,03 mol) adicionaram-se 100 mL de ácido propiónico, 30 mL de anidrido acético e 4 mL de pirrol (0,06 mol). Após 2,5 h em refluxo a 120 °C, parou-se a reacção e deixou-se em repouso para promover a precipitação do composto. Passadas 48 h removeu-se o ácido propiónico e o anidrido acético por filtração a pressão reduzida (Figura 3.11a) e o sólido obtido foi transferido para um balão de fundo redondo, ao qual se adicionou água destilada até cerca de metade da capacidade do balão. A mistura foi novamente colocada em refluxo durante 2 h a 100 °C. Após a filtração da solução a pressão reduzida com um funil de placa porosa G3 (Figura 3.11b), obtiveram-se cristais de cor púrpura (Figura 3.11c).

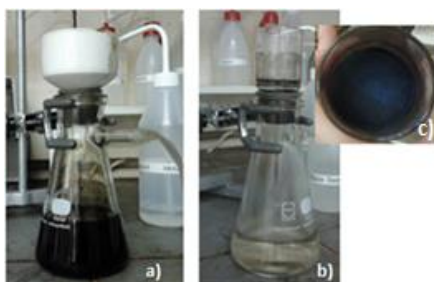


Figura 3.11. (a) Filtração do ácido a pressão reduzida, com recurso a um funil de Büchner. (b) Filtração efectuada com um funil de placa porosa após o refluxo em água, da qual se obtém o (c) sólido da porfirina.

A presença da TCPP foi confirmada por tlc (EtOH) e a sua caracterização foi efectuada por espectroscopia de UV/Vis, espectrometria de massa e ^1H RMN. Efectuou-se também a determinação do rendimento quântico de oxigénio singleto.

3.1.3. Caracterização das porfirinas sintetizadas

3.1.3.1. Espectroscopia de UV/Vis

A grande maioria dos compostos, orgânicos e inorgânicos, absorve na região ultravioleta e visível (UV/Vis) do espectro electromagnético, compreendida entre os 200 e os 750 nm (Figura 3.12) ^[121].

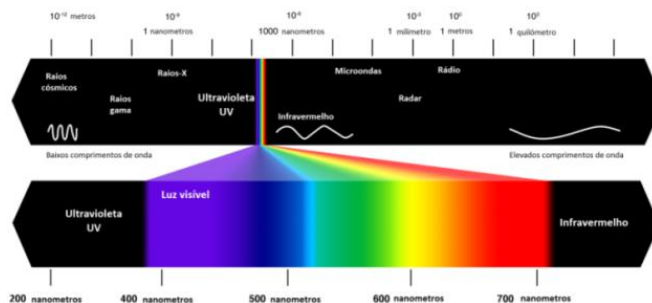


Figura 3.12. Representação do espectro electromagnético.

Em consequência da interacção da radiação com a matéria podem ocorrer diversos fenómenos (*e.g.*, dispersão, fluorescência, fosforescência), entre os quais a absorção de radiação. Este fenómeno só é possível em compostos cuja estrutura apresente grupos funcionais com ligações covalentes insaturadas e/ou electrões não-ligantes resultantes da presença de heteroátomos (*e.g.*, azoto e oxigénio). Estes grupos funcionais, usualmente designados cromóforos, absorvem energia na zona UV/Vis do espectro electromagnético, promovendo a transição de electrões de um estado electrónico de baixa energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado) (Figura 3.13). Estas transições ocorrem preferencialmente de uma orbital molecular ocupada de maior energia (HOMO) para uma orbital desocupada de menor energia (LUMO) ^[121, 122].

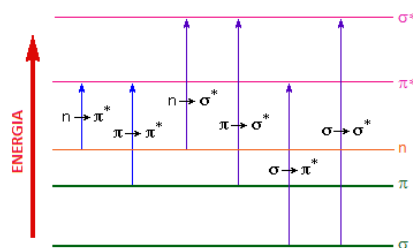


Figura 3.13. Representação dos vários níveis energéticos electrónicos e das transições que poderão ocorrer em consequência da absorção de luz UV/Vis [adaptado de 121].

As transições entre os níveis electrónicos obedecem a regras de selecção específicas, pelo que nem todas são permitidas. Resumidamente, uma transição electrónica é proibida sempre que envolva a alteração do *spin* do electrão excitado e ocorra entre orbitais com a mesma simetria. Por conseguinte, e apesar de a probabilidade ser bastante reduzida, a ocorrência destas transições está associada a baixas intensidades de absorção.

Os diferentes cromóforos apresentam transições características a comprimentos de onda específicos. No entanto, parâmetros como o solvente ou o pH podem causar perturbações no ambiente químico do cromóforo e promover a deslocação (*e.g.*, desvio batocrómico para maior comprimento de onda (vermelho) ou desvio hipsocrómico para menor comprimento de onda (azul)) e/ou alterações na intensidade (*e.g.*, efeito hiperocrómico para maior intensidade ou hipsocrómico para menor intensidade) da banda de absorção ^[121].

A espectroscopia de UV/Vis é uma técnica de grande notoriedade em química analítica, que no contexto desta dissertação foi aplicada ao controlo da evolução das reacções de síntese e à confirmação da presença e identidade das porfirinas após a sua síntese e purificação. Como já mencionado, as porfirinas são sistemas aromáticos altamente conjugados, que apresentam um espectro de absorção caracterizado por transições $\pi \rightarrow \pi^*$, interpretadas com base no modelo das “quatro-orbitais” (2 orbitais π HOMO e 2 orbitais π^* LUMO), proposto em 1959 por Martin Gouterman^[98].

De modo sucinto, o espectro de absorção destes compostos caracteriza-se pela presença de uma banda de grande intensidade entre os 400–420 nm, designada a banda Soret ou banda B, correspondente à transição ($S_0 \rightarrow S_2$) permitida pelas regras de simetria, e quatro bandas de menor intensidade entre os 500–700 nm, as bandas Q, correspondentes a transições ($S_0 \rightarrow S_1$) proibidas pelas regras de simetria.

A intensidade das quatro bandas Q é variável e está intimamente relacionada com o tipo e a posição dos grupos substituintes presentes no macrociclo, os quais podem estabilizar ou destabilizar as orbitais HOMO e LUMO do anel porfirínico. De acordo com a intensidade relativa destas bandas, usualmente denotadas por números romanos, Stern classificou os espectros de absorção das porfirinas em quatro tipos: *etio* (IV>III>II>I), *rhodo* (III>IV>II>I), *oxorhodo* (II>II>IV>I) e *filo* (IV>II>III>I) (Figura 3.14)^[93,98].

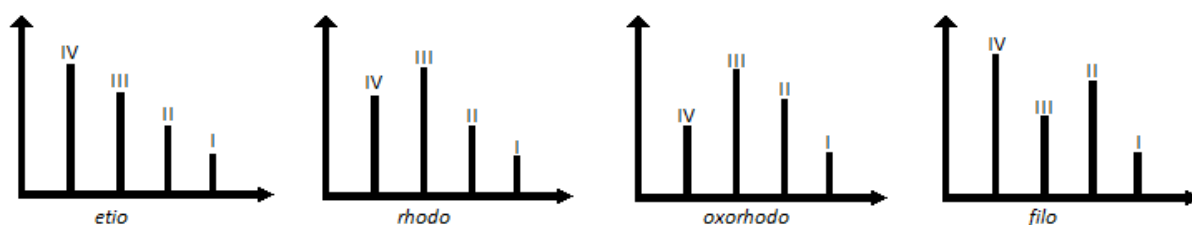


Figura 3.14. Classificação do espectro UV/Vis de uma porfirina de na forma de base livre com base nas diferenças de intensidade das bandas Q [adaptado de 98].

O espectro de absorção das porfirinas é muito sensível ao ambiente químico envolvente. Deste modo, enquanto as variações dos substituintes periféricos dão origem a pequenas alterações na intensidade e no comprimento de onda máximo de absorção, a protonação dos dois átomos de azoto internos ou a substituição dos dois átomos de hidrogénio centrais por metais, promove a alteração da simetria das orbitais (de D_{2h} para D_{4h}), da qual resulta uma simplificação do espectro que se manifesta pela presença de apenas duas bandas Q^[93,98]. Apesar da relevância destes aspectos, o objectivo desta dissertação não passa pela caracterização exaustiva das orbitais.

3.1.3.1.1. Determinação dos coeficientes de extinção molar (ϵ)

O espectrofotómetro de UV/Vis é um equipamento constituído por uma fonte de luz UV/Vis, um monocromador e um detector que mede a intensidade da luz transmitida pela amostra. A absorvância (A) é uma função entre intensidade da luz incidente (I_0) e a intensidade da luz transmitida pela amostra (I) (equação 3.1)^[122].

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.1)$$

A absorvância pode também ser expressa pela lei de Beer-Lambert (equação 3.2). De acordo com esta lei, a absorvância é directamente proporcional à concentração (c) do composto em estudo, ao percurso óptico ou largura da cuvette (l) e ao coeficiente de extinção molar (ϵ).

$$A = \epsilon lc \quad (3.2)$$

O coeficiente de extinção molar é um parâmetro intrínseco a cada composto, que define a sua capacidade de absorção e, deste modo, permite inferir se as transições observadas são permitidas (ϵ elevado) ou proibidas (ϵ reduzido) ^[121,122].

A determinação do ϵ das porfirinas sintetizadas foi efectuada por medição da absorvância de uma série de soluções de concentração conhecida e aplicação directa da lei de Beer-Lambert.

3.1.3.2. Cromatografia de camada fina (tlc)

A cromatografia de camada fina foi desenvolvida em 1938 por Nikolai Izmailov e Maria Shraiber, no Instituto de Farmácia Experimental da Universidade de Kharkov, na Ucrânia. Porém, esta técnica só passou a ser utilizada de forma generalizada após a publicação dos estudos de Egon Stahl, em 1956 ^[123-25].

A tlc é um método versátil, simples, rápido, eficaz e económico, que permite identificar, separar e isolar componentes presentes numa mistura reaccional. Esta técnica pode ser utilizada quer como método analítico, para determinar o número de componentes na mistura, quer como método preparativo para o isolamento de um componente específico da mistura ^[123-125].

A placa de tlc é geralmente constituída por vidro ou metal (*e.g.*, alumínio) revestidos por uma fina camada de um composto sólido adsorvente, geralmente sílica gel (SiO_2) ou alumina (Al_2O_3), à qual se designa fase estacionária.

A amostra é colocada na extremidade inferior da placa (linha de base), e esta é inserida numa câmara com o eluente, também designado fase móvel (Figura 3.15). O eluente move-se pela fase estacionária por capilaridade, arrastando os vários componentes da mistura de acordo com as respectivas afinidades com as fases móvel e estacionária. Diferenças de afinidade traduzem-se por diferentes taxas de migração e possibilitam a separação dos diversos componentes da mistura. Quando a fase móvel se move uma distância adequada, remove-se a placa da câmara e marca-se a frente do solvente ^[124].

As porfirinas apresentam uma fluorescência avermelhada bastante característica. Assim, a visualização do tlc com recurso a uma lâmpada de UV (365 nm) permite a identificação da porfirina.

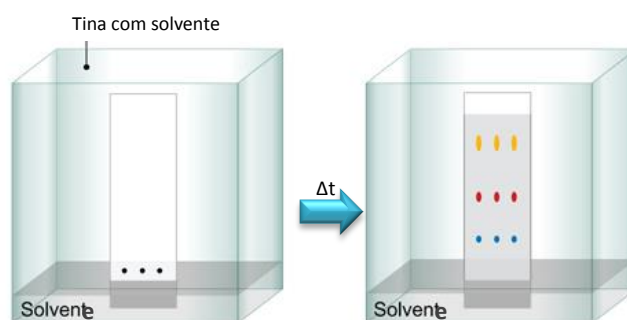


Figura 3.15. Representação esquemática do processo de cromatografia em camada fina.

A migração dos diferentes constituintes de uma amostra é dada pelo factor de retenção (R_f), um parâmetro que estabelece a relação entre a migração do composto e a migração do eluente (equação 3.3) ^[124].

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pelo composto}}{\text{Distância percorrida pelo eluente}} \quad (3.3)$$

Neste trabalho experimental, aplicaram-se os princípios da tlc para monitorizar o decorrer das reacções e verificar a presença de porfirinas e de possíveis subprodutos das reacções. Esta técnica foi também utilizada para isolar as porfirinas dos restantes componentes presentes na mistura.

3.1.3.3. Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC)

A cromatografia líquida de elevada performance (HPLC)^a, desenvolvida no final da década de 1960, é uma técnica utilizada na separação de porfirinas. O acoplamento das colunas de HPLC, cuja tecnologia sofreu grandes avanços nos últimos anos, a detectores específicos de elevada sensibilidade (*e.g.*, detector de fluorescência, de UV ou de massa), potenciou a precisão e especificidade da caracterização destes compostos. Actualmente, o HPLC-MS é a técnica de eleição para a separação de tetrapirróis. As potencialidades desta metodologia são eficazmente aplicadas em diagnóstico clínico (*e.g.*, porfíria), e na descoberta de novos fármacos e de eventuais produtos de degradação ou de outras impurezas presentes nos mesmos^[126].

Nesta dissertação, a identificação das porfirinas foi efectuada por HPLC de fase reversa, uma técnica que permite a separação de porfirinas com elevada resolução. Para o efeito, utilizou-se uma coluna Hichrom 5 C18 de dimensões 150 × 4,6 mm. Esta coluna caracteriza-se pela presença de uma cadeia hidrocarbonada constituída por 18 átomos de carbono, que lhe confere um carácter apolar. A selecção das fases móvel e estacionária deve ter em consideração as interacções que estas duas fases podem estabelecer com os grupos substituintes das porfirinas. A fase móvel seleccionada apresenta um carácter aquoso polar que permite que os componentes polares da mistura atravessem rapidamente a coluna e, por conseguinte, apresentem menor tempo de retenção^b na coluna.

As soluções contendo os compostos para análise foram diluídas numa solução de acetonitrilo com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, até uma concentração compreendida entre 10⁻⁵–10⁻⁶ M. A solução foi analisada após filtração com um filtro de porosidade 0,2 µm e homogeneização no vortex. Os parâmetros de aquisição e o gradiente utilizado na eluição encontram-se especificados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Especificações do método de HPLC adoptado na identificação das porfirinas em estudo.

Parâmetros de aquisição dos cromatogramas de HPLC	
Coluna	Hichrom 5 C18 (150 × 4,6 mm)
Solvente A	Acetonitrilo
Solvente B	Água ultra-pura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico
Gradiente	0–5 min: 40% B e 60% A; 5–7 min: 30% B e 70% A; 7–10 min: 20% B e 80% A; 10–20 min: 10% B e 90% A >20 min: 100% A
Fluxo	0,8 mL/min

Após a separação, o(s) pico(s) obtido(s) no cromatograma de HPLC foram identificados por espectrometria de massa.

^a HPLC: Basics: Fundamentals of Liquid Chromatography, Courtesy of Agilent Technologies Inc. 1–37

^b O tempo de retenção é o tempo médio que o composto em análise demora a atingir o detector depois de passar através da coluna de HPLC. Este parâmetro é fortemente influenciado pelas características da coluna (*e.g.*, tipo de empacotamento) e da fase móvel.

3.1.3.4. Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa é uma técnica muito sensível e específica que permite detectar e identificar uma grande diversidade de compostos, nomeadamente porfirinas, e que, por isso, se apresenta como uma das técnicas de maior importância ao nível da investigação científica [126]. Esta técnica, cujos princípios fundamentais datam do início do século XX com os estudos de J. Thomson, permite a identificação e análise da razão massa/carga (m/z) de iões em fase gasosa [121,127-129]. Apesar de os princípios que lhe estão subjacentes terem permanecido inalterados, os equipamentos de suporte que permitem efectuar estas determinações estão em constante inovação [129].

Um espectrómetro de massa é constituído por três componentes essenciais: a fonte de ionização, responsável pela produção de iões em fase gasosa; o analisador, responsável pela separação dos iões de acordo com a sua razão m/z ; e o detector, que produz um sinal proporcional à abundância relativa dos iões que o atingem e permite estabelecer um espectro de massa, isto é, um gráfico que traduz a abundância dos iões em função da razão m/z [121; 126-128].

O primeiro passo para a aquisição de um espectro de massa consiste na conversão das moléculas do analito em iões, de carga positiva ou negativa, capazes de interagir com os campos eléctricos e magnéticos do espectrómetro, e cujas diferenças na magnitude de interacção permitam a sua separação no analisador [127,129,132].

Apesar de existirem diversas metodologias de ionização (*e.g.*, ESI, CI, EI, FAB, MALDI,...), [129,132], a escolha deve ser efectuada com base nas características da amostra em estudo [128]. A análise dos compostos discutidos nesta dissertação foi realizada com recurso à fonte de ionização por electrospray (ESI), considerada a técnica de eleição para a determinação de porfirinas, quer em soluções orgânicas, quer em amostras biológicas e clínicas [126,132].

A ionização por ESI, proposta em 1966 por Malcolm Dole e acoplada à espectrometria de massa por John Fenn, Prémio Nobel da Química em 2002, é um método de ionização suave que permite a análise de compostos de elevado peso molecular [127-130]. De forma sumária, o composto de interesse é dissolvido num solvente volátil e injectado, a um determinado fluxo, num capilar ao qual se aplica uma diferença de potencial elevada, positiva ou negativa consoante o modo de análise pretendido. Em consequência da voltagem elevada, gera-se um gradiente eléctrico responsável pela separação de cargas à superfície do líquido e pela sua projecção do capilar. A combinação da voltagem com um fluxo de gás nebulizador (*e.g.*, N_2) promove a evaporação do solvente e a formação de iões em fase gasosa, isto é, uma espécie de *spray* com gotas carregadas. A evaporação do solvente promove a redução contínua do tamanho da gotícula e o aumento da sua densidade de carga superficial (Figura 3.16). Os iões assim formados são acelerados em direcção ao analisador, onde são separados em função da razão m/z e detectados em conformidade com a sua intensidade relativa [127,131].

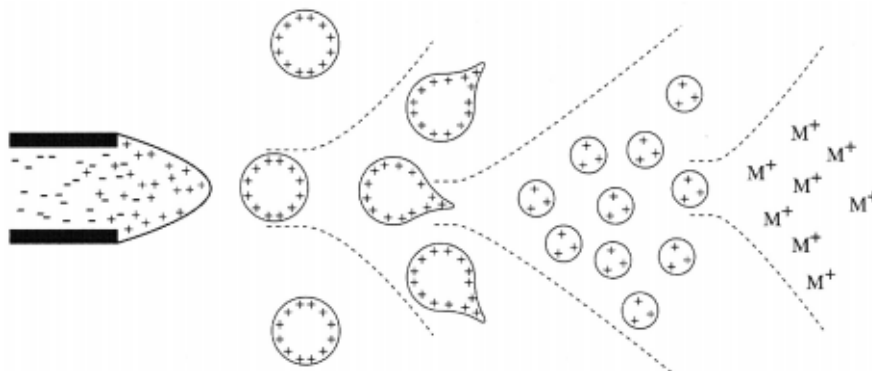


Figura 3.16. Representação esquemática da ionização por electrospray [adaptado de 127].

À semelhança da fonte de ionização, há também uma grande diversidade de analisadores que podem ser utilizados em espectrometria de massa (*e.g.*, quadrupólo, tempo de voo, “armadilha”^a de iões (IT), analisador de transformada de Fourier, entre outros) ^[130,131].

O espectrómetro de massa utilizado estava equipado com um detector do tipo “armadilha” de iões. Este detector apresenta elevada sensibilidade e resolução e permite a realização de análises sequenciais (MSⁿ), de grande relevância na elucidação da estrutura molecular ^[131]. Na análise sequencial, o ião de interesse é isolado com base na razão *m/z* e dissociado por colisão com as moléculas do gás nebulizador. Os iões resultantes são posteriormente isolados e analisados ^[128,131].

A análise sequencial é uma ferramenta poderosa que permite elucidar estruturas moleculares relativamente complexas ^[132].

As análises por espectrometria de massa foram efectuadas em modo positivo, num espectrómetro de massa AmaZon SL da Bruker.

As soluções contendo os compostos para análise foram diluídas numa solução de acetonitrilo com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e introduzidas na fonte de ESI a um fluxo de 4 µL/min. Os parâmetros de aquisição encontram-se especificados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de massa.

Modo	
Fonte	ESI
Polaridade do ião	Positivo
Modo	UltraScan
Tune	
Trap drive	50–70 *
Saída do capilar	140 V
Temperatura secagem	220 °C
Nebulizador	20 psi
Gás secagem	9 L/min

* O trap drive foi ajustado nas várias aquisições de modo a melhorar a resolução do pico obtido.

Os resultados obtidos foram processados com recurso ao software Compass DataAnalysis 4.0, da Bruker Daltonics.

3.1.3.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), desenvolvida em 1945 por Bloch e Purcell, é uma técnica de grande relevância em diversas áreas da ciência (*e.g.*, medicina, (bio)química) que, no caso particular da química orgânica, possibilita a obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura dos compostos em estudo ^[129,133]. De forma sumária, esta técnica tira partido de uma propriedade magnética dos núcleos atómicos, designada *spin*. Quando os núcleos com *spin* diferente de zero são submetidos à acção de um campo magnético externo (\vec{B}_0) podem alinhar-se de forma paralela (estado de baixa energia) ou anti-paralela (estado de elevada energia) a \vec{B}_0 (Figura 3.17) ^[133-135]

^a O detector “armadilha” de iões deriva da designação inglesa *ion trap*. Neste tipo de detector os iões são retidos/aprisionados e posteriormente analisados

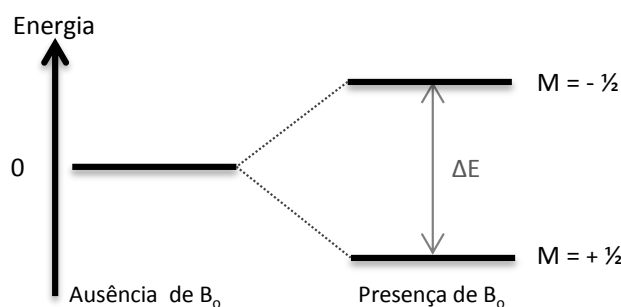


Figura 3.17. Desdobramento energético de um núcleo de spin $\frac{1}{2}$, por acção de \vec{B}_0 [adaptado de 135].

O sinal de RMN resulta da ocorrência de transições entre os níveis energéticos correspondentes às diferentes orientações permitidas do spin nuclear quando este se encontra sujeito à acção de \vec{B}_0 [134,135].

Numa experiência de RMN, a posição do sinal de ressonância é dada com base no seu desvio químico (δ), em ppm, em relação à posição de um sinal de referência ($\delta=0$), geralmente o tetrametilsilano (TMS) [133,135].

O campo efectivamente sentido por um núcleo depende não só das características do próprio núcleo, mas também da influência que este sofre por parte de núcleos vizinhos. Estas influências são expressas pelas constantes de acoplamento (J), em Hertz, e dependem de factores como o comprimento das ligações e os ângulos definidos pela orientação das mesmas, e a electronegatividade dos substituintes [134]. Em suma, na análise de um espectro de RMN deve ter-se em consideração os desvios químicos e as constantes de acoplamento entre prótons adjacentes, as quais são responsáveis pelo desdobramento do sinal (*e.g.*, singleto, duplete, tripleto) e determinam a forma do espectro [133-135].

As soluções a analisar foram preparadas em solventes deuterados e obtiveram-se os espectros num espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz. A escolha do solvente é determinante e deve ter em consideração não só a solubilização da amostra mas também a “transparência” na zona de absorção, isto é, o solvente não deve ter núcleos com spin que absorvam na região onde se vai obter o espectro [135]. Não obstante, o aparecimento de sinais correspondentes aos solventes utilizados é bastante usual. Os sinais mais frequentes encontram-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Desvios químicos dos prótons dos principais solventes e impurezas em ^1H RMN em CDCl_3 [adaptado de 136].

Solvente	δ (ppm)
Acetona	2,17
Água	1,56
Ácido propiónico	1,18 (CH_3); 2,42 (CH_2)
Clorofórmio	7,27
Diclorometano	5,30
Dimetilsulfóxido	2,62
Etanol	1,25 (CH_3); 3,72 (CH_2); 1,32 (OH)
Metanol	3,48 (CH_3); 1,09 (OH)
Piridina	7,28 (C_βH_2); 7,69 ($\text{C}_\gamma\text{H}_2$); 8,60 ($\text{C}_\alpha\text{H}_2$)
Tetrahydrofurano	1,85 (CH_2); 3,76 (CH_2O)

A desconvolução do sinal obtido pelo espectrómetro foi efectuada com recurso ao *software* ACD/NMR Processor da ACDLabs versão 12.0, por aplicação da transformada de Fourier, que converte o sinal obtido (intensidade em função do tempo) num espectro de frequência [135].

3.1.3.6. Caracterização fotofísica

O estudo das propriedades fotofísicas das porfirinas é um parâmetro-chave na caracterização de um agente fotossensibilizador, uma vez que estas propriedades podem condicionar a actividade biológica dos fotossensibilizadores e, por conseguinte, a eficácia terapêutica [118].

3.1.3.6.1. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

A fluorescência é um fenómeno de emissão de radiação que resulta da transição do estado singleto excitado de menor energia (S_1) para o estado fundamental (S_0). Por conseguinte, o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) é definido em função da relação entre o número de fotões emitidos e o número de fotões absorvidos [137]. Em termos práticos, um ϕ_F de 0,5 indica que 50% dos fotões absorvidos por um determinado composto decaíram do estado excitado singleto para o estado fundamental com emissão de fluorescência. Este parâmetro pode ser facilmente determinado por comparação com padrões cujo ϕ_F seja conhecido e se encontre definido na literatura [137,138].

Os ϕ_F das porfirinas foram determinados por comparação com o ϕ_F da 5,10,15,20-tetraquis(fenil)porfirina (TPP) em tolueno, já descrito na literatura ($\phi_F=0,11$) [138,139]. Para este efeito, prepararam-se soluções de TPP, 2-TQP e H₂TCP em tolueno e obtiveram-se os espectros de absorção UV/Vis num espectrofotómetro USB4000 da Ocean Optics. Determinou-se o comprimento de onda de intersecção da banda Q_{III} das porfirinas em estudo com a banda Q_{III} da TPP. O comprimento de onda de intersecção foi utilizado como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) para a obtenção dos espectros de fluorescência. Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofluorímetro SPEX Fluorolog 3-22 da Horiba-Jobin-Yvon, após desarejamento das soluções (i.e. eliminação do oxigénio (O₂) por saturação da atmosfera com azoto.

O ϕ_F foi calculado por comparação entre as áreas integradas (S) dos espectros de emissão de fluorescência das porfirinas em estudo (x) com a área da referência (0) (equação 3.4).

$$\phi_F^x = \phi_F^0 (S^x/S^0) \quad (3.4)$$

É fundamental compreender que o somatório dos rendimentos quânticos de todos os processos que envolvem fotões (fluorescência (ϕ_F), fosforescência (ϕ_P), singleto (ϕ_S), tripleto (ϕ_T) e conversão intersistemas (ϕ_{ISC})) é equivalente à unidade (equação 3.5). [140].

$$1 = \phi_F + \phi_P + \phi_S + \phi_T + \phi_{ISC} \quad (3.5)$$

Com base nesta lei fotofísica deduz-se facilmente que a selecção de um determinado composto deve ser efectuada com base nas suas características, as quais devem, por sua vez, ser ajustadas à função pretendida. Efectivamente, enquanto um agente de fotodiagnóstico deve exhibir um elevado ϕ_F que permita a rápida localização da lesão, um agente fotossensibilizador para PDT deve apresentar um ϕ_T elevado que lhe permita exercer o seu efeito fototerapêutico [67].

3.1.3.6.2. Rendimento quântico de oxigénio singleto (ϕ_Δ)

O oxigénio singleto (1O_2) formado após activação do fotossensibilizador é imprescindível para o sucesso do tratamento fotodinâmico (secção 1.2.3.2) [141,142]. No entanto, a acção desta espécie reactiva de oxigénio é condicionada por dois parâmetros fundamentais:

i) Rendimento quântico de oxigénio singleto (ϕ_{Δ})

ii) Tempo de vida do oxigénio singleto (τ_{Δ})

Assim, se por um lado o ϕ_{Δ} é um indicador quantitativo da eficácia que o FS activo apresenta para converter o oxigénio no estado fundamental a oxigénio no estado excitado singleto ^[143,144], o τ_{Δ} é definido como o tempo médio que o oxigénio permanece no estado excitado antes retornar ao estado fundamental e, por conseguinte, o tempo disponível para que este se difunda e interaja com as biomoléculas ^[144,145].

O ϕ_{Δ} foi obtido por medição directa da fosforescência a 1270 nm. Esta medição foi efectuada com um espectrómetro *flash kinetic* LKS.60 (Applied Photophysics Ltd), no qual se inseriu um espelho dieléctrico Melles Griot que reflecte a luz incidente (610–860 nm) e um filtro RG665 da Schott que elimina do sinal infravermelho qualquer contribuição de emissão na gama dos 500 aos 800 nm (1º harmónico). O oxigénio singleto emitido após excitação a 355 nm (3º harmónico) com um laser Nd:YAG (Spectra-Physics Quanta Ray GCR 130) foi detectado por um fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42 arrefecido a 193 K com azoto líquido ^[138].

A fosforescência, obtida a partir de soluções saturadas em oxigénio, só foi medida após o ajuste da concentração das soluções. Este ajuste foi efectuada de modo a que a $A_{355}(\lambda_{exc})$ apresentasse um valor compreendido entre 0,30–0,35, e teve por objectivo prevenir a agregação das porfirinas em solução. Para esta caracterização utilizou-se THF como solvente e 1*H*-fenalen-1-ona, também designada fenalenona ou perinaftenona, como referência. A fenalenona é uma cetona aromática cujo ϕ_{Δ} , em diversos solventes é bastante próximo da unidade ($\phi_{\Delta} = 0,95$) ^[146].

O ϕ_{Δ} das porfirinas foi determinado por comparação entre os declives (S) obtidos pela intensidade de emissão de ¹O₂ em função das diferentes intensidades do laser, para as porfirinas em estudo (x) em relação à referência (0) (equação 3.6) ^[139].

$$\phi_{\Delta}^x = \phi_{\Delta}^0 (S^x/S^0) \quad (3.6)$$

3.2. CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de células^{a,b} teve origem no início do século XX e compreende um conjunto de técnicas que permitem cultivar e manter células isoladas fora do organismo de origem. Esta técnica proporciona modelos de excelência para a avaliação do comportamento fisiológico e bioquímico (*e.g.*, estudos metabólicos) e para o estudo do efeito de fármacos ou compostos tóxicos nos processos de mutagênese ou carcinogênese. Esta metodologia é uma ferramenta imprescindível que permitiu reduzir a utilização de modelos animais e, por conseguinte, os custos associados à investigação. Contudo, é essencial garantir a assepsia da cultura de modo a minimizar a ocorrência de contaminações, quer por bactérias, fungos, micoplasmas, quer por outras linhas celulares^[147,148]. O manuseamento da cultura deve realizar-se em condições assépticas, e o seu crescimento num ambiente estéril e estritamente controlado, a 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5% (v/v) de CO₂.

3.2.1. Reagentes, materiais e equipamentos utilizados na cultura de células.

A manutenção da cultura e a realização dos ensaios de cito e fototoxicidade requereram a utilização de materiais, reagentes e equipamentos especialmente desenvolvidos para este fim, cujas especificações se encontram descritas nas Tabelas 3.7 a 3.3, respectivamente.

Tabela 3.7. Características dos materiais utilizados na cultura celular e ensaios de cito e fototoxicidade.

MATERIAL	MARCA	REFERÊNCIA	FABRICANTE, MORADA
Caixas de teste com 6 poços	Orange Scientific	5530500	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica
Caixas de teste com 12 poços		5530400	
Caixas de teste com 24 poços		5530300	
Caixas de teste com 48 poços	Costar	CLS3548	Corning Costar Corp. Cambridge, USA
Filtro RG 610	Schott	1672386	Schott Glass Technologies, Nova Iorque, USA
Filtro OG 570		1368448	
Frasco de cultura com 25 cm ²	Orange Scientific	5520100	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica
Frasco de cultura com 75 cm ²		5520200	
Hemocitómetro	Boeco	-	Boeco, Hamburgo, Alemanha
Lâmpada Xenophot 24 V, 150 W	Osram	HLX-64640	Osram AG. Munique, Alemanha
Membrana acetato celulose 30 mm, poro de 0,22 µm	Orange Scientific	1520012	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica
Micropipetas (20, 200 e 1000 µL)	Eppendorf	-	Eppendorf, Hamburgo, Alemanha
Pipetas de Pasteur	Hilgenberg	3150102	Hilgenberg, Malsfeld, Alemanha
Pipetas serológicas 2 mL	Frilabo	6500201018	Frilabo, Maia, Portugal
Pipetas serológicas 5 mL		6500501018	
Pipetas serológicas 25 mL		6502501018	
Pontas 2-20 µL	Sarstedt	70.760.002	Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha
Pontas 100-1000 µL	Sarstedt	70.762	Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha
Pontas 0,1-20 µL	Gilson	F161450	Gilson Inc, Middleton, USA
Seringa estéril (20 mL)	BD Plastipak	300613	Becton, Dickinson Company, Nova Jérсия, USA
Recipiente para congelação de células	Nalgene	51000001	Nalgene, Nova Iorque USA
Tubo de centrífuga 1,5 mL	Bioplastics	B77502	Bioplastics, Landgraaf, Holanda
Tubos de centrífuga 15 mL	Orange Scientific	5540350	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica
Tubos de centrífuga 50 mL		5540150	
Tubos de congelação	Corning	430487	Corning Inc, Nova Iorque, USA

^a *Cell Culture Basics*, Handbook disponibilizado pela Invitrogen em: www.invitrogen.com/cellculturebasics

^b *Fundamental Techniques in Cell Culture*, Handbook disponibilizado pela Sigma/ECACC em: <http://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook-2nd-edition.html>

Tabela 3.8. Características dos reagentes utilizados na cultura celular e ensaios de cito e fototoxicidade.

REAGENTE	MARCA	REFERÊNCIA	FABRICANTE
Azul de tripano 0,4%	Sigma	T8154	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Bicarbonato de sódio ≥ 99,5%	Sigma	S5761	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Cloreto de potássio ≥ 99%	Sigma	P5405	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Cloreto de sódio ≥ 99,5%	Sigma	S9625	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
D-glucose ≥ 99,5%	Sigma	G8270	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
DMSO ≥ 99,9%	Sigma	D8418	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
EDTA > 99 %	Sigma	E5134	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Fosfato de potássio monobásico > 99 %	Sigma	P5379	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Fosfato de sódio dibásico > 99%	Sigma	S0876	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Hidróxido de sódio ≥ 98%	Sigma	S8045	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Meio de cultura RPMI 1640	Sigma	R6504	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
MTT 98%	Sigma	M2128	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA
Soro fetal bovino (FBS)	Gibco	10270-106	Invitrogen, Madrid, Espanha
Tripsina	Sigma	T4549	Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, USA

Tabela 3.9. Características dos equipamentos utilizados na cultura celular e ensaios de cito e fototoxicidade.

EQUIPAMENTO	MODELO	FABRICANTE
Balança analítica	ALC 201.4	Acculab, Nova Iorque, USA
Câmara de fluxo laminar	Biowizard	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finlândia
Câmara digital para microscópio	DP20-5E	Olympus, Tóquio, Japão
Centrifuga	MPW-350R	MPW – Med Instruments, Warsaw, Polónia
Contentor para criopreservação de células	B2048	Crio Diffusion, Lery, França
Incubadora de CO ₂	COM-19AIC (UV)	Sanyo Electric Co, Ltd, Gunma, Japão
Leitor de microplacas		BioTeck Instruments INC, Winnoski, USA
Medidor de pH	HI 110	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Microscópio invertido com contraste de fase	CKX41SF	Olympus, Tóquio, Japão
Pipetador automático	Pipetboy Comfort	Integra Biosciences (IBS), Zezers, Suíça
Projector de slides	Reflecta Diamator	AGFA CS, Portugal
Power meter	212	Coherent Inc, Santa Clara, USA
Sistema de vácuo	1426 GelMaster TM	Welch Rietschle Thomas, Niles, USA
Sistema de purificação de água	Simplicity TM	Millipore SA, Saint Quentin Yvelines, França
Vortex	50200	Labnet, Nova Jersey, USA

3.2.2. Linha celular

A linha celular foi seleccionada com base nos objectivos previamente definidos para esta dissertação. Assim, como este trabalho tinha por objectivo a síntese e caracterização de porfirinas e avaliação do seu potencial como agente fotossensibilizador em PDT, a escolha de uma linha celular cancerígena é bastante óbvia. Adicionalmente, como o cancro colorectal é um dos principais tipos de cancro e o terceiro maior causador das mortes registadas anualmente, facto associado à metastização precoce e à elevada taxa de resistência à quimio e radioterapia, seria particularmente interessante avaliar a influência destes compostos e da PDT, numa linha celular derivada de um adenocarcinoma colorectal^[149].

3.2.2.1. Linha celular HT29

A linha celular HT29 (ATCC® HTB38™)^a (Figura 3.18), estabelecida em 1964 por J. Fogh e G. Trempe, deriva de um adenocarcinoma colorectal de uma mulher caucasiana adulta^[150-152]. Esta linha celular epitelial é aneuplóide e reteve algumas características do epitélio intestinal normal, nomeadamente a polaridade e os receptores hormonais^[153,154].

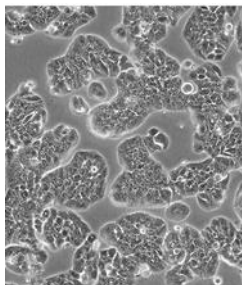


Figura 3.18. Fotografia das células HT29 obtida ao microscópio óptico com ampliação 100x.

O meio de cultura recomendado pelo fornecedor para a subcultura desta linha celular é o McCoy's 5A, descrito por McCoy em 1959, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS)^[155]. No entanto, neste trabalho experimental todas as subculturas foram preparadas com o meio RPMI 1640, que corresponde a uma modificação do meio McCoy's 5A^[155]. O protocolo adoptado para a subcultura desta linha celular encontra-se descrito pelo ATCC (*American Type Cell Collection*), um banco de cultura de células onde esta linha pode ser adquirida, e está especificado na secção 3.2.6.

3.2.3. Composição das soluções utilizadas

Todas as experiências envolvendo manipulação de células requereram a preparação e utilização de soluções adequadas. A composição das soluções utilizadas, quer na manutenção da cultura (secção 3.2.3.1), quer nos ensaios de cito e fototoxicidade (secção 3.2.3.2), encontra-se abaixo descrita. Todas as soluções foram previamente esterilizadas por autoclavagem a 121 °C, à excepção do meio de cultura, das soluções de porfirina e da solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que foram esterilizadas por filtração com filtros de porosidade 0,22 µm.

3.2.3.1. Soluções usadas na cultura de células HT29

- **Solução tamponizada com fosfato (PBS) 10x**^[147]
 - 1370 mM NaCl
 - 14,7 mM KH₂PO₄
 - 81,0 mM Na₂HPO₄
 - 26,8 mM KCl

Ajustou-se o pH a 7,4 com NaOH 1 M ou HCl 1 M. A solução de PBS 1x foi preparada por diluição da solução PBS 10x com água ultra-pura.

^a Especificações da linha celular HT29 disponibilizadas pela ATCC em: <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-38>

▪ **Solução de tripsina-EDTA**

- 10 mL de tripsina (tripsina 2,5% (m/m), em 0,9% (m/v) de NaCl)
- 9 mL de PBS 10×
- 81 mL de água ultra-pura
- 20 mg de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), sal dissódico dihidratado

▪ **Meio de cultura RPMI 1640**

O meio de cultura RPMI 1640 foi desenvolvido, em 1967, por G. Moore e colaboradores, no Roswell Park Memorial Institute ^[155].

Este meio foi adquirido na forma de pó liofilizado, e a respectiva solução foi preparada de acordo com as indicações do fornecedor^a. De forma sumária, dissolveu-se o conteúdo de uma embalagem em aproximadamente 900 mL de água ultra-pura. Para facilitar a solubilização do pó na água, ajustou-se o pH a 4 pela adição de HCl 1 M. Após a completa dissolução, elevou-se o pH a 7,2 com NaOH 1 M e adicionaram-se 2,0 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). O pH foi novamente ajustado, 0,1 a 0,3 unidades abaixo do valor de pH fisiológico (7,4), e fez-se o volume final com água ultra-pura. O ajuste do pH abaixo do pH fisiológico deve-se ao ligeiro aumento do seu valor que ocorre durante a filtração.

O meio foi posteriormente esterilizado por filtração, numa câmara de fluxo laminar e com recurso a uma unidade de filtração previamente esterilizada por autoclavagem. Após a filtração suplementou-se o meio com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), previamente inativado num banho termostático a 56 °C durante 30 minutos, e conservou-se a solução no frigorífico a 4 °C.

O soro é uma mistura extremamente complexa que fornece uma enorme variedade de substâncias, entre as quais factores de crescimento que estimulam a proliferação de células em cultura. Por outro lado, o soro poderá também conter certos vírus prejudiciais ao crescimento, mas facilmente inactivadas termicamente ^[147,148,156].

3.2.3.2. Soluções usadas nos ensaios de cito e fototoxicidade

▪ **Solução de TCPP em DMSO a 4 mg/mL**

- 8 mg de porfirina TCPP
- 8 mL de DMSO

A solução de TCPP 1 mg/mL foi preparada por diluição da solução 4 mg/mL, em DMSO.

▪ **Solução de 2-TQP em DMSO a 1 mg/mL**

- 10 mg de porfirina 2-TQP
- 10 mL de DMSO

As soluções de porfirina foram esterilizadas por filtração, com um filtro de porosidade 0,22 µm, e mantidas no escuro para evitar a sua foto-degradação. Previamente à adição nas culturas efectuava-se a homogeneização das soluções no vortex.

^a Bula informativa do meio de cultura RPMI 1640, R6504, Sigma-Aldrich Inc.

▪ **Solução de PBS 1× com 10 mM de D-glucose**

- 50 mL de PBS 10x
- 450 mL de água ultra-pura
- 1 g de D-(+)-glucose

A solução foi esterilizada por filtração e não por autoclavagem, de modo a evitar a caramelização da glucose^[147].

▪ **Solução de MTT a 5 mg/mL**

- 10 mL de PBS 10x
- 90 mL de água ultra-pura
- 500 mg de MTT

A solução foi esterilizada por filtração, dividida em alíquotas e conservada a -20 °C no escuro, para minimizar a redução do MTT.

3.2.4. Armazenamento de células: criopreservação

A criopreservação é uma estratégia de armazenamento que minimiza a ocorrência de alterações genéticas (*e.g.*, instabilidade genómica, senescência, entre outras) e contaminações por microorganismos, ao mesmo tempo que proporciona a criação de uma reserva de células, com um número reduzido de passagens, para uso posterior. A realização deste processo requer a utilização de um agente crio-protector (*e.g.*, DMSO ou glicerol) que minimize a formação de cristais de gelo e a consequente desidratação, desnaturação de proteínas e fragmentação membranar responsáveis pela morte celular. O DMSO, crio-protector mais usual, permeabiliza eficazmente as membranas celulares e promove a redução do teor de água e da formação de cristais de gelo. Contudo, o DMSO é citotóxico e, por isso, a sua concentração deve ser tão baixa quanto possível^[147,156,157,163].

3.2.4.1. Criopreservação de células HT29

Depois de tripsinizadas (secção 3.2.6), as células HT29 foram ressuspensas em meio de cultura e centrifugadas, durante 5 minutos, a 1100 rpm. Após a remoção do sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento celular numa solução de congelamento constituída por meio de cultura e 10% de DMSO. A densidade final em cada criotubo foi de 4×10^6 células por mL de suspensão. Após a adição de 1 mL de suspensão a cada crio-tubo, estes foram colocados num recipiente de congelação com isopropanol, um solvente que permite o arrefecimento gradual a uma velocidade de 1 °C/min) até - 80 °C. Este procedimento permite minimizar a formação de cristais de gelo que possam danificar a célula e provocar a sua morte^a. Os tubos foram mantidos por um período mínimo de 5 h a -80 °C e só depois foram transferidos para um contentor de azoto líquido a - 196 °C (Figura 3.19).

^a http://www.atcc.org/~media/PDFs/Cryopreservation_Technical_Manual.ashx (acedido a 23 de Dezembro de 2012)



Figura 3.19. Criopreservação de células. (a) Após a preparação da suspensão celular com a densidade desejada, colocam-se os crio-tubos num recipiente de congelação com isopropanol. Após 5 h a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, transferem-se os crio-tubos para (b) uma caixa de preservação que é posteriormente introduzida (c) num contentor de azoto líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Iniciação da cultura

Sempre que necessário, procedeu-se ao descongelamento de uma alíquota de células crio-preservadas (4×10^6 células) e à transferência do seu conteúdo para um frasco de 75 cm^2 com 14 mL de meio de cultura. As células foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, numa atmosfera humidificada e com 5% (v/v) de CO_2 . Após 24 h, efectuou-se a substituição do meio de cultura de modo a remover as células mortas e o DMSO usado como crio-protector.

3.2.6. Manutenção da cultura

As células HT29 foram cultivadas com uma densidade inicial de $20000\text{ células/cm}^2$, em frascos de 25 ou 75 cm^2 , e mantidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ numa atmosfera humidificada e com 5% de CO_2 (v/v).

O protocolo adoptado consistiu na remoção do meio de cultura antigo, lavagem da superfície de crescimento com PBS 1x (5–8 mL), e adição da solução gelada de tripsina (1–2 mL). A tripsina é uma protease que possibilita a individualização de células adjacentes ao promover a digestão das proteínas intercelulares e das proteínas que estabelecem a ligação das células ao fundo do frasco. No entanto, é fundamental ter em consideração que a exposição prolongada a esta protease resulta na disrupção da integridade estrutural e na morte da célula. Deste modo, alguns segundos após a sua adição, removeu-se a solução de tripsina e colocaram-se as células na incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima da enzima, até que estas adquirissem uma forma esférica (5 a 10 minutos). De seguida, ressuspenderam-se as células num volume de meio adequado à confluência da cultura, recolheu-se um pequeno volume da suspensão para efectuar a contagem do número de células ao microscópio óptico (secção 3.2.7) e determinou-se o volume de suspensão e de meio de cultura necessários à preparação de uma nova cultura (Figura 3.20).

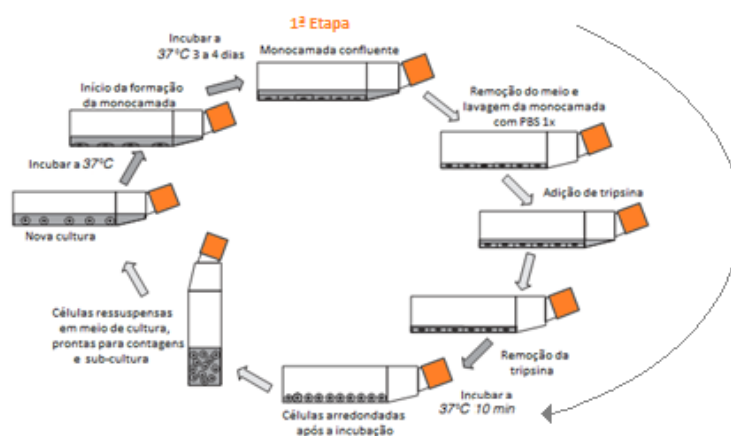


Figura 3.20. Representação esquemática das várias etapas envolvidas na subcultura e crescimento das células HT29 [adaptado de 147].

3.2.7. Método de exclusão do azul de tripano ^a

O azul de tripano (Figura 3.21) é um corante que apresenta na sua estrutura um cromóforo ácido di-azo, negativamente carregado ^[158].

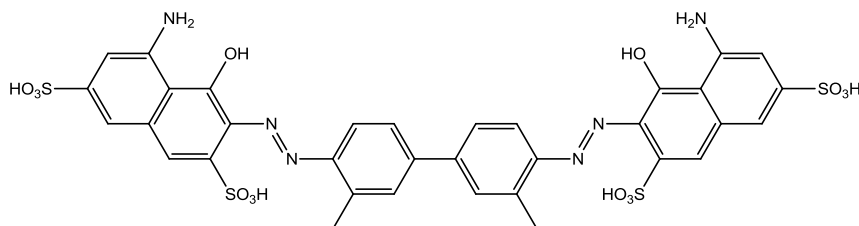


Figura 3.21. Representação da estrutura do azul de tripano.

Este corante, usualmente utilizado na contagem de células em cultura, permite determinar se as células se encontram vivas ou mortas com base na integridade das membranas e na interacção que este estabelece com as mesmas. Assim, enquanto o corante é excluído por células viáveis cujas membranas se encontrem intactas (incolor), por outro lado é rapidamente absorvido por células inviáveis cujas membranas se encontrem danificadas (azul) ^[155,158-160].

Apesar de bastante utilizado, este método está sujeito não só à subjectividade do operador mas também a algumas ambiguidades. Assim, enquanto alguns investigadores defendem que este método subestima o número de células mortas, principalmente à medida que a cultura envelhece ^[161], outros defendem que este sobrestima o número de células mortas, uma vez que o facto de a célula adquirir a coloração azul nem sempre é indicativo de morte celular, mas sim de uma maior permeabilidade membranar ou da presença de poros na membrana que permitem a difusão do azul de tripano ^[158].

Nesta dissertação, as contagens de células foram efectuadas não só para a preparação de novas culturas, um processo que requer a determinação do número de células por mililitro de suspensão (equação 3.7), mas também para avaliar o efeito de diferentes percentagens de DMSO na viabilidade celular (secção 3.2.9.1) (equação 3.8) ^[160].

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{Média do número de células} \times \text{factor de diluição}}{10^{-4}} \quad (3.7)$$

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de células após exposição ao DMSO}}{\text{Número de células no controlo}} \times 100 \quad (3.8)$$

A contagem do número de células foi efectuada após tripsinização e ressuspensão das células em meio de cultura fresco. As amostras para contagem foram preparadas por adição de 20 μL da suspensão a igual volume da solução azul de tripano a 0,4% (m/v). No entanto, estes volumes foram ajustados sempre que necessário para facilitar a realização das contagens. A solução foi transferida para um hemocitómetro e efectuou-se a contagem com recurso a um microscópio óptico. Realizaram-se duas contagens independentes, considerando-se a média de ambas. Sempre que estas diferissem entre si mais de 10%, era efectuada uma nova contagem.

^a Bula informativa do azul de tripano, T8154, Sigma-Aldrich Inc.

3.2.8. Estudos de solubilidade

A aplicabilidade das porfirinas sintetizadas como possíveis agentes fotossensibilizadores (FS) em PDT depende da solubilidade que estas apresentam no meio de cultura e no veículo de adição às culturas celulares. Na verdade, a grande maioria destes compostos apresenta um carácter hidrofóbico que dificulta a sua dissolução em solventes aquosos (*e.g.*, PBS e meio de cultura) e torna a sua aplicação dependente de um veículo de transporte que permita a “chegada” às células-alvo. A encapsulação em lipossomas ou em nanopartículas, assim como a pré-complexação com lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) ou anticorpos, são estratégias que implicam custos elevados^[162]. Nesta dissertação, o DMSO foi o veículo de adição seleccionado. O DMSO constitui uma estratégia viável, que alia a simplicidade a custos de utilização insignificantes quando comparados com os custos associados às estratégias supramencionadas.

3.2.8.1. Solubilidade do DMSO no meio de cultura RPMI 1640

Apesar do conhecimento prévio da hidrossolubilidade do DMSO, procedeu-se à avaliação da sua solubilidade no meio de cultura adoptado. Este estudo foi efectuado pela adição de 500 µL de meio de cultura a igual volume de DMSO, e homogeneização no vortex.

3.2.8.2. Solubilidade das soluções de porfirina no meio de cultura RPMI 1640

Após a preparação de soluções de porfirina em DMSO averiguou-se a solubilidade que estas soluções apresentam no meio de cultura. Esta análise foi efectuada por adição de 2,5 µL da solução de porfirina a 500 µL de meio de cultura, e homogeneização no vortex.

3.2.8.3. Solubilidade do DCM no meio de cultura RPMI 1640

Na sequência de alguns problemas na solubilização da porfirina 2-TQP em DMSO, supôs-se que a sua dissolução em DCM, solvente utilizado no processo de purificação, poderia constituir alternativa viável. Porém, este solvente é tóxico e potencialmente carcinogénico^a.

A solubilidade do DCM no meio de cultura foi determinada por adição de 500 µL de meio a igual volume de DCM, e homogeneização no vortex

3.2.9. Estudos de citotoxicidade

Como um dos requisitos para a utilização de um composto orgânico em PDT é a inocuidade do FS na ausência de luz^[93], a determinação do efeito da porfirina *per se* é fundamental. Em adição, o DMSO utilizado como veículo de adição às culturas celulares é citotóxico e, desse modo, foi imprescindível determinar a concentração máxima permitida pela cultura celular^[163].

A citotoxicidade do DMSO e das porfirinas foi avaliada pelo método do MTT (brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (3.2.10). A citotoxicidade do DMSO foi também avaliada pelo método do azul de tripano (3.2.7). Em ambos os métodos, os compostos foram adicionados 24 h após a preparação das culturas de modo a permitir a adesão celular e a formação da monocamada.

^a Bula informativa do diclorometano, 270997, Sigma-Aldrich Inc.

3.2.9.1. Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo método do azul de tripano

Para a determinação do efeito do DMSO pelo método do azul de tripano prepararam-se culturas de células HT29, em placas de 6 poços, com uma densidade inicial de 30000 células/cm² em 2 mL de meio. O DMSO foi adicionado 24 h após a preparação das culturas, as quais foram posteriormente incubadas a 37 °C por um período de 48 h. Passadas as 48 h removeu-se o meio de cultura antigo, lavou-se a monocamada com PBS 1x e adicionaram-se 300 µL da solução de tripsina-EDTA. Após actuar, diluiu-se a tripsina em 1 mL de meio de cultura e efectuou-se a ressuspensão das células. A suspensão obtida foi transferida para um tubo de centrifuga de 2 mL, colocado em gelo durante o período em que se efectuaram as contagens (secção 3.2.7). Em cada experiência efectuou-se também uma condição controlo (sem adição de DMSO), que funcionou como termo de comparação na determinação da viabilidade celular (equação 3.8).

Realizaram-se 4 experiências independentes, nas quais todas as condições em estudo foram analisadas em triplicado.

3.2.9.2. Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo método do MTT

Para avaliar a citotoxicidade do DMSO pelo método do MTT (secção 3.2.10) prepararam-se culturas celulares, em placas de 12 poços, com uma densidade inicial de 30000 células/cm² em 2 mL de meio. Passadas 24 h adicionou-se o DMSO e incubaram-se as culturas durante 48 h. Após este período adicionaram-se 200 µL da solução de MTT e efectuou-se uma nova incubação de 4 h no escuro. De seguida, removeu-se a solução de MTT, dissolveram-se os cristais de formazano em 350 µL de DMSO, e efectuou-se a leitura das absorvâncias a 570 e 690 nm, num leitor de microplacas da BioTeck.

Realizaram-se 7 experiências independentes, e todas as condições foram avaliadas em triplicado.

3.2.9.3. Avaliação da citotoxicidade do DCM pelo método do MTT

Para determinar a citotoxicidade do DCM prepararam-se culturas de células HT29, em placas de 24 poços, com uma densidade inicial de 30000 células/cm² em 1 mL de meio. O DCM foi adicionado 24 h após a preparação das culturas, as quais foram incubadas por um período de 48 h a 37 °C. Após este período adicionaram-se 150 µL da solução de MTT e efectuou-se uma nova incubação de 4 h no escuro. Por fim, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazano dissolvidos em 300 µL de DMSO. A leitura das absorvâncias a 570 e 690 nm foi efectuada num leitor de microplacas da BioTeck.

Foram realizadas 3 experiências independentes, e todas as condições em análise foram efectuadas em quadruplicado.

3.2.9.4. Avaliação da citotoxicidade induzida pelas porfirinas 2-TQP e TCPP

Para determinar o efeito citotóxico das porfirinas, prepararam-se culturas de células, em placas de 24 poços, com uma densidade inicial de 30000 células/cm² em 1 mL de meio. Decorridas 24 h, adicionaram-se diferentes volumes das soluções de porfirina, de modo a obter as concentrações finais desejadas e uma percentagem de DMSO igual a 0,5% (v/v). As culturas foram novamente incubadas a 37 °C e, após 48 h, adicionaram-se 150 µL da solução de MTT. Seguiu-se uma nova incubação de 4 h no escuro, após a qual se removeu a solução de MTT. Os cristais de formazano foram dissolvidos em 300 µL de DMSO e efectuou-se a leitura das absorvâncias a 570 e 690 nm com recurso a um leitor de microplacas. Todas as condições em estudo foram analisadas em quadruplicado.

3.2.10. Método do MTT

O MTT^a é um sal monotetrazóico hidrossolúvel e de coloração amarela [164,165]. O método colorimétrico do MTT, descrito em 1983 por Tim Mosmann [166], baseia-se na capacidade que as desidrogenases das células metabolicamente activas, nomeadamente o NADH, apresentam para reduzir o MTT, e conduzir à clivagem do seu anel tetrazólio e à formação de formazano (Figura 3.22). O formazano, de cor arroxeadada, é insolúvel em soluções aquosas, mas facilmente solubilizados por solventes orgânicos como o DMSO ou uma mistura de isopropanol com HCl. A concentração de formazano na solução obtida após a dissolução dos cristais pode ser determinada espectrofotometricamente. A absorvância medida é directamente proporcional ao número de células viáveis [166-173].

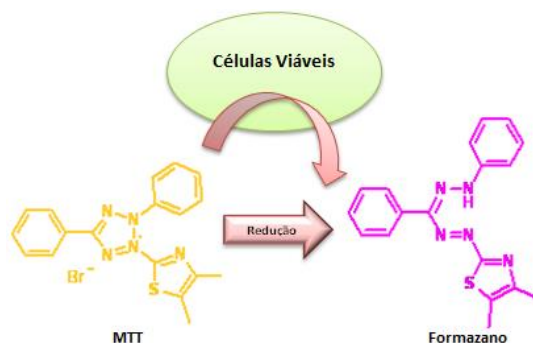


Figura 3.22. Representação da redução do MTT a formazano pelas células metabolicamente activas.

Este método espectrofotométrico permite uma avaliação barata, simples, rápida e precisa da taxa de proliferação e viabilidade celular, com base no estado funcional das células. No entanto, o estado fisiológico ou a ocorrência de variações na actividade das flavoenzimas, derivadas, por exemplo, do uso de compostos que afectem a sua actividade, podem interferir com os resultados e constituir uma limitação do método [166, 174,174,175].

Apesar de amplamente utilizado, os mecanismos envolvidos na internalização e redução do MTT, não estão ainda completamente elucidados [164,176]. Em 1963 Slater levou a cabo uns estudos sobre a clivagem do sal tetrazólio, na presença de succinato, em mitocôndrias activas de células de fígado de rato, que permitiram demonstrar o envolvimento da mitocôndria no processo de redução [177]. Existem também fortes evidências (*e.g.*, marcação com sondas fluorescentes ou medição do potencial mitocondrial) que apoiam a ocorrência da redução não-mitocondrial do MTT, nomeadamente ao nível do retículo endoplasmático, citosol e vesículas perinucleares (*e.g.*, endossomas e lisossomas) por acção de desidrogenases [164,165,176,178]. De igual modo, também a localização subcelular do MTT é um assunto controverso. De facto, enquanto alguns investigadores defendem que o MTT não permeia as membranas lipídicas e é internalizado por endocitose [164], nos últimos anos surgiram evidências que indicam que a internalização do MTT é favorecida pela sua carga positiva e pelo potencial de membrana [179]. Com efeito, nos seus estudos Liu [164] utilizou lipossomas unilamelares que não apresentam potencial de membrana e que, por isso, não podem ser equiparados com as membranas celulares [179].

Independentemente de todas as controvérsias, o pressuposto deste método permanece inalterável [164].

^a Bula informativa do MTT, M2128 Sigma-Aldrich Inc.

3.2.11. Estudos de fototoxicidade

Para determinar a fototoxicidade das porfirinas, prepararam-se culturas de células HT29, em placas de 48 poços, com uma densidade inicial de 30000 células/cm² em 500 µL de meio. Passadas 24 h, adicionaram-se as soluções de porfirina e incubaram-se novamente as culturas por um período de 24 h, ao qual se seguiu a irradiação. A irradiação das culturas foi efectuada com um projector de slides Reflecta Diamator (AGFA), equipado com uma lâmpada de halogéneo de 24 V 150 W, (Xenophot HLX 64640, Osram) e um filtro de radiação OG₅₇₀ da Schott. Este filtro impede a passagem de radiação com comprimento de onda inferior a 570 nm. O calor resultante do processo de irradiação foi absorvido por um filtro de água (água colocada numa caixa de cultura de 150 cm² entre o foco de luz e as culturas celulares) (Figura 3.23a). Esta montagem experimental, descrita por Alvarez *et al.* ^[180], já tinha sido adoptada no nosso grupo de investigação para a realização de trabalhos semelhantes. O fluxo da luz foi determinado com um *power meter* modelo 212 da Coherent (Figura 3.23b).

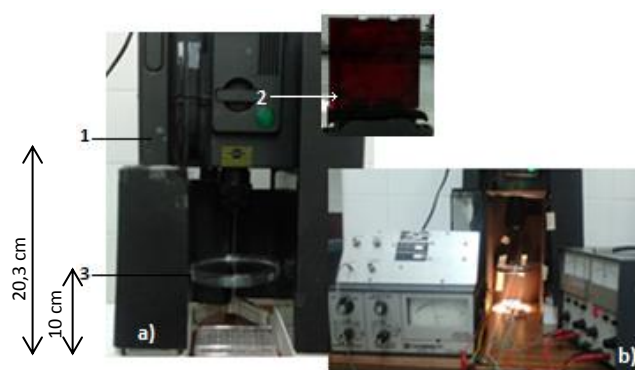


Figura 3.23. Montagem experimental utilizada na irradiação das culturas celulares após tratamento com as porfirinas (a). Power meter utilizado na medição do fluxo de luz incidente nas caixas de teste (b). (1) Projector de slides equipado com uma lâmpada de halogéneo de 24 V 150 W e um filtro de radiação OG₅₇₀ (2). Filtro de água (3).

Antes de irradiar as culturas, aspirou-se o meio de cultura contendo a porfirina, lavou-se a monocamada com PBS 1x e adicionaram-se 500 µL da solução de PBS suplementada com 10 mM de D-glucose. Após a irradiação, com uma duração de 15 ou 30 minutos, removeu-se a solução de PBS, adicionaram-se 500 µL de meio de cultura fresco sem porfirina e incubaram-se novamente as culturas. Em cada experiência independente preparou-se sempre, para além da cultura controlo tratada apenas com o veículo de adição, uma segunda cultura controlo. Esta cultura foi sujeita ao mesmo tratamento que as restantes culturas, mas não foi irradiada, tendo permanecido no escuro (envolvida em papel de alumínio) durante o período de irradiação. Após uma incubação de 24 h, determinou-se a viabilidade celular pelo método do MTT (3.2.6), adicionando-se 100 µL da solução de MTT a cada poço. Após uma re-incubação de 4 h, removeu-se a solução de MTT, dissolveram-se os cristais de formazano em 200 µL de DMSO e efectuou-se a leitura das absorvâncias.

A fototoxicidade foi expressa como a percentagem de células viáveis nas culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico em relação às culturas tratadas apenas com o veículo de administração dos sensibilizadores.

3.2.12. Análise estatística

A análise dos dados foi efectuada com recurso ao *software* GraphPad Prism versão 6.0. (GraphPad Software, Inc.). Valores “aberrantes” (outliers) foram removidos por aplicação do teste de Grubbs disponível gratuitamente no endereço GraphPad.com/QuickCalcs. Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

A variância entre as diferentes condições experimentais foi determinada pelo método ANOVA (*one-way* ou *two-way*, dependendo do número de variáveis em estudo) e posterior aplicação do teste de Dunnett’s para comparação de múltiplas. Este teste compara cada média obtida com a média do grupo controlo. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Resultados e Discussão

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PORFIRINAS

4.1.1. 5,10,15,20-tetraquis(cinamil)porfirina

O cinamaldeído, principal componente do extracto da casca da canela, é um aldeído aromático α , β insaturado, de peso molecular $132,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [181,182]. Este composto, que nos últimos anos foi alvo de diversos estudos e tem sido amplamente utilizado na medicina popular oriental, apresenta funções biológicas essenciais à homeostase do organismo, nomeadamente como antioxidante, antibacteriano, anti-inflamatório, antidiabético e anticancerígeno [182-186]. O efeito anticancerígeno do cinamaldeído está dependente da produção de espécies reactivas de oxigénio, responsáveis pelo aumento da permeabilidade mitocondrial e pela consequente libertação do citocromo c para o citosol. Estes eventos culminam na clivagem e activação de caspases, que desencadeiam a morte celular por apoptose [182,183,185,187,188]. O cinamaldeído apresenta ainda a capacidade de promover a paragem do ciclo celular no ponto de controlo G2/M evitando a proliferação de células geneticamente danificadas [189].

Não obstante os mecanismos subjacentes à actividade farmacológica deste aldeído não se encontrarem ainda completamente esclarecidos [184], a conjugação das propriedades do cinamaldeído com as propriedades das porfirinas para a formação da correspondente *meso*-tetracinamil porfirina, poderá representar uma estratégia de grande interesse para potenciar a morte das células cancerígenas após o tratamento fotodinâmico.

A síntese da H₂TCP, descrita pela primeira vez em 2010 por Zakavi [120] era, desde 2008, um tema de interesse para o nosso grupo de investigação.

4.1.1.1. Síntese da H₂TCP pelo método de Adler-Longo

Ao efectuar a síntese da H₂TCP pelo método de Adler e Longo, como descrito em 3.1.2.1 estratégia 1, deparei-me com diversas dificuldades no processo de purificação. Na descrição experimental foram intencionalmente omitidas as diversas tentativas de purificação desta porfirina por cromatografia em coluna de sílica de grão fino (40–63 µm). Usou-se uma mistura de DCM e etanol (8:2) como eluente, e monitorizaram-se as eluições por tlc (presença de uma mancha vermelha quando se incide luz UV a 365 nm) e por espectroscopia de UV/Vis (presença da banda Soret). Contudo, a presença de outras manchas fluorescentes no tlc indica que este procedimento não permitiu isolar eficazmente a porfirina dos restantes subprodutos. Deste modo, considerou-se a possibilidade de efectuar uma extracção de Soxhlet, usando metanol como solvente extractor. Para o efeito, a solubilidade da porfirina em metanol foi previamente avaliada: num copo com metanol colocou-se uma pequena fracção da porfirina sólida e, passados alguns minutos efectuou-se um tlc do metanol e do sólido dissolvido em DCM (Figura 4.1a). Efectuou-se também um espectro de UV/Vis do metanol (Figura 4.1b).

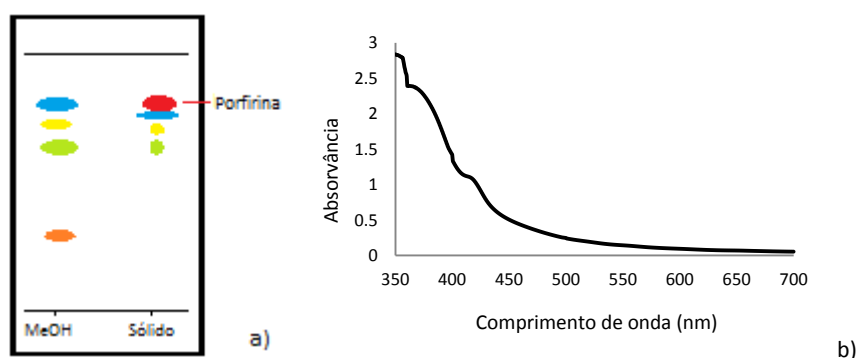


Figura 4.1. (a) Representação esquemática do tlc (DCM) efectuado ao sólido dissolvido em DCM e ao metanol usado como solvente. (b) Espectro UV/Vis do metanol que esteve em contacto com o sólido.

A insolubilidade da porfirina em metanol foi confirmada pela ausência da mancha avermelhada e da banda Soret características das porfirinas na fracção correspondente ao metanol. Adicionalmente, esta fracção apresentava uma grande diversidade de manchas fluorescentes provenientes de eventuais subprodutos reaccionais, o que sugere que este solvente poderá permitir a extracção desses componentes (solúveis em metanol), e dessa forma propiciar a purificação da porfirina.

Após várias horas de extracção, a presença da porfirina na fracção sólida foi confirmada por tlc. Ao comparar o tlc referente à fracção sólida, efectuado antes e após a extracção de Soxhlet, verificou-se que este procedimento permitiu a remoção de uma grande quantidade de produtos reaccionais secundários. Posteriormente, o sólido presente no cartucho de extracção foi dissolvido em DCM e purificado por cromatografia em coluna de sílica de grão fino, usando uma mistura de DCM e etanol 9:1 como eluente. No entanto, a monitorização das eluições por tlc demonstrou que esta estratégia não estava a permitir isolar eficazmente a porfirina dos restantes subprodutos. Por conseguinte, recorreu-se à cromatografia em camada fina preparativa, usando DCM como eluente. Esta técnica permitiu isolar a porfirina dos restantes subprodutos, como se confirma pelo espectro de UV-vis obtido, característico das porfirinas, e pela presença de uma única mancha de cor avermelhada no tlc (R_f (DCM) = 0,86).

Obtiveram-se 92 mg ($\eta=1,3\%$) de porfirina pura na forma de um material de cor avermelhada e cuja caracterização é descrita nas subsecções seguintes.

4.1.1.1.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis

O espectro de absorção UV/Vis da H₂TCP foi obtido em DCM e encontra-se representado na Figura 4.2.

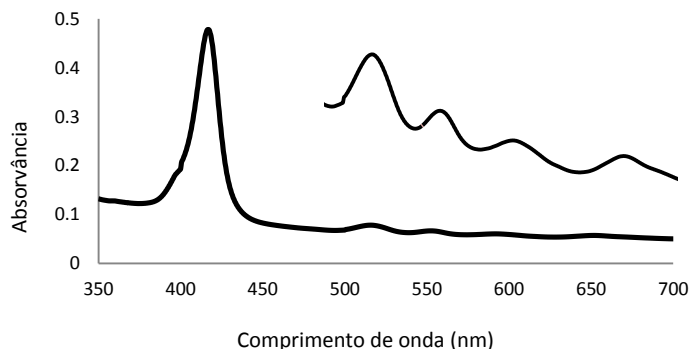


Figura 4.2. Espectro de absorção UV/Vis da H₂TCP em DCM, obtido após purificação por cromatografia em placa preparativa.

A H₂TCP apresenta um espectro de absorção típico de uma porfirina na forma de base livre, caracterizado por uma banda Soret de grande intensidade, e quatro bandas Q de menor intensidade. A análise detalhada do espectro permite concluir que a H₂TCP apresenta um espectro do tipo *etio*, no qual a banda Soret se localiza a 417 nm e as bandas Q, por ordem decrescente de intensidade, se localizam a 515,5; 552,5; 591,5 e a 651,5 nm.

4.1.1.1.2. Caracterização por Espectrometria de massa

Ao analisar o espectro ESI-MS obtido após a purificação da porfirina (Figura 4.3) verifica-se que o íon molecular $[M+H]^+$ a m/z 718 correspondente à H₂TCP (C₅₂H₃₈N₄) está ausente. Neste espectro encontram-se evidenciados dois íons majoritários para valores m/z de 668,9 e 727,1. Inicialmente conjecturou-se que estes íons pudessem corresponder a diferentes fragmentações dos grupos cinamaldeído ligados nas posições *meso* do macrociclo porfirínico. Porém, depois de uma análise pormenorizada do padrão de fragmentações com recurso ao *software* ChemDraw® 12.0, rapidamente se rejeitou esta possibilidade. Por conseguinte, recorreu-se à literatura para encontrar explicações plausíveis que permitissem compreender a origem destes íons e perceber o que poderia ter ocorrido durante a síntese desta porfirina.

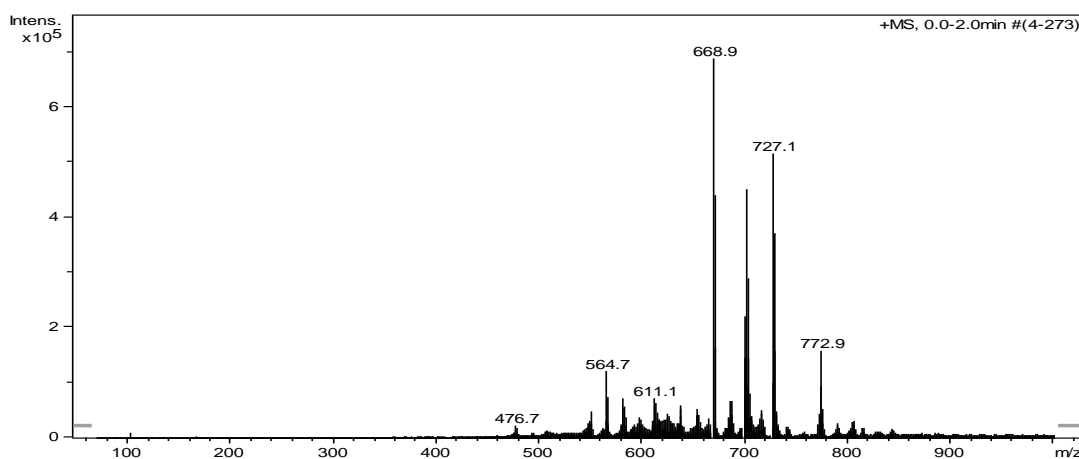


Figura 4.3. Espectro ESI-MS obtido após a síntese e purificação da H₂TCP pelo método de Adler-Longo.

Em condições oxidantes como as que se verificam no seio da mistura reaccional, o cinamaldeído (132,16 g.mol⁻¹) pode tornar-se instável e converter-se em benzaldeído, um aldeído de peso molecular 106,12 g.mol⁻¹ (Figura 4.4) ^[190,191].

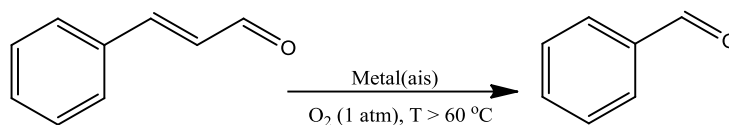


Figura 4.4. Clivagem oxidativa aeróbia da ligação C=C e conversão do cinamaldeído a benzaldeído [adaptado de Chen *et al.* 192].

Existem diversas estratégias que possibilitam a conversão do cinamaldeído a benzaldeído ^[193]. Neste caso em particular, a reacção foi realizada em refluxo de ácido propiónico a 120 °C, à pressão atmosférica. No entanto, a clivagem oxidativa da ligação C=C pelo oxigénio molecular requer a presença de um catalisador. Em 2009, Chen *et al.* efectuou esta conversão com sucesso usando metaloporfirinas (MP) como catalisador ^[192]. De facto, é possível que na mistura reaccional haja vestígios de metais, nomeadamente de ferro, zinco ou chumbo, provenientes dos solventes ou do material de vidro. Por conseguinte, é verosímil que à medida que se dá a síntese da porfirina, ocorra também a sua metalacção, e desse modo se reúnam todas as condições necessárias à ocorrência desta conversão.

Adicionalmente, o cinamaldeído pode também sofrer hidrogenação da ligação C=C e converter-se em hidrocinaldeído, um aldeído com peso molecular de 134,18 g.mol⁻¹ (Figura 4.5) ^[194,195]. Contudo, e de acordo com os dados experimentais disponibilizados na literatura, este tipo de reacção requer um ambiente redutor e pressões superiores à pressão na qual decorreu a reacção de síntese. No entanto, a mistura reaccional do método de Adler-Longo é bastante complexa e envolve a formação de macrociclos intermediários (*e.g.*, clorinas, dipirrimetanos, florinas e porfirinogénios) com estados de oxidação inferiores ao da porfirina. Por isso, a possibilidade de estes intermediários, ao serem oxidados para formar a porfirina correspondente, actuarem como redutores da dupla ligação do cinamaldeído não deve ser excluída.

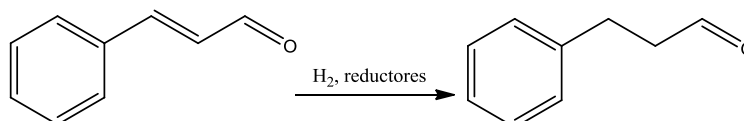
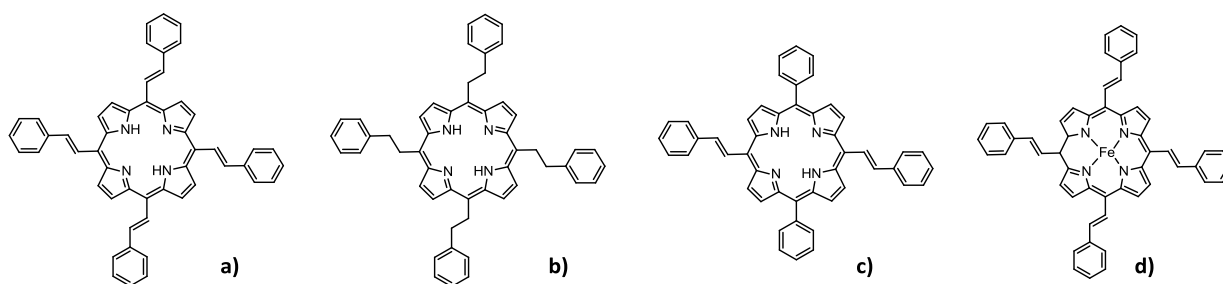


Figura 4.5. Hidrogenação da ligação C=C e conversão do cinamaldeído a hidrocinaldeído [adaptado de 195].

Posto isto, efectuou-se a correlação dos iões obtidos no espectro de massa com a possível estrutura molecular. Na Figura 4.6 encontram-se representadas a estrutura, peso molecular e as razões massa carga/abundância relativa, da porfirina esperada (a), da porfirina com as ligações C=C do cinamaldeído hidrogenadas (b), da porfirina com dois grupos benzaldeído e dois grupos cinamaldeído (c), e da porfirina complexada com Fe²⁺ (d).



Peso molecular: 718.9 g.mol ⁻¹	Peso molecular: 726.9 g.mol ⁻¹	Peso molecular: 666.8 g.mol ⁻¹	Peso molecular: 774.2 g.mol ⁻¹
m/z: 718.3 (100.0%), 719.3 (58.2%), 720.3 (16.6%), 721.3 (3.1%)	m/z: 726.4 (100.0%), 727.4 (58.2%), 728.4 (16.7%), 729.4 (3.1%)	m/z: 666.3 (100.0%), 667.3 (53.8%), 668.3 (14.2%), 669.3 (2.4%)	m/z: 774.2 (100.0%), 775.2 (60.0%), 776.3 (15.8%)

Figura 4.6. Representação das estruturas, peso molecular e razão massa/carga (abundância relativa) que permitem um melhor ajuste aos iões obtidos no espectro ESI-MS.

Não obstante as estruturas apresentadas possibilitarem uma boa correlação com o espectro ESI-MS obtido, é importante ter em consideração que estas estruturas resultam de pressupostos que necessitam de ser devidamente confirmados. A eventualidade de o ião m/z 772,9 corresponder à porfirina de interesse (m/z 718,9) complexada com Fe²⁺ (m/z 55,8) constitui um cenário favorável à elucidação do mecanismo envolvido na conversão do cinamaldeído a benzaldeído. Adicionalmente, a confirmação desta hipótese enfatiza a capacidade invulgar que esta porfirina possui para complexar Fe²⁺ nas condições experimentais do método de Adler-Longo, usualmente desfavoráveis à metalacção de porfirinas.

O espectro de massa evidencia a forte possibilidade de estarmos na presença de mistura de porfirinas (Figura 4.6) e, portanto, declina a possibilidade de estarmos na presença de uma porfirina pura. Ainda assim, esta nova porfirina, ou mistura de porfirinas, foi devidamente caracterizada do ponto de vista fotofísico e vai continuar a ser designada pela sigla H₂TCP em alusão à sua origem a partir do cinamaldeído. Contudo, foi excluída dos ensaios biológicos porque o conhecimento da estrutura química exacta é um requisito fundamental para a utilização de um composto químico como fotossensibilizador em PDT^[57].

As hipóteses supracitadas envolvem questões de reactividade química bastante interessantes, que requerem uma investigação pormenorizada para que, no futuro, possam ser validadas. O estudo destes pressupostos irá proporcionar uma percepção extraordinária do mecanismo de síntese desta porfirina pelo método de Adler-Longo e, concomitantemente, a sua elucidação estrutural.

4.1.1.1.3. Caracterização por espectroscopia de ¹H RMN

O espectro ¹H RMN da H₂TCP foi adquirido em clorofórmio deuterado (CDCl₃), num espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz. Ao fazer a análise do espectro obtido verificou-se que os sinais de ressonância referentes aos prótons NH internos (-2 a -3 ppm) e β-pirrólicos (8–9 ppm), característicos das porfirinas, estavam ausentes^[94]. Por outro lado, eram bem evidentes os sinais de ressonância correspondentes aos vários solventes utilizados durante o processo de purificação, nomeadamente do DCM (5,3 ppm), do metanol (3,49 ppm), do THF (3,76 ppm) e do etanol (1,25, 3,72 ppm)^[136]. Este resultado pode ser atribuído à quantidade reduzida de porfirina utilizada na aquisição do espectro. De facto, apesar de a espectroscopia de RMN ser uma técnica de grande importância na

elucidação de estruturas químicas, a obtenção de um espectro de qualidade requer a utilização de uma quantidade apreciável de composto puro ^[133]. Convém novamente salientar que, neste caso, existe uma forte possibilidade de termos uma mistura das porfirinas elucidadas na Figura 4.6.

No espectro ¹H RMN adquirido por Zakavi ^[120] para a H₂TCP, os sinais de ressonância dos prótons NH e β-pirrólicos surgem a δ - 2,43 e 9,49 ppm, respectivamente. Neste espectro, o sinal dos prótons β-pirrólicos surge a 9,5 ppm, um desvio químico invulgar que Zakavi atribuiu a possíveis interacções com os grupos cinamil. No entanto, mesmo que o espectro obtido apresentasse qualidade suficiente que permitisse a sua interpretação, não poderia ser estabelecida qualquer relação entre ambos os espectros, visto que os resultados de espectrometria de massa afirmam que a porfina sintetizada não exhibe os quatro grupos cinamil.

4.1.1.1.4. Rendimento quântico de oxigénio singleto

O oxigénio singleto é determinante em vários processos biológicos. Como referido na secção 1.2.3.2 esta espécie reactiva de oxigénio é fundamental para a morte das células cancerígenas submetidas ao tratamento fotodinâmico. Com efeito, o oxigénio singleto, formado pela reacção do tipo II, é responsável pela oxidação de biomoléculas fundamentais (*e.g.*, proteínas, membranas lipídicas, ácidos nucleicos) ^[196,197]. A elucidação dos mecanismos subjacentes ao processo fotodinâmico representa um dos principais focos de interesse dos investigadores desta área, e depende da compreensão de factores como o tempo de vida (τ_{Δ}), a localização espacial do fotossensibilizador na célula e a ocorrência, ou não, de difusão para outros compartimentos subcelulares ^[197,198].

A capacidade que as porfirinas apresentam para usar a energia da luz na conversão do oxigénio no estado fundamental em oxigénio no estado excitado singleto é expressa quantitativamente pelo rendimento quântico de oxigénio singleto (ϕ_{Δ}). A determinação deste parâmetro, que se pretende que seja o mais elevado possível, é essencial na avaliação da eficácia do fotossensibilizador em PDT ^[93,118,199]. A maioria dos valores de ϕ_{Δ} e τ_{Δ} disponíveis na literatura foram documentados em solventes orgânicos (*e.g.*, tolueno, etanol, THF) e não em solventes aquosos ou directamente em sistemas biológicos (células em cultura ou tecido animal). Esta situação deve-se à difícil obtenção do sinal de fosforescência do ¹O₂ em meio aquoso, e é decorrente das propriedades físico-químicas do ¹O₂ (*e.g.*, τ_{Δ} insignificante ($2,0 \times 10^{-7}$ s) quando comparado com os valores obtidos em solventes orgânicos ($3,0 \times 10^{-5}$ s em THF; $2,9 \times 10^{-5}$ s em tolueno, $1,2 \times 10^{-5}$ s em etanol)), e da maior probabilidade de agregação do fotossensibilizador em meio aquoso ^[200,201]. Ademais, a detecção do ¹O₂ em sistemas biológicos é também influenciada pela presença de biomoléculas (*e.g.*, proteínas), que ao interagirem com ¹O₂ motivam a redução do seu tempo de vida e difusão ao longo da célula. Por conseguinte, a eficácia do tratamento fotodinâmico é extraordinariamente dependente da localização intracelular do fotossensibilizador, a qual também determina o modo como ocorre a destruição das células tumorais (*e.g.*, apoptose (mitocôndria, retículo endoplasmático e lisossomas) ou necrose (citoplasma)) ^[197,202,203].

Nesta dissertação, a fosforescência do oxigénio singleto foi detectada na região do infravermelho-próximo (1270 nm) (secção 3.1.3.6.2), usando THF como solvente.

A razão linear entre o declive obtido (intensidade do sinal de emissão de ¹O₂ em função das diferentes intensidades do laser) pela porfina H₂TCP e pela fenalenona usada com referência (Figura 4.7), e cujo valor de ϕ_{Δ} nas condições experimentais seleccionadas é conhecido (0,95 ^[146]), permitiu determinar o ϕ_{Δ} da porfina ^[145,198].

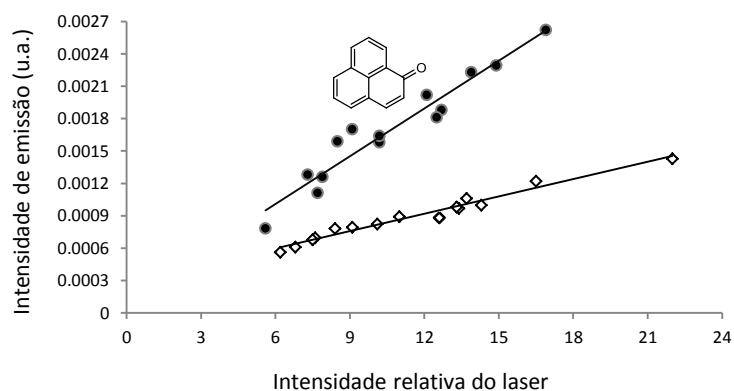


Figura 4.7. Emissão do oxigénio singleto a 1270 nm em função da intensidade relativa do laser para soluções de (●) Fenalenona e (◊) H₂TCP em THF. $y = 1,47 \times 10^{-4} x + 1,25 \times 10^{-4}$ ($R^2=0,933$) corresponde à equação da recta obtida para a fenalenona e $y = 5,34 \times 10^{-5} x + 2,79 \times 10^{-4}$ ($R^2=0,971$) à equação da recta obtida para a H₂TCP.

O valor do rendimento quântico de oxigénio singleto obtido para a H₂TCP foi de 0,35. Ainda que o ϕ_{Δ} de um fotossensibilizador ideal deva ser 1, a maioria dos FS aprovados para PDT apresentam rendimentos quânticos compreendidos entre 0,3 e 0,6 [73]. Assim sendo, o ϕ_{Δ} obtido para a H₂TCP encontra-se em conformidade com os ϕ_{Δ} obtidos por fotossensibilizadores com eficácia clínica comprovada, nomeadamente o Photofrin®, cujo ϕ_{Δ} em tolueno é de 0,32 [204]. Adicionalmente, é fundamental ter em consideração que a formação de ¹O₂ está associada à reacção fotodinâmica do tipo II, não contemplando a contribuição da reacção do tipo I para a destruição das células tumorais [145]. Logo, um ϕ_{Δ} reduzido não é necessariamente sinónimo de um FS ineficaz. Por conseguinte, os eventos que medeiam a destruição das células tumorais devem ser interpretados com prudência, dada a natureza específica de ambas as reacções [204].

4.1.1.1.5. Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) expressa a proporção de fótons absorvidos pelo FS, responsáveis pela sua transição do estado fundamental para o estado excitado singleto, que são desactivados por *via* radiativa com emissão fluorescência [137]. A fluorescência emitida pelo fotossensibilizador é de grande utilidade em fotodiagnóstico porque permite a detecção da localização intracelular do tumor e a aferição das suas dimensões [67].

O ϕ_F da H₂TCP em tolueno foi determinado por comparação com o ϕ_F da TPP (0,11). Os espectros de fluorescência foram adquiridos à temperatura ambiente, após desarejamento das soluções por saturação com azoto. O desarejamento permitiu eliminar o oxigénio que actua como supressor da fluorescência. A amostra (H₂TCP) e a referência (TPP) foram excitadas a 555 nm ($DO_{555} = 0,079$), comprimento de onda correspondente à intersecção das bandas Q_{III}. A emissão de fluorescência foi monitorizada dos 580 aos 800 nm (Figura 4.8).

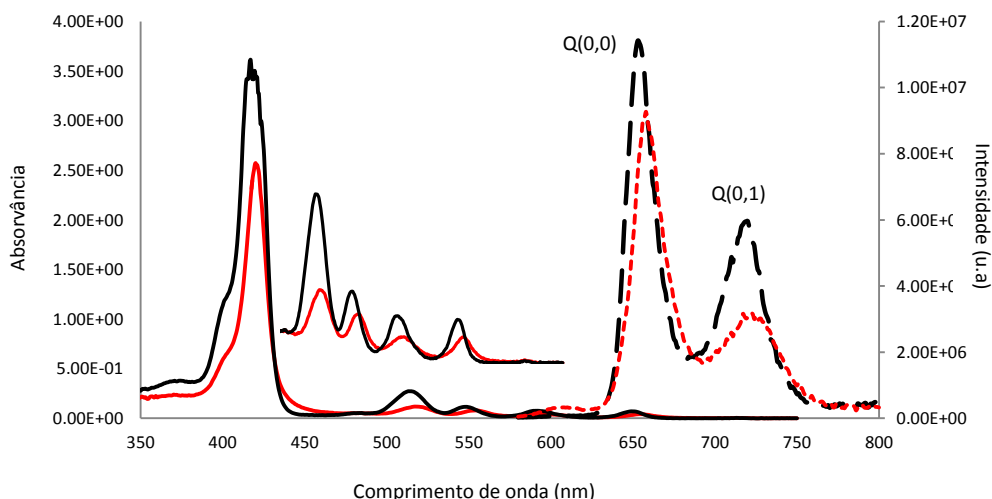


Figura 4.8. Espectros de absorção (–) e de emissão de fluorescência (---) após excitação a 555 nm da TPP (preto) e da H₂TCP (vermelho) em tolueno.

Após a obtenção dos espectros, o ϕ_F da H₂TCP foi calculado por comparação das áreas dos espectros de emissão, determinadas com recurso ao *software* OriginPro 8, e posterior aplicação da fórmula 3.4 (secção 3.1.3.6.1). A H₂TCP apresenta um ϕ_F de 0,0915. Este valor, apesar de reduzido, é bastante próximo do ϕ_F da TPP em condições similares. Com base na equação 3.5, é possível deduzir que baixos rendimentos quânticos de fluorescência estão geralmente associados a elevados rendimentos quânticos do estado tripleto (ϕ_T), o estado essencial à ocorrência do efeito terapêutico^[67]. Deste modo, o baixo ϕ_F desta porfirina pode ser um potencial indicador da sua eventual eficácia em PDT.

4.1.1.2. Síntese da H₂TCP pelo método de Lindsey

Ao interpretar os resultados de espectrometria de massa obtidos pelo método de Adler-Longo (secção 4.1.1.1.2) presumiu-se que as condições reaccionais adoptadas pudessem ser severas ao ponto de promover alterações estruturais no cinamaldeído. Na tentativa de solucionar os problemas decorrentes da metodologia de Adler-Longo, tentou-se efectuar a síntese da H₂TCP pelo método de Lindsey. Este método, ao partir do pressuposto que o pirrol e o cinamaldeído são moléculas reactivas que não necessitam de temperaturas muito elevadas para reagirem, permite efectuar a síntese de porfirinas em condições reaccionais suaves^[104].

A síntese da H₂TCP pelo método de dois-passos de Lindsey foi efectuada como descrito na secção 3.1.2.1.2. A instabilidade do porfirinogénio na presença de luz e espécies oxidantes^[126] permite explicar o facto de a reacção ter decorrido no escuro, sob atmosfera inerte (atmosfera desprovida de oxigénio molecular por saturação com azoto). Uma hora após o início da reacção efectuou-se um espectro de massa (Figura 4.9) e um espectro de UV/Vis (Figura 4.10) para confirmar a presença deste intermediário de peso molecular 724,4 g.mol⁻¹.

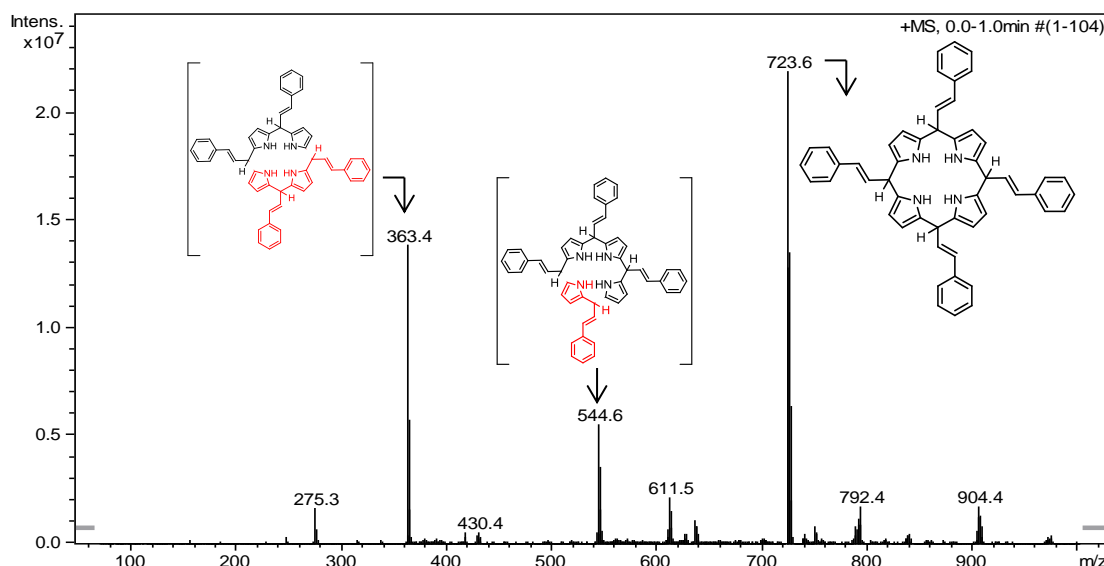


Figura 4.9. Espectro ESI-MS da mistura reaccional obtido após a conclusão da primeira etapa de síntese pelo método de Lindsey. Representação das possíveis estruturas (preto) dos subprodutos correspondentes aos iões maioritários. A vermelho encontra-se representada a fracção da estrutura que se acredita estar suprimida.

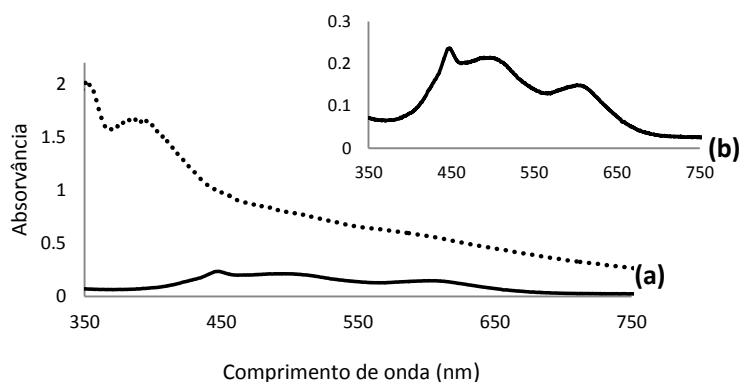


Figura 4.10. (a) Espectros de UV/Vis obtidos antes (.....) e após (-) a adição de DDQ no processo de síntese da H₂TCP pelo método de Lindsey. (b) Ampliação do espectro obtido após a adição de DDQ.

Ao analisar o espectro de massa representado na Figura 4.9 verifica-se, para um valor m/z de 723,6, a presença do ião molecular correspondente ao porfirinogénio e que comprova o sucesso da primeira etapa da reacção. Observam-se também iões minoritários para razões m/z 363,4 e 554,6. Estes iões, cujas razões m/z são inferiores à do porfirinogénio, podem corresponder a fragmentações ou a subprodutos lineares formados durante a reacção, aos quais se atribui a designação de polipirrilmetanos de cadeia aberta^[106].

A realização do espectro de UV/Vis teve por objectivo corroborar a informação obtida por espectrometria de massa. O porfirinogénio e as porfirinas apresentam conjugações π distintas que se traduzem por diferentes características espectroscópicas^[205]. Este intermediário é incolor e não absorve nem emite fluorescência na região visível do espectro electromagnético^[126,206]. Ao analisar o espectro UV/Vis adquirido após o término da primeira etapa da reacção (linha tracejada) verifica-se que, apesar da ausência de bandas de absorção definidas, a amostra reaccional apresenta alguma absorção. Esta absorção pode ser atribuída a outros intermediários reaccionais, nomeadamente ao dipirrilmetano. Efectivamente, o meio reaccional apresentava um tom vermelho-escuro característico deste intermediário, e que pode sugerir a sua presença^[207,108].

Uma vez confirmada a presença do porfirinogénio, a segunda etapa deste método consistiu na adição do agente oxidante DDQ à mistura reaccional. Na sequência desta adição observou-se uma alteração colorimétrica, isto é, a solução passou de um tom vermelho para um tom arroxeadado. Ao interpretar o espectro UV/Vis efectuado após a adição da DDQ (linha sólida) observa-se uma banda a 446,5 nm, que caso corresponda à banda Soret exibe um desvio batocrómico significativo. O espectro de absorção *per se* não permite assegurar a eficácia da oxidação e conversão do porfirinogénio na porfirina correspondente. Contudo, ao realizar um tlc (DCM) concluiu-se, devido à ausência da mancha avermelhada característica das porfirinas, que a etapa de oxidação não tinha sido eficaz e, por conseguinte, não se tinha formado a porfirina de interesse em quantidades significativas.

Esta reacção foi posteriormente repetida nas condições descritas em 3.1.2.1 estratégia 2. Nesta tentativa de síntese, os reagentes (cinamaldeído, pirrol e TFA) foram adicionados através de um septo. Este procedimento tinha por objectivo asseverar a inertização da atmosfera, de forma a garantir que o oxigénio molecular não exerceria qualquer interferência na reacção. Porém, os resultados obtidos foram similares. Em suma, estes resultados sugerem que a oxidação do porfirinogénio é um passo bastante delicado e determinante na síntese desta porfirina.

4.1.1.3. Síntese da H₂TCP por adaptação do método proposto por Zakavi

A síntese da H₂TCP foi também efectuada com base no método descrito por Zakavi ^[120] ($\eta_{H_2TCP}=4,5\%$) em 2010 (3.1.2.1 estratégia 3). Decorridas 2,5 h de refluxo, adquiriu-se um espectro UV/Vis (Figura 4.11). Neste espectro é visível a banda Soret a 418 nm, que permite confirmar a presença da porfirina no seio da mistura reaccional.

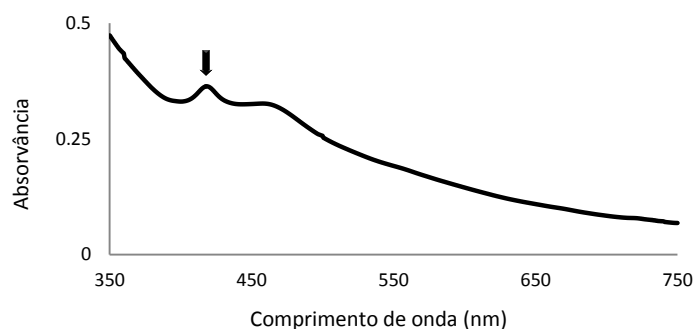


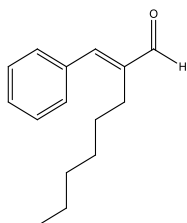
Figura 4.11. Espectro de UV/Vis obtido no final da reacção de síntese da H₂TCP em conformidade com as condições propostas por Zakavi.

Após neutralizar o ácido com uma solução de NaOH 50 mM, evaporou-se o solvente até à secura. Adicionou-se água destilada ao sólido obtido e colocou-se em refluxo a 100 °C. À semelhança do que ocorre na extracção de Soxhlet, a insolubilidade desta porfirina em água poderá permitir a eliminação de subprodutos hidrofílicos formados durante a reacção. Após 2 h de refluxo, o sólido foi recuperado por filtração a pressão reduzida e dissolvido em DCM. A presença da porfirina nesta fracção foi confirmada por tlc (DCM).

Embora esta estratégia seja aparentemente eficaz, a purificação da porfirina foi suspensa por se considerar que o tempo a dispensar não compensaria a quantidade de produto que iria ser obtido (< 1%). No entanto, é nosso objectivo futuro retomar ou repetir e otimizar este procedimento experimental, dada a grande potencialidade desta porfirina.

4.1.2. 5,10,15,20-tetraquis(α -hexilcinamaldeído)porfirina.

O α -hexilcinamaldeído, encontrado naturalmente no óleo da camomila, é um aditivo de fragrância comumente utilizado na indústria cosmética^a.



Actualmente, existem diversos fármacos anticancerígenos (*e.g.*, bisacetamida hexametileno) cujo mecanismo de acção se baseia no modo como interagem e modulam as membranas biológicas^[209]. A escolha deste aldeído teve em consideração o facto de a sua estrutura apresentar uma cadeia alquílica longa que poderia favorecer a interacção com as membranas celulares e, em consequência da sua maior permeabilidade celular, poder potenciar o efeito terapêutico após o tratamento

fotodinâmico.

A síntese da 5,10,15,20-tetraquis(α -hexilcinamaldeído)porfirina foi efectuada como descrito em 3.1.2.2. Após 3 h de refluxo averiguou-se a presença da porfirina na mistura reaccional por espectroscopia de UV/Vis (Figura 4.12). A ausência de bandas de absorção no espectro obtido (linha sólida) indicia a ausência de porfirina. Por outro lado, este resultado fez-nos supor que a reacção ainda não estava completa e que poderíamos estar na presença de espécies intermediárias, nomeadamente do porfirinogénio. Com base neste pressuposto adicionou-se uma pequena quantidade de DDQ na cuvette do espectrofotómetro, homogeneizou-se a solução e adquiriu-se um novo espectro de UV/Vis (linha tracejada). Como não se verificou qualquer alteração significativa a reacção permaneceu em refluxo por mais 2 h. O aumento do tempo de reacção e da permanência em ácido propiónico é responsável pelo aumento da formação de subprodutos e pela diminuição do rendimento da reacção. Porém, neste caso em concreto, em que não houve formação da porfirina, esta questão pode ser ignorada^[107].

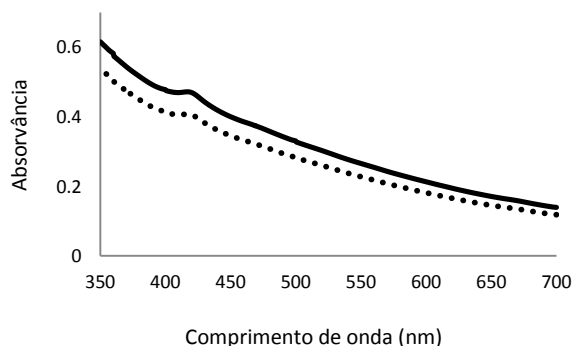


Figura 4.12. Espectros de UV/Vis da mistura reaccional da síntese da porfirina α -hexilcinamaldeído antes (—) e após (····) a adição de DDQ na cuvette.

Decorridas as 2 h de refluxo adicional adquiriu-se um novo espectro de UV/Vis mas não se visualizou qualquer alteração face aos espectros da Figura 4.12. Ainda que os resultados de espectroscopia UV-vis indicassem a ausência da porfirina, após a neutralização do ácido efectuou-se um tlc (DCM/EtOH 9:1) e um espectro de massa (Figura 4.13). A ausência da mancha vermelha característica às porfirinas e do ião de razão m/z 1054,7 correspondente à porfirina pretendida ($C_{76}H_{86}N_4$) reafirmou a sua inexistência na mistura reaccional. Nesta fase prévia à purificação existe, como se constata pelo espectro de massa da Figura 4.13, uma grande quantidade de subprodutos reaccionais. Com o intuito de deslindar a proveniência desses iões recorreu-se ao *software* ChemDraw. Após um estudo detalhado concluiu-se que os iões correspondentes às razões m/z 671,5 e m/z 493,2 poderiam corresponder a

^a In <http://www.truthinaging.com/ingredients/hexyl-cinnamal/> (acedido a 29 de Dezembro de 2012).

eventuais fragmentações (representadas a vermelho na Figura) de 2 ou 3 grupos substituintes, respectivamente.

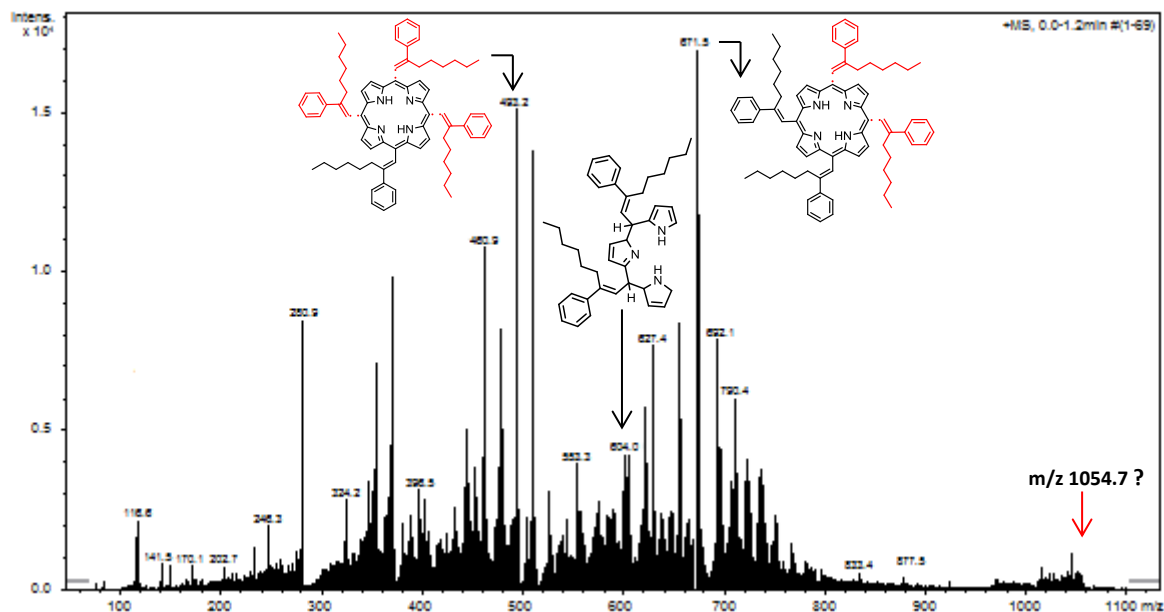
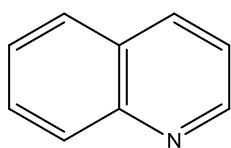


Figura 4.13. Espectro ESI-MS da mistura reaccional obtido após neutralização do ácido e lavagem da solução como descrito em 3.1.2.2. Representação das possíveis estruturas correspondentes aos iões de razão m/z 493,2 e 671,5.

À semelhança das dificuldades encontradas na síntese da H_2TCP , também a síntese de porfirinas a partir do seu derivado α -hexilcinamaldeído se revelou bastante complexa. Ainda assim, os dados revelados por espectrometria de massa são bastante interessantes na perspectiva mecanística, e futuramente poderão ser alvo de um estudo mais detalhado. Contudo, e como esta tese tinha por objectivo a síntese de porfirinas para aplicação em PDT, foi essencial obter outras porfirinas cuja síntese não fosse efectuada com base no cinamaldeído e seus derivados.

4.1.3. 5,10,15,20-tetrais(quinolina-2-il)porfirina



A quinolina, isolada a partir do carvão desde 1834, caracteriza-se por uma estrutura duplo anel, constituída por um anel benzeno e um anel piridina fundidos em dois átomos de carbono adjacentes.

As quinolinas representam uma das classes de fármacos com maior sucesso^[210]. As propriedades terapêuticas destes compostos são aplicadas no tratamento de diversas patologias, nomeadamente na malária, leishmaniose, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), artrite e lúpus eritematoso. Adicionalmente, estes compostos são também conhecidos por apresentarem actividade antibacteriana, anticancerígena e anti-inflamatória^[210-213]. Curiosamente, apesar da ampla aplicação clínica, o seu mecanismo de acção continua por elucidar, revelando-se uma área de investigação bioquímica com grande potencial^[210].

A síntese de porfirinas, *per se* já associadas a importantes funções biológicas^[93], e a substituição das suas posições *meso* por derivados quinolina, poderá representar uma estratégia de excelência na potenciação do efeito anticancerígeno destes compostos e, como tal, foi a estratégia adoptada.

4.1.3.1. Síntese pelo método de Adler-Longo

As condições reaccionais utilizadas na síntese da 2-TQP pelo método de Adler-Longo, detalhadas na secção 3.1.2.3.1, foram seleccionadas com base no protocolo estabelecido por Amaravathi para a síntese da 5,10,15,20-tetraquis(2-cloroquinolina-3-il)porfirina ^[213]. Decorridas 4 h a 140 °C, e após confirmação da presença da porfirina na mistura reaccional por tlc e espectroscopia de UV/Vis, neutralizou-se o ácido propiónico com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, tendo-se verificado a formação de uma grande quantidade de espuma. A adição de uma solução concentrada de NaCl permitiu separar as duas fases e facilitou a recolha da fase orgânica contendo a porfirina. A purificação da 2-TQP foi iniciada por cromatografia em coluna de sílica de grão fino (40–63 µm), usando uma mistura de DCM e THF 9:1 como eluente. No entanto, a monitorização das eluições por tlc revelou a presença adicional de outros subprodutos de fluorescência azul, verde e amarela. Por conseguinte, e com o objectivo de ultrapassar este problema, recorreu-se à cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60H, efectivando as eluições com recurso à mistura de solventes supramencionada. Esta metodologia permitiu isolar eficazmente a 2-TQP, como se comprovou pela presença exclusiva da mancha de fluorescência vermelha característica das porfirinas (R_f (DCM/THF 9:1) = 0,84) no tlc. Obtiveram-se 228 mg (η =15,4%) de um sólido de cor púrpura. A porfirina foi caracterizada pelas técnicas descritas nas subsecções subsequentes.

4.1.3.1.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis

O espectro de absorção UV/Vis da 2-TQP em THF encontra-se representado na Figura 4.14

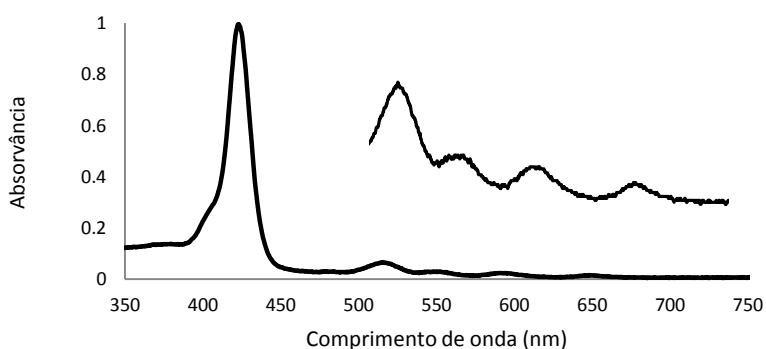


Figura 4.14. Espectro de absorção UV/Vis da 2-TQP em THF, obtido após purificação por cromatografia em placa preparativa.

A 2-TQP é uma porfirina que, enquanto na forma de base livre, apresenta um espectro de absorção do tipo *etio*.

Os coeficientes de extinção molar foram determinados por, aplicação directa da lei de Beer-Lambert, a partir de soluções de porfirina em THF com concentrações a variar entre 10^{-5} – 10^{-6} M (Figura 4.15). Os coeficientes de correlação ($R^2 \geq 0,998$) obtidos reflectem uma forte correlação linear, que indica que para estas concentrações não se verifica a agregação do composto em solução. Todavia, esta observação não exclui a possibilidade de agregação após administração desta porfirina às células em cultura ^[204].

A análise pormenorizada do espectro denota a presença da banda Soret a 422,5 nm ($1.24E+05$, $R^2 = 0,998$), e de quatro bandas Q a 515,5 ($9.92E+03$, $R^2 = 0,999$); 552 ($4.54E+03$, $R^2 = 0,999$); 590 ($3.39E+03$, $R^2 = 0,998$) e a 648 ($1.85E+03$, $R^2 = 0,998$) nm, em sentido decrescente de intensidade.

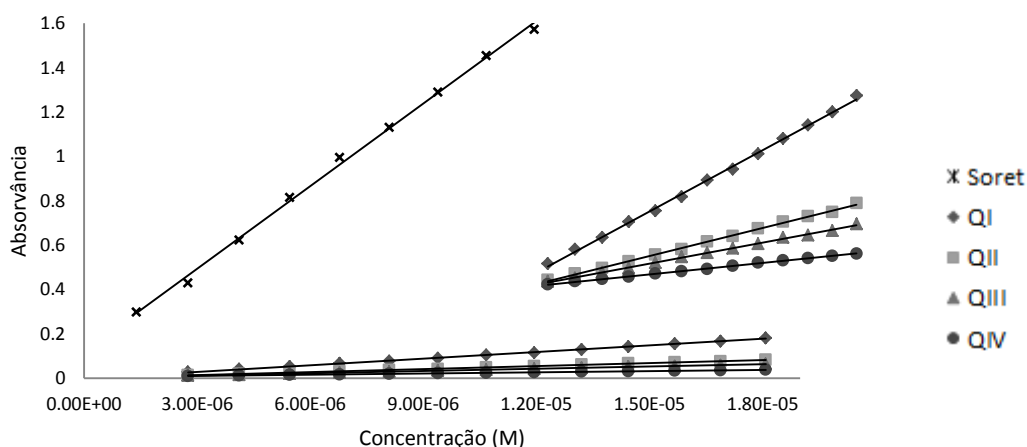


Figura 4.15. Determinação dos coeficientes de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$) das bandas Soret e Q da 2-TQP em THF, por aplicação directa da lei de Beer-Lambert.

4.1.3.1.2. Caracterização por HPLC-MS

O HPLC é uma técnica de grande importância na separação de macrociclos tetrapirrólicos ^[126]. A solução para análise foi preparada e analisada com base nos parâmetros de aquisição especificados na secção 3.1.3.3 (Tabela 3.4). Após a separação cromatográfica, os picos presentes no cromatograma de HPLC (Figura 4.16) foram caracterizados por espectrometria de massa.

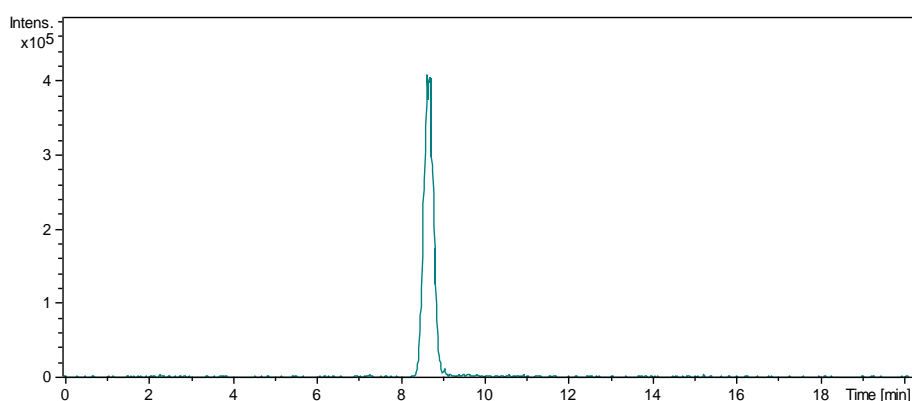


Figura 4.16. Cromatograma de HPLC da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina que certifica o seu elevado grau de pureza.

A presença de um único pico cromatográfico certifica o elevado grau de pureza da porfirina em estudo. A 2-TQP foi eluída da coluna a um tempo de retenção compreendido entre 8,58–8,72 min, por uma mistura com 20% de água ultra-pura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 80% de acetonitrilo. O tempo de retenção é um parâmetro essencial que permite inferir a polaridade do composto em estudo, uma vez que a interação dos grupos substituintes das porfirinas com as cadeias hidrocarbonadas da fase estacionária representa um dos principais mecanismos de retenção em cromatografia e, em simultâneo, actua como um indicador da solubilidade do composto em água ^[126].

A identidade da 2-TQP ($C_{56}H_{34}N_8$, $818,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foi confirmada por espectrometria de massa. A análise do espectro ESI-MS (Figura 4.17) denota a presença do ião molecular $[M+H]^+$ correspondente à 2-TQP, a uma razão m/z de 819,8. Não obstante a presença de outros iões, as suas abundâncias relativas são tão exíguas que se podem desprezar. Este resultado está em conformidade com o elevado grau de pureza atestado pelo cromatograma de HPLC.

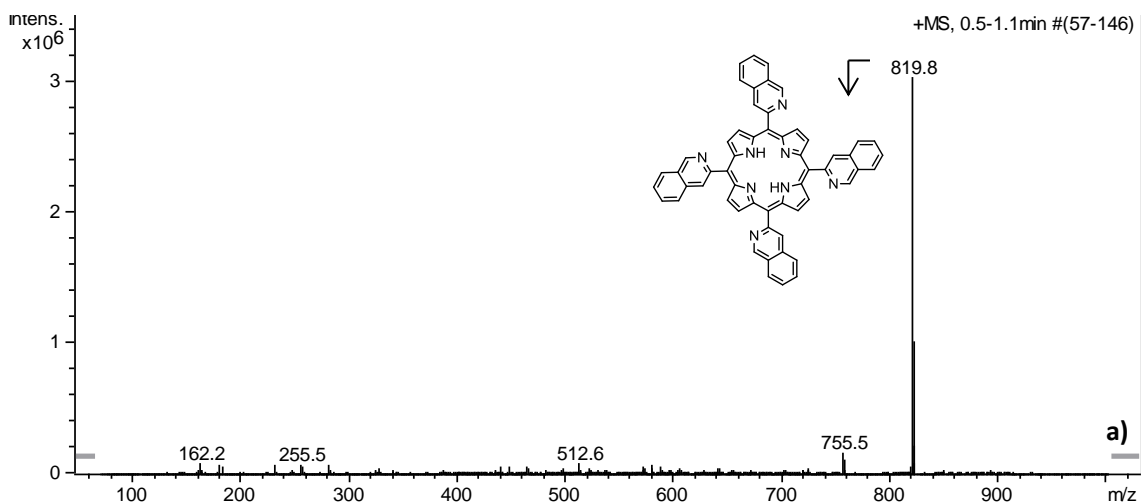


Figura 4.17. (a) Espectro ESI-MS obtido após síntese e purificação da 2-TQP pelo método de Adler-Longo.

A análise sequencial (MS^n) é de grande relevância na elucidação da estrutura molecular e confirmação da identidade do composto em análise. Esta técnica tira partido da existência de equipamentos multi-sector, nos quais os iões são fragmentados e subsequentemente analisados. Assim sendo, após a ionização do composto alvo e selecção do ião precursor efectua-se a sua dissociação, na câmara de colisão, por impacto com os átomos de um gás. Os iões resultantes deste processo, usualmente designados iões produto ou fragmentos, são posteriormente analisados ^[126].

A fragmentação do ião molecular $[M+H]^+$ m/z 819,1, representado pelo losango azul no espectro, resulta na formação de um fragmento de m/z 691,1 (Figura 4.17b), que corresponde à perda de um grupo substituinte. Por sua vez, a fragmentação do ião m/z 691,1 está na origem ao ião m/z 562,3 (Figura 4.17c), compatível com a perda de dois grupos substituintes. As fragmentações encontram-se representadas a vermelho na estrutura do composto.

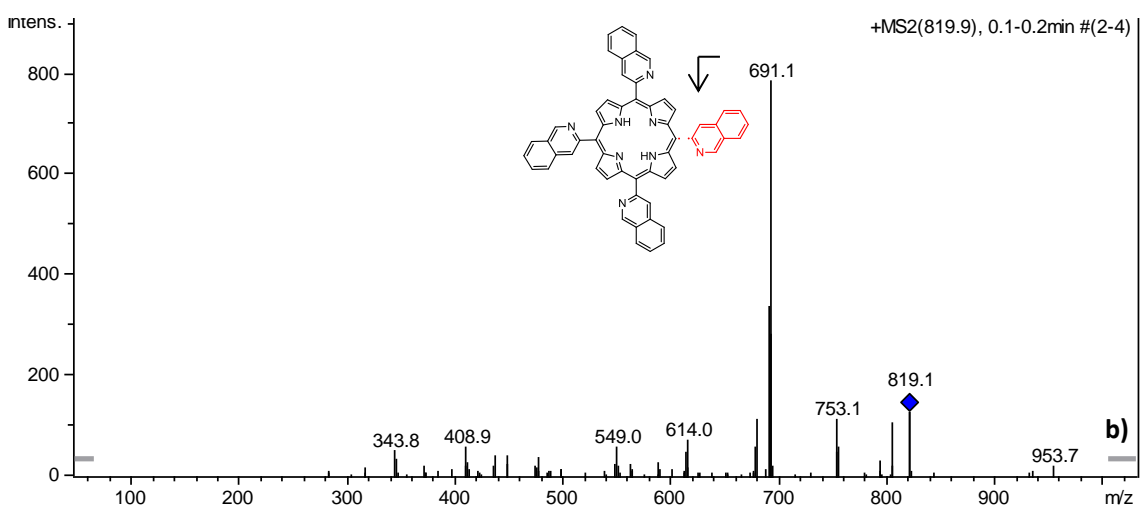


Figura 4.17. (b) Espectro ESI-MS/MS obtido após síntese e purificação da 2-TQP pelo método de Adler-Longo.

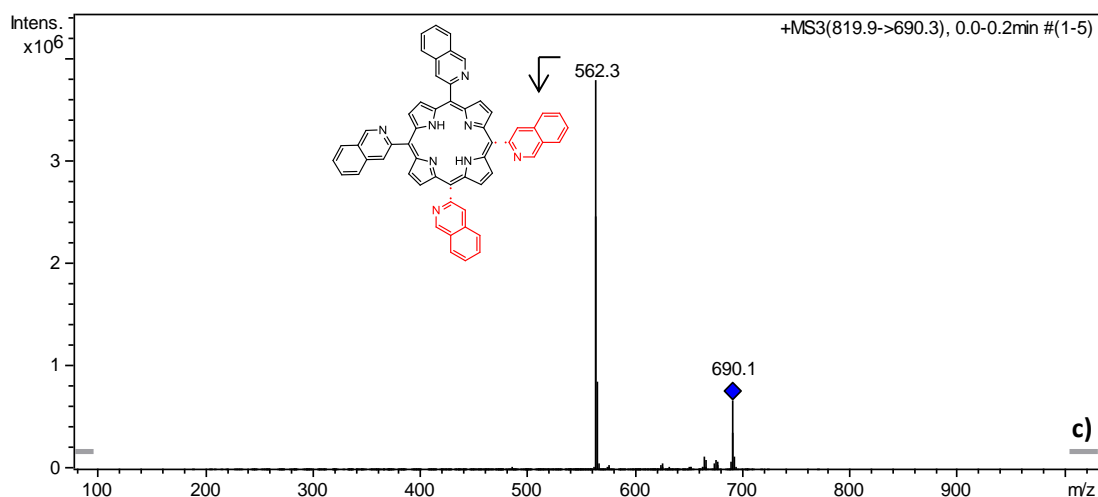


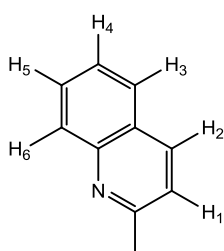
Figura 4.17. (c) Espectro ESI-MS/MS/MS obtido após síntese e purificação da 2-TQP pelo método de Adler-Longo.

Estas observações são congruentes com o facto de as ligações estabelecidas entre o macrociclo porfirínico e os grupos substituintes serem mais lábeis e facilmente fragmentáveis. Em contraste, o macrociclo tetrapirrólico aromático é muito estável e pouco propenso à fragmentação. (HPLC e perfs)

4.1.3.1.3. Caracterização por 1H RMN

A aromaticidade das porfirinas pode ser facilmente comprovada por espectroscopia de RMN. Com efeito, a conjugação π destes compostos confere-lhes um espectro de 1H RMN bastante peculiar, que se caracteriza pela presença do sinal de ressonância dos protões internos NH a -2 a -3 ppm, e dos sinais de ressonância dos protões meso e β -pirrólicos a 10–11 ppm e 7–9 ppm, respectivamente. Estas diferenças nos valores dos desvios químicos advêm do facto de a corrente electrónica gerada pelos electrões π deslocalizados em torno do anel porfirínico provocar uma forte blindagem dos seus protões internos e a desblindagem dos protões externos^[94,97,214].

O espectro 1H RMN da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina (Figura 4.18), adquirido numa solução de clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) com recurso a um espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz, apresenta os desvios químicos característicos das porfirinas. O sinal singlete (s) correspondente aos protões NH surge a δ - 2,58 ppm, enquanto o sinal singlete corresponde aos 8 protões β -pirrólicos surge a δ 8,88 ppm.



Esta porfirina é simétrica, o que significa que os quatro grupos 2-quinolina (2-quin) presentes nas posições *meso*-porfirínicas são equivalentes. Estes protões apresentam 5 picos distintos, 2 tripletos (t) e 4 dupletos (d). Os dupletos verificam-se nos protões H_1 , H_2 , H_3 e H_6 , enquanto os tripletos resultam do acoplamento do protão H_5 com os protões H_6 e H_4 e do acoplamento do protão H_4 com os protões H_3 e H_5 .

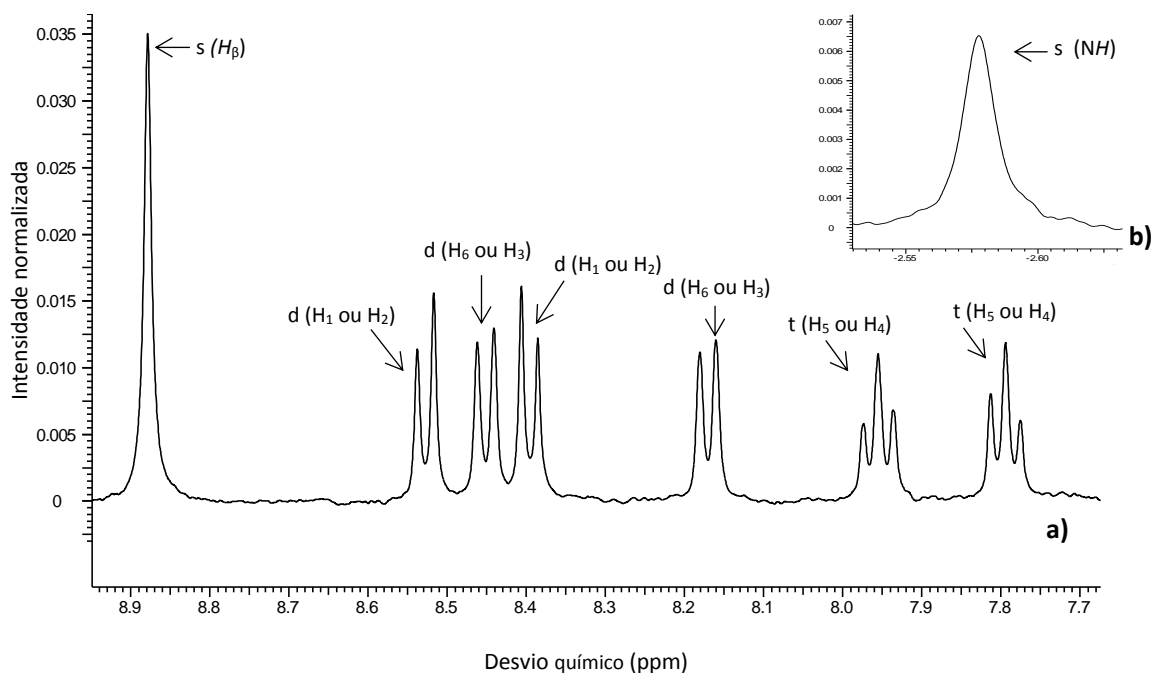


Figura 4.18. Espectro ^1H RMN da 2-TQP em CDCl_3 , evidenciando os detalhes (a) da região aromática e (b) da região NH.

5,10,15,20-tetraquis(quinolina-2-il)porfirina ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ -2,58 ppm (s, 2H, NH); δ 7,8 ppm (t, 3H, 2-quin.); δ 7,95 ppm (t, 3H, 2-quin.); δ 8,15 ppm (d, 2H, 2-quin.); δ 8,41 ppm (d, 2H, 2-quin.); δ 8,45 ppm (d, 2H, 2-quin.); δ 8,52 ppm (d, 2H, 2-quin.); δ 8,88 ppm (s, 8H, H β -pirrol).

Apesar de se ter efectuado a atribuição dos sinais de ressonância dos prótons do grupo quinolina com base nas constantes de acoplamento, os dados disponíveis não permitem estabelecer uma correlação total, isto é, não é possível garantir que, por exemplo, um dado sinal corresponde ao próton H₁ e não ao H₂. Efectivamente, esta correspondência só seria possível com a realização de um espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear (COSY).

Ainda que no âmbito desta tese apenas se pretendesse estabelecer a identidade da porfirina sintetizada, o que efectivamente foi alcançado, pretende-se também estabelecer a correspondência dos sinais obtidos.

4.1.3.1.4. Rendimento quântico de oxigénio singleto

A fosforescência do oxigénio singleto foi medida a 1270 nm, como descrito em 3.1.3.5.2.

A razão linear entre os declives da 2-TQP e da fenalenona, obtidos pela intensidade do sinal de emissão de $^1\text{O}_2$ em função das diferentes intensidades do laser, (Figura 4.19) possibilitou a determinação do ϕ_Δ da 2-TQP [145,198].

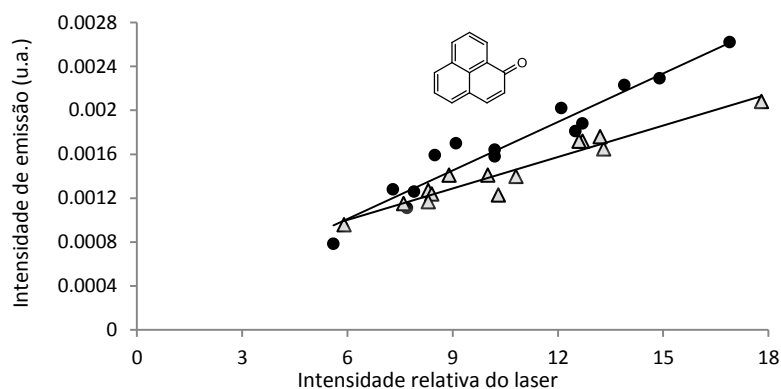


Figura 4.19. Emissão do oxigênio singlete a 1270 nm em função da intensidade relativa do laser para soluções de (•) Fenalenona e (Δ) 2TQP em THF. $y = 1,47 \times 10^{-4} x + 1,25 \times 10^{-4}$ ($R^2 = 0,933$) corresponde à equação da recta obtida para a fenalenona e $y = 9,55 \times 10^{-5} x + 4,39 \times 10^{-4}$ ($R^2 = 0,931$) à equação da recta obtida para a 2-TQP.

O rendimento quântico de oxigênio singlete obtido experimentalmente para a 2-TQP em tolueno foi de 0,62. O ϕ_{Δ} reflecte a capacidade do sensibilizador para formar oxigênio singlete, considerado o factor-chave na morte das células cancerígenas sujeitas ao tratamento fotodinâmico. A 2-TQP apresenta um ϕ_{Δ} superior ao de muitos fotossensibilizadores em uso clínico, nomeadamente o Foscan®, um fotossensibilizador de segunda geração cujo $\phi_{\Delta(DMSO)}$ é de 0,40^[215,216]. Não obstante a dependência com o solvente, o ϕ_{Δ} obtido para a 2-TQP deixa antever uma grande eficácia na sua aplicação como agente fotossensibilizador em PDT^[217].

4.1.3.1.5. Rendimento quântico de fluorescência

O ϕ_F da 2-TQP em tolueno foi determinado por comparação com o ϕ_F da TPP (0,11). Os espectros de fluorescência foram adquiridos à temperatura ambiente, após desarejamento das soluções por saturação com azoto. As soluções de 2-TQP e TPP em tolueno foram excitadas a 553 nm ($DO_{555} = 0,100$), comprimento de onda de intersecção das bandas Q_{III} nos espectros de absorção. A emissão de fluorescência foi monitorizada dos 560 aos 800 nm (Figura 4.20).

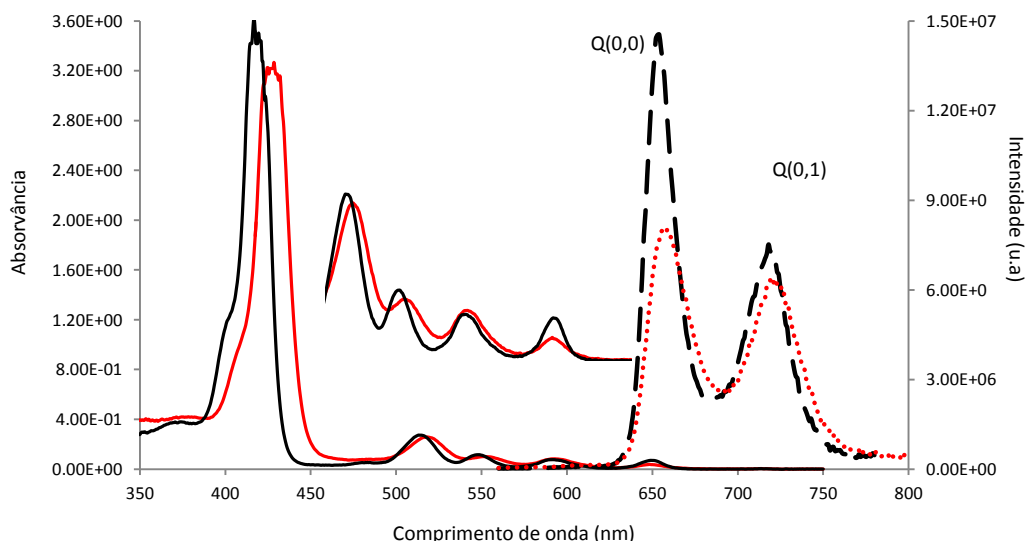


Figura 4.20. Espectros de absorção (–) e de emissão de fluorescência (---) após excitação a 553 nm da TPP (preto) e da 2-TQP (vermelho) em tolueno.

No espectro de emissão de fluorescência da TPP, a banda Q(0,0) surge a 653 nm e a banda Q(1,0) a 720 nm. Por sua vez, o espectro de emissão de fluorescência da 2-TQP apresenta a banda Q(0,0) a 657 nm e a banda Q(1,0) a 722 nm.

O ϕ_F da 2-TQP foi calculado por comparação das áreas dos espectros de emissão, e aplicação da fórmula 3.4 (secção 3.1.3.6.1). O ϕ_F da 2-TQP em tolueno é de 0,0954.

4.1.3.2. Síntese assistida por tecnologia de microondas: ensaio preliminar

Como anteriormente mencionado, a aplicação de radiações de microondas na síntese porfirinas permite diminuir o tempo de reacção e simultaneamente minimizar a ocorrência de reacções secundárias [112-115]. Este fenómeno, que está associado à capacidade do solvente para absorver a energia microondas e a converter em calor [111], depende da concentração dos reagentes, da temperatura, que não deve exceder o ponto de ebulição do solvente, (ácido propiónico, 141 °C), e do tempo de reacção [113].

A síntese da 2-TQP por tecnologia microondas foi efectuada como descrito em 3.1.2.3.2, e as condições adoptadas foram seleccionadas com base nas especificações do equipamento e em protocolos descritos na literatura para a síntese de outras porfirinas [113,117]. O sólido obtido após 5 min de reacção a 120 °C foi dissolvido em DCM, e a presença da porfirina na mistura reaccional foi determinada por tlc (DCM/THF 9:1) e espectroscopia de UV/Vis (Figura 4.21).

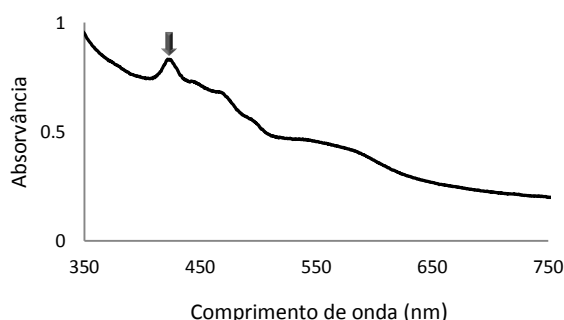


Figura 4.21. Espectro de absorção na região do UV/Vis obtido após a síntese da 2-TQP por tecnologia microondas.

Apesar da mancha de fluorescência vermelha não se encontrar visível no tlc, a presença da porfirina foi confirmada por espectroscopia de UV-vis, cujo espectro exibe a banda Soret a 423 nm. Contudo, e como esta era apenas uma reacção preliminar, não se efectuou a purificação da porfirina. No entanto, pretende-se futuramente explorar as potencialidades desta metodologia e otimizar as condições reaccionais, nomeadamente o tempo óptimo de reacção e a potência do reactor de microondas (300–1200 Watts). A extraordinária redução do tempo de reacção, além de proporcionar a diminuição dos produtos secundários e o aumento do rendimento da reacção, é uma mais-valia no incremento da produtividade e na redução do consumo de solventes.

4.1.4. 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina

Para a síntese da 4-TQP pelo método de Adler-Longo (secção 3.1.2.4) utilizaram-se as condições reaccionais supramencionadas para a síntese da 2-TQP. Decorridas 4 h a 140 °C, neutralizou-se o ácido propiónico com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. À semelhança do que tinha ocorrido para 2-TQP, após uma tentativa frustrada de purificação por cromatografia em coluna, efectuou-se a purificação da porfirina por cromatografia em placa preparativa, usando uma mistura de DCM e THF 9:1 como eluente. A realização de um tlc (THF) permitiu confirmar, devido à presença exclusiva da mancha de fluorescência vermelha característica das porfirinas (R_f (THF) = 0,56), a pureza da 4-TQP. Obtiveram-se 98 mg (η =15,1%) de um sólido de cor púrpura.

4.1.4.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis.

O espectro de absorção UV/Vis da 4-TQP em THF encontra-se representado na Figura 4.22.

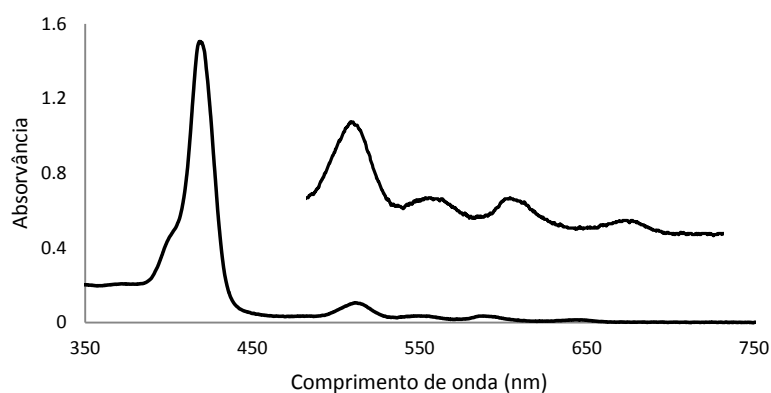


Figura 4.22. Espectro de absorção UV/Vis da 4-TQP em THF, obtido após purificação por cromatografia em placa.

A 4-TQP é uma porfirina na forma de base livre, que apresenta um espectro de absorção do tipo *etio*. A análise do espectro obtido indica que a banda Soret surge a 419 nm, e que as quatro bandas Q surgem, em sentido decrescente de intensidade, a 512; 549; 588 e a 643,5 nm.

4.1.4.2. Caracterização por HPLC-MS

A solução de 4-TQP em THF para análise foi preparada e analisada com base nos parâmetros de aquisição especificados na secção 3.1.3.3 (Tabela 3.4).

O cromatograma de HPLC obtido (Figura 4.23) apresenta um pico de pequena intensidade para um tempo de retenção de 6,70 min, e um pico com um ombro, de maior intensidade, entre 12,0 e 14,0 min.

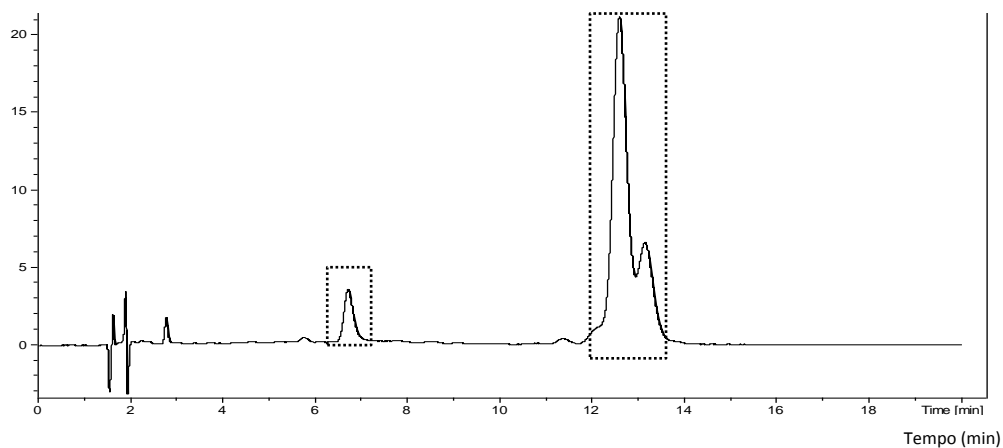


Figura 4.23. Cromatograma de HPLC da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina.

Após a separação cromatográfica, os picos presentes no cromatograma de HPLC foram analisados por espectrometria de massa (Figura 4.24).

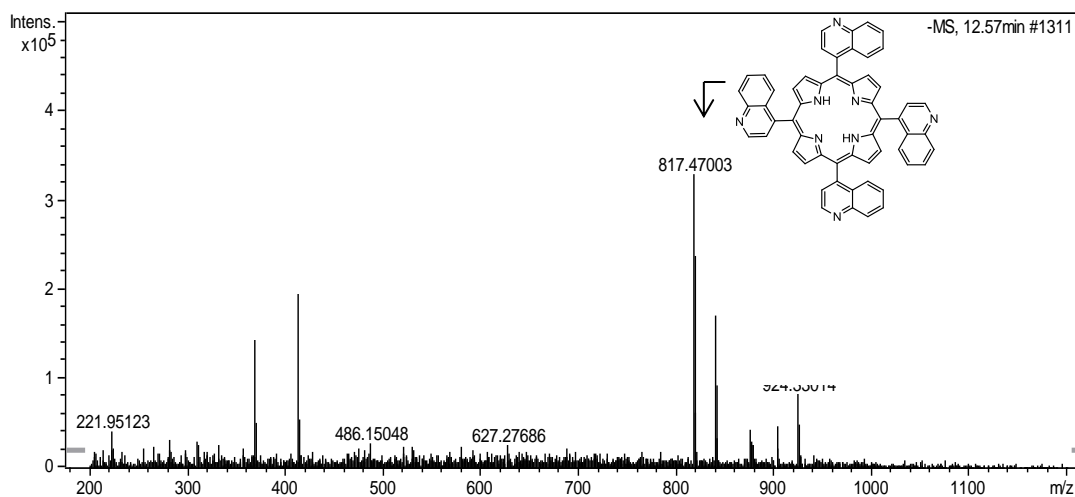


Figura 4.24. (a) Espectro ESI-MS correspondente ao pico obtido no cromatograma de HPLC para um tempo de retenção de 12,57 min.

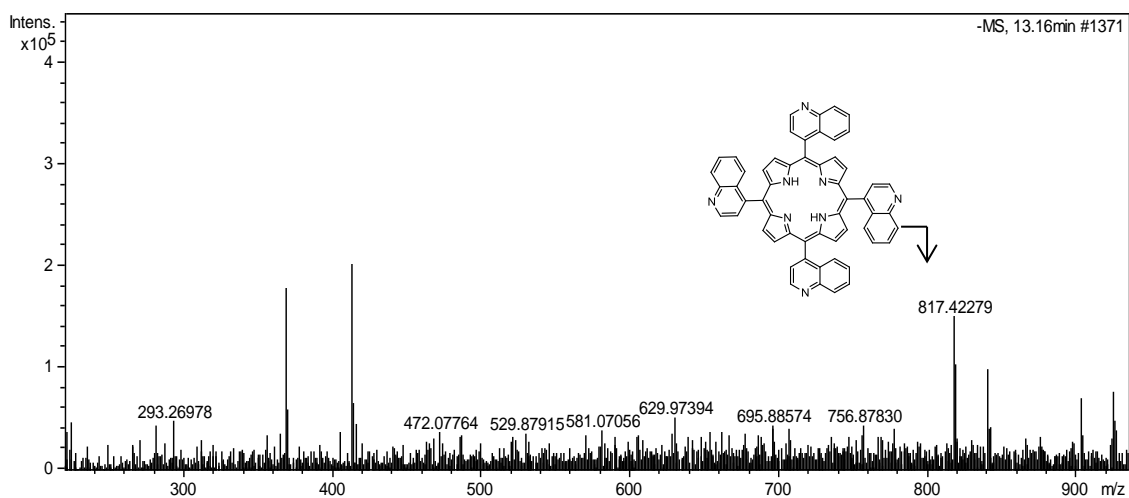


Figura 4.24. (b) Espectro ESI-MS correspondente ao pico obtido no cromatograma de HPLC para um tempo de retenção de 13,16 min.

A presença do ião molecular $[M-H]^-$ para uma razão m/z de 817,47 permitiu confirmar a identidade da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina ($C_{56}H_{34}N_8$). Com base no tempo de retenção é possível afirmar que esta porfirina foi eluída da coluna cromatográfica por uma mistura constituída por 90% de acetonitrilo e 10% de água ultra-pura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. A análise por espectrometria de massa comprova que o pico e o “ombro” que surgem a 12,57 min e a 13,16 min, respectivamente, correspondem à porfirina pretendida. É plausível que estes picos correspondam à porfirina e ao seu dicatião.

Não obstante a presença do pico correspondente à 4-TQP, o cromatograma de HPLC exhibe um pico adicional a 6,7 min. Esta situação, comum em misturas de compostos, leva-nos a supor que esta porfirina ainda possa estar contaminada por subprodutos formados durante a reacção de síntese, apesar de estes não serem visíveis no tlc. A análise deste pico por espectrometria de massa revelou a presença de um composto com uma razão m/z 917.3, cuja estrutura correspondente ainda não foi identificada.

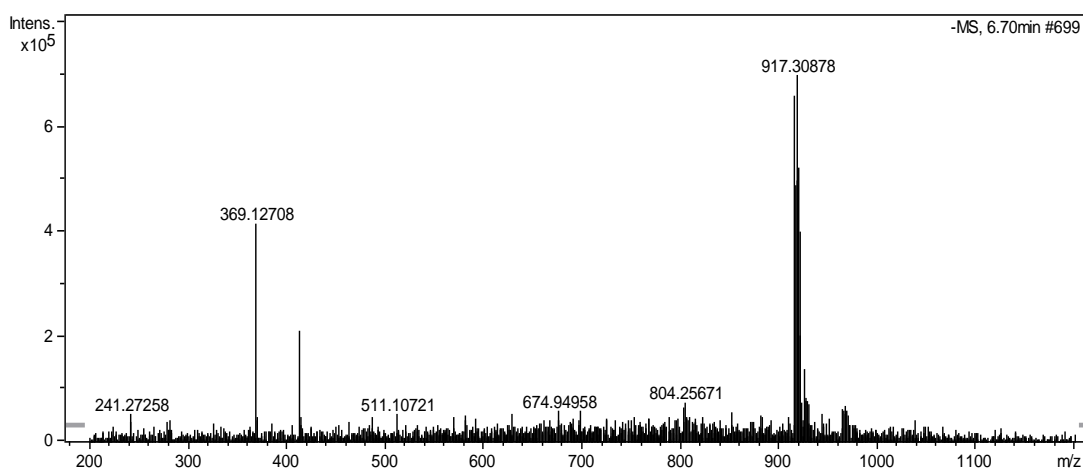


Figura 4.24. (b) Espectro ESI-MS em modo negativo, correspondente ao pico obtido do cromatograma de HPLC para um tempo de retenção de 6,70 min.

4.1.4.3. Caracterização por 1H RMN

O espectro 1H RMN da 5,10,15,20-tetraquis(quinolina-4-il)porfirina, adquirido em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), não evidencia os sinais de ressonância correspondentes aos prótons β -pirrólicos e NH , característicos das porfirinas. No entanto, são evidentes alguns dos sinais relativos aos solventes utilizados no processo de purificação (THF, DCM). Esta técnica é sensível ao número de núcleos activos. Logo, este resultado pode ser atribuído à baixa quantidade de porfirina utilizada na aquisição do espectro, a qual é responsável pela diminuição da razão sinal/ruído.

Ainda que a identidade da 4-TQP tenha sido confirmada por espectrometria de massa, pretende-se readquirir o espectro 1H RMN desta porfirina, assim que seja possível repetir a sua síntese para obter maiores quantidades de produto.

4.1.5. 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina

A funcionalização de porfirinas com grupos carboxílicos é uma estratégia de grande interesse biológico. Com efeito, este grupo funcional, presente em várias porfirinas de origem natural como a protoporfirina IX, confere-lhes um carácter anfifílico que favorece a sua captação pelas células

cancerígenas [219]. Algumas publicações recentes dão conta da aplicação da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina como marcador de células cancerígenas por imagiologia de fluorescência, e como fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica [219-222].

O protocolo utilizado na síntese da TCPP seguiu os fundamentos da metodologia de Adler-Longo. Porém, em vez do tradicional método de purificação com recurso a sucessivas cromatografias em coluna ou em placa preparativa, utilizou-se um método otimizado no nosso grupo de investigação. Este método é significativamente mais rápido e permite obter a porfirina pura (livre da clorina correspondente) com um rendimento bastante apreciável. Obtiveram-se 2182 mg ($\eta=33,2\%$) de um sólido de cor púrpura.

4.1.5.1. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis.

O espectro de absorção UV/Vis da TCPP em THF encontra-se representado na Figura 4.25.

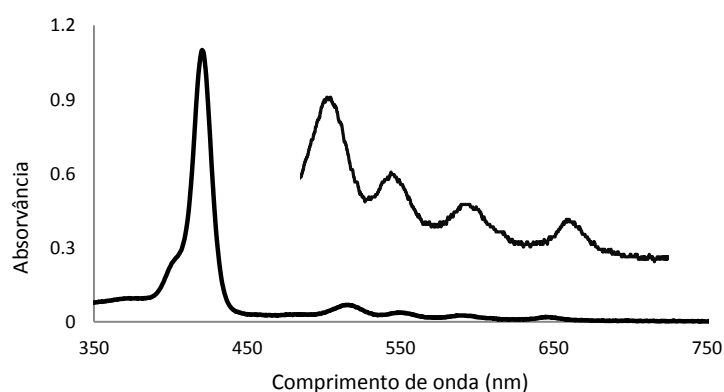


Figura 4.25. Espectro de absorção UV/Vis da TCPP em THF.

A TCPP é uma porfirina que, enquanto na forma de base livre, apresenta um espectro de absorção do tipo *etio*. Os coeficientes de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$) foram determinados por aplicação directa da lei de Beer-Lambert, a partir de soluções de TCPP em THF com concentrações a variar de 10^{-5} a 10^{-6} M (Figura 4.26). Esta porfirina apresenta uma banda Soret a 420,5 nm ($3.11E+05$, R^2 0,999), e quatro bandas Q a 516 ($1.91E+04$, R^2 1,000); 549 ($1.05E+04$, R^2 0,999); 589 ($7.39E+03$, R^2 0,999) e a 645,5 ($5.47E+03$, R^2 0,999) nm, em sentido decrescente de intensidade.

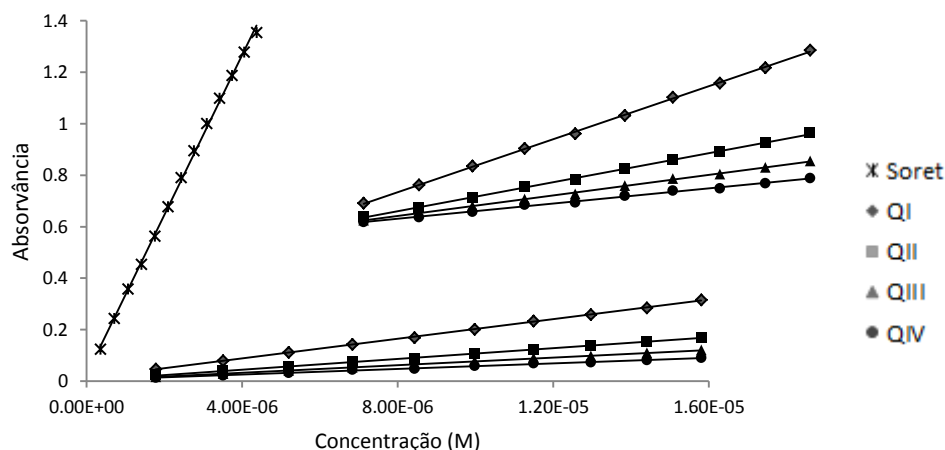


Figura 4.26. Determinação dos coeficientes de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$) das bandas Soret e Q da TCPP em THF, por aplicação directa da lei de Beer-Lambert.

4.1.5.2. Caracterização por HPLC-MS

A solução de TCPP em THF para análise foi preparada e analisada com base nos parâmetros de aquisição especificados na secção 3.1.3.3 (Tabela 3.4). Após a separação cromatográfica, os picos presentes no cromatograma de HPLC (Figura 4.27) foram caracterizados por espectrometria de massa. A presença de um único pico cromatográfico demonstra o elevado grau de pureza desta porfirina.

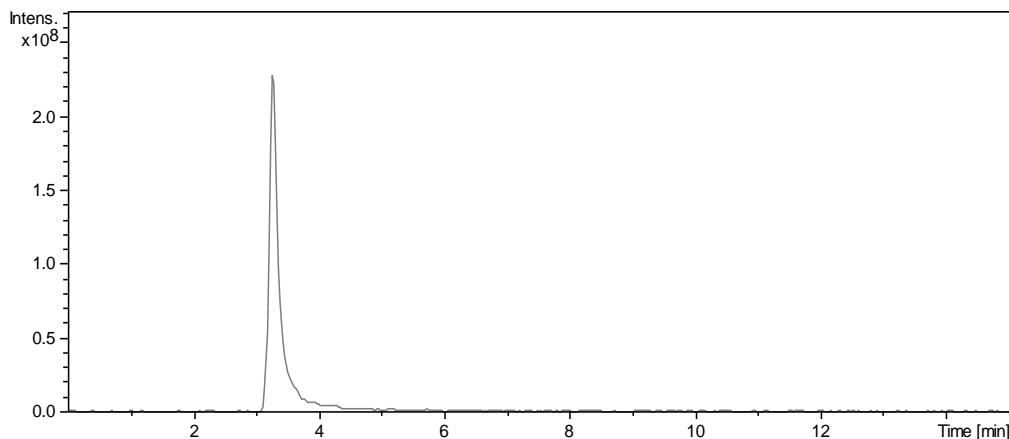


Figura 4.27. Cromatograma de HPLC da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina, que atesta o seu elevado grau de pureza.

Após a obtenção do cromatograma de HPLC, a identidade da TCPP ($C_{48}H_{30}N_4O_8$, $790,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) foi confirmada por espectrometria de massa. O espectro ESI-MS (Figura 4.28) obtido evidencia a presença do ião molecular $[M+H]^+$ correspondente à TCPP, para uma razão m/z de 791,2.

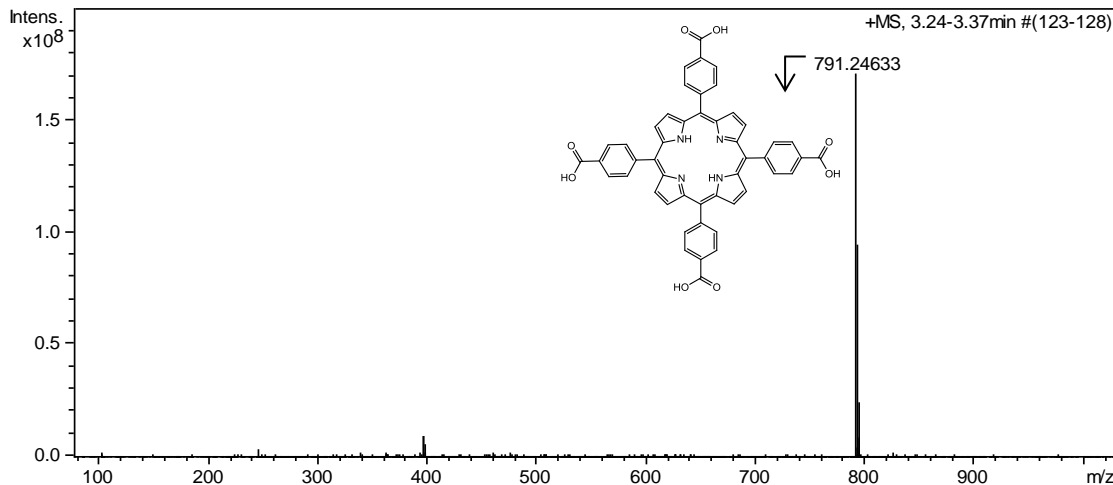
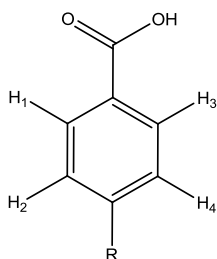


Figura 4.28. Espectro ESI-MS da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina.

Estes resultados corroboram a identidade e o grau de pureza desta porfirina. A TCPP foi eluída da coluna cromatográfica após um tempo de retenção de 3,24 min, por uma mistura constituída por 40% de água ultra-pura com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 60% de acetonitrilo. Como já referido, o tempo de retenção permite inferir a polaridade do composto em estudo. Por conseguinte, ao comparar os tempos de retenção da TCPP, 2-TQP e 4-TQP, é possível afirmar que a TCPP é a porfirina mais polar. Com efeito, esta porfirina possui grupos carboxílicos que lhe conferem uma maior solubilidade em meios aquosos e na fase móvel utilizada na eluição.

4.1.5.3. Caracterização por 1H RMN

O espectro 1H RMN da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina (Figura 4.29) foi adquirido numa mistura de DMF-d7 com $CDCl_3$. Devido à baixa solubilidade desta porfirina em $CDCl_3$, houve a necessidade de a solubilizar em DMF-d7. O espectro obtido apresenta os desvios químicos característicos das porfirinas: o sinal de ressonância dos prótons NH surge a δ - 2,80 ppm, enquanto o sinal de ressonância dos 8 prótons β -pirrólicos surge a δ 8,89 ppm.



Esta porfirina é simétrica, o que significa que os quatro grupos substituintes (4-carboxi) presentes nas posições *meso* são equivalentes. Os prótons H_1 e H_3 acoplam com os prótons H_2 e H_4 , respectivamente. No entanto, estes prótons são equivalentes e o seu sinal surge como um duplo dubleto (dd) a 8,40 ppm.

O sinal de ressonância dos prótons carboxílicos posiciona-se tipicamente entre os 10 e os 13 ppm. Porém, estes prótons são lábeis e podem permutar rapidamente com outros prótons, nomeadamente com os prótons da água [214]. No espectro obtido, o sinal destes prótons surge na forma de um sinal singleto alargado entre 3 e 4 ppm.

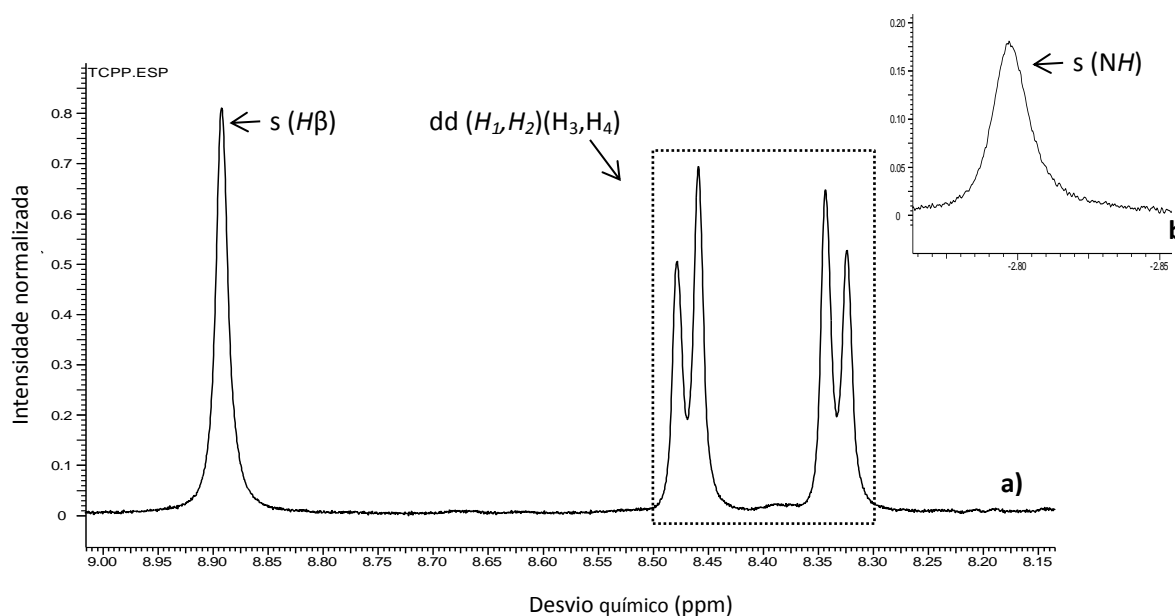


Figura 4.29. Espectro de 1H RMN da 5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina em DMF-d7 e $CDCl_3$, evidenciando os detalhes da região aromática (a) e da região correspondente aos prótons internos NH (b).

5,10,15,20-tetraquis(4-carboxifenil)porfirina 1H RMN ($CDCl_3/DMF-d_7$, 400 MHz): δ -2,80 ppm (s, 2H, NH); δ 8,40 ppm (dd, 16H, 4-carboxi.); δ 8,89 ppm (s, 8H, $H\beta$ -pirrol).

4.1.5.4. Rendimento quântico de oxigénio singleto

A fosforescência do oxigénio singleto foi detectada a 1270 nm, como descrito em 3.1.3.5.2.

A razão entre os declives, intensidade do sinal de emissão de 1O_2 em função das diferentes intensidades do laser, obtidos para a TCPP e para a fenalenona (Figura 4.30) permitiu determinar o Φ_Δ da TCPP [145,198].

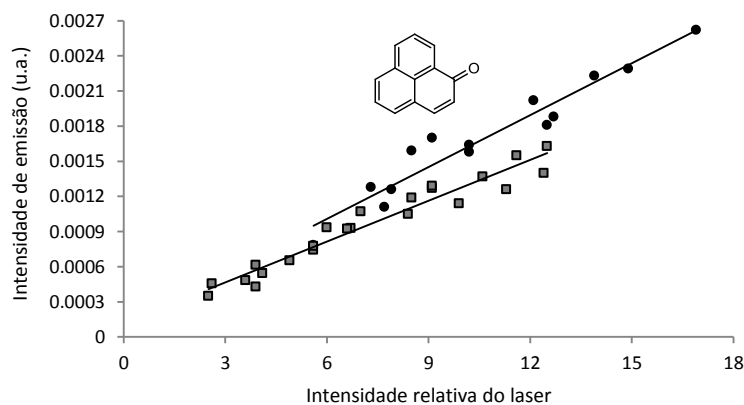


Figura 4.30. Emissão do oxigénio singleto a 1270 nm em função da intensidade relativa do laser para soluções de (●) Fenalenona e (□) TCPP em THF. $y = 1,47 \times 10^{-4} x + 1,25 \times 10^{-4}$ ($R^2 = 0,933$) corresponde à equação da recta obtida para a fenalenona e $y = 1,16 \times 10^{-4} x + 1,18 \times 10^{-4}$ ($R^2 = 0,942$) à equação da recta obtida para a TCPP.

O ϕ_{Δ} da TCPP em THF é de 0,75. Com efeito, o ϕ_{Δ} estabelecido na literatura para esta porfirina varia de 0,7 a 0,9, dependendo do solvente utilizado na determinação ^[76].

Das porfirinas em estudo nesta dissertação, a TCPP alia a presença de grupos carboxilo, que lhe conferem um carácter anfífilo, a um valor de ϕ_{Δ} elevado. Com base nestes resultados é previsível que esta porfirina represente um potencial agente terapêutico. No entanto, é fundamental ter em consideração a dependência do ϕ_{Δ} e do τ_{Δ} com o solvente. Na verdade, o τ_{Δ} em meios aquosos como os que são utilizados nos ensaios biológicos é consideravelmente inferior ao valor de τ_{Δ} obtido em solventes orgânicos. Este aspecto limita não só a capacidade de detecção do oxigénio singleto, e por conseguinte o valor de ϕ_{Δ} , mas também diminui o raio de difusão desta ROS ^[196,197].

4.1.6. Síntese e caracterização de porfirinas: principais conclusões

A importância das porfirinas em Terapia Fotodinâmica, consideradas sensibilizadoras do tipo II, advém das propriedades químicas e fotofísica que estas apresentam, nomeadamente dos elevados coeficientes de absorção na designada “Janela Terapêutica”, e da capacidade para gerar eficazmente oxigénio singlete^[57,73]. É fundamental que estas apresentem uma estrutura química bem definida e que a sua síntese seja fácil e reproduzível. Com base neste último critério, a H₂TCP foi excluída dos ensaios biológicos.

A Tabela 4.1 resume as principais características das porfirinas sintetizadas e purificadas no decurso desta dissertação.

Tabela 4.1. Propriedades fotofísica das porfirinas sintetizadas e purificadas no decurso desta dissertação.

Porfirina	Absorção: $\lambda_{\text{máx}}$ (nm), ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^a					Fluorescência: $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ^b			ϕ_{Δ} ^c
	B	Q _{IV}	Q _{III}	Q _{II}	Q _I	Q(0,0)	Q(1,0)	ϕ_F	
TPP	417,0	513,5	548,5	591,5	649,0	653	720	0,110 ^[138]	0,67 ^[140]
H ₂ TCP	417,0	515,5	552,5	591,5	651,5	658	722	0,092	0,35
2-TQP	422,5	515,5	552,0	590,0	648,0	657	722	0,095	0,62
	1.24E+05	9.82E+03	4.54E+03	3.39E+03	1.85E+03				
4-TQP	419,0	512,0	549,5	588,0	643,5	-	-	-	-
TCPP	420,5	516,0	549,0	589,0	645,5	649	716	0,09 ^[76]	0,75
	3.11E+05	1.91E+04	1.05E+04	7.39E+03	5.47E+03				

(a) Os coeficientes de extinção molar foram determinados a partir de soluções de porfirina em THF, com concentrações de 10^{-5} a 10^{-6} M.

(b) Os espectros de emissão de fluorescência e o ϕ_F foram obtidos em tolueno, como descrito em 3.1.3.6.1.

(c) ϕ_{Δ} das porfirinas H₂TCP, 2-TQP e TCP foi obtido em THF, como descrito em 3.1.3.6.2.

Pela análise da Tabela 4.1 verifica-se que todas as porfirinas apresentam rendimentos quânticos de fluorescência bastante reduzidos. Este resultado indica que a fluorescência não é a principal via de relaxação pela qual a porfirina retorna ao estado fundamental após a sua activação pela luz e transição para o estado excitado singlete. Por conseguinte, este decaimento pode ocorrer por vias não-radiativas (*e.g.*, fosforescência) ou por conversão intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$)^[139,140,145]. Com base na lei fotofísica descrita na secção 3.1.3.6.1, baixos ϕ_F estão geralmente associados a bons fotossensibilizadores para PDT. Por sua vez, elevados ϕ_F são um requisito fundamental para a utilização de um composto em fotodiagnóstico. Quando a porfirina no estado excitado singlete (S_1) sofre conversão intersistemas e passa ao estado excitado tripleto (T_1), pode transferir a sua energia para o oxigénio no estado fundamental tripleto (3O_2) e gerar oxigénio singlete (1O_2). A eficácia com que o (1O_2) é gerado é quantificada pelo rendimento quântico^[145]. A maioria dos FS aprovados para PDT apresentam rendimentos quânticos de oxigénio singlete compreendidos entre 0,3 e 0,6. Deste modo, todos os ϕ_{Δ} obtidos empiricamente são significativos, em especial o da TCPP. O ϕ_{Δ} permite antecipar a eficácia de um fotossensibilizador, na medida em que o (1O_2) é um dos principais responsáveis pela oxidação de biomoléculas fundamentais, que culmina no dano e morte das células cancerígenas. Ainda assim, a acção desta ROS é condicionada pelo seu tempo de vida e difusão intracelular^[73,76,225]. Consequentemente, a determinação da localização intracelular do FS é essencial na elucidação do mecanismo subjacente à destruição das células tumorais. Esta determinação tira partido da energia que o sensibilizador liberta com emissão de fluorescência, sendo geralmente efectuada por microscopia de fluorescência^[196].

4.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

A aprovação clínica do Photofrin® como fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica, despertou o interesse pela síntese de novas porfirinas para uso clínico em PDT ^[119,216]. Efectivamente, estes compostos apresentam propriedades químicas e fotofísica que lhes conferem uma especial relevância no fotodiagnóstico e fototerapia de doenças oncológicas e não-oncológicas ^[57,119].

Após a síntese e caracterização química e fotofísica, o potencial fotodinâmico das porfirinas 2-TQP e TCPP foi avaliado na linha celular HT29.

A determinação das condições experimentais mais favoráveis ao cumprimento dos objectivos estabelecidos, desde a selecção da linha celular e do veículo de adição dos compostos sintetizados, aos métodos mais adequados à determinação da viabilidade celular, é fundamental para a obtenção de resultados fidedignos e inequívocos. De igual modo, também o conhecimento das características das células, nomeadamente da curva de crescimento e do seu tempo de duplicação em cultura, é de grande relevância na rotina da subcultura ^[147,157]. Ainda que este parâmetro não tenha sido determinado no contexto da presente dissertação, estudos previamente realizados no nosso grupo de investigação indicaram que as células HT29 duplicam em 24 h e permanecem em crescimento exponencial até pelo menos 72 h ^[138].

A solubilidade do fotossensibilizador no veículo de adição e no meio de cultura celular condiciona todos os procedimentos subsequentes. Assim, é impreterível proceder à realização prévia de ensaios de solubilidade (3.2.8). A solubilidade das porfirinas foi inicialmente testada em PBS. Apesar de ambas terem precipitado, verificou-se que a TCPP era mais solúvel que a 2-TQP. Com efeito, enquanto a TCPP possui grupos carboxílicos na posição *para* do grupo fenil que lhe conferem um carácter anfifílico e uma solubilidade moderada em meios aquosos, a 2-TQP é uma porfirina hidrofóbica ^[218,227]. Nestas circunstâncias é usual recorrer a solventes orgânicos como o DMSO, a dimetilformamida (DMF) ou o etanol, que permitem uma melhor dissolução do composto em estudo ^[228]. Neste caso optou-se pelo DMSO, um solvente amplamente utilizado como veículo de adição de porfirinas a culturas de células ^[229]. Deste modo, após comprovar a solubilidade do DMSO no meio de cultura celular, avaliou-se a solubilidade das porfirinas neste veículo de transporte. Assim, enquanto a 2-TQP é apenas moderadamente solúvel em DMSO, o que limitou a concentração máxima da solução a 1 mg/mL, a TCPP é bastante solúvel e por isso foi possível preparar uma solução de concentração 4 mg/mL. Porém, e dada a citotoxicidade intrínseca do DMSO, é fundamental assegurar que a resposta celular observada se deve ao composto em estudo e não ao agente de transporte ^[228].

4.2.1. Avaliação da citotoxicidade do DMSO nas células HT29

A citotoxicidade do DMSO na linha celular HT29 foi avaliada pelo método do azul de tripano (Figura 4.31), como descrito 3.2.9.1, e pelo método do MTT (Figura 4.32), como descrito em 3.2.9.2. Para o efeito, decorridas 24 h da preparação das culturas adicionaram-se diferentes volumes de DMSO, de forma a obter as concentrações finais desejadas. Estas culturas foram preparadas em paralelo com culturas controlo, às quais não se adicionou DMSO. A viabilidade celular foi determinada após um período de incubação de 48 h.

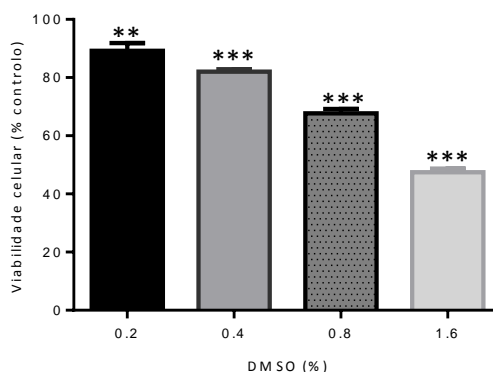


Figura 4.31. Efeito citotóxico induzido por diferentes percentagens de DMSO (0,2–1,6%) na linha celular HT29, determinado pelo método do azul de tripano. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=4). *ns* P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas controlo não expostas ao DMSO, após ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

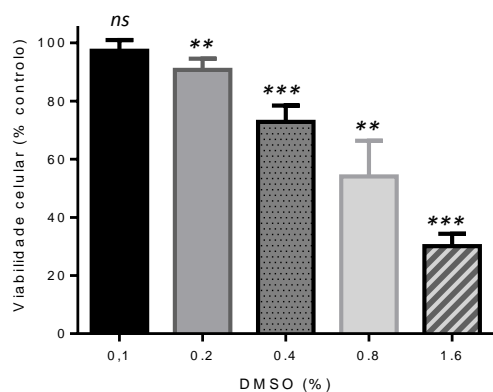


Figura 4.32. Efeito citotóxico induzido por diferentes percentagens de DMSO (0,1–1,6%) na linha celular HT29, determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=7). *ns* P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas controlo não submetidas a qualquer tratamento, após ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

Com base nos resultados acima referidos foi possível determinar as rectas de regressão que melhor se ajustam aos valores obtidos experimentalmente (Figura 4.33).

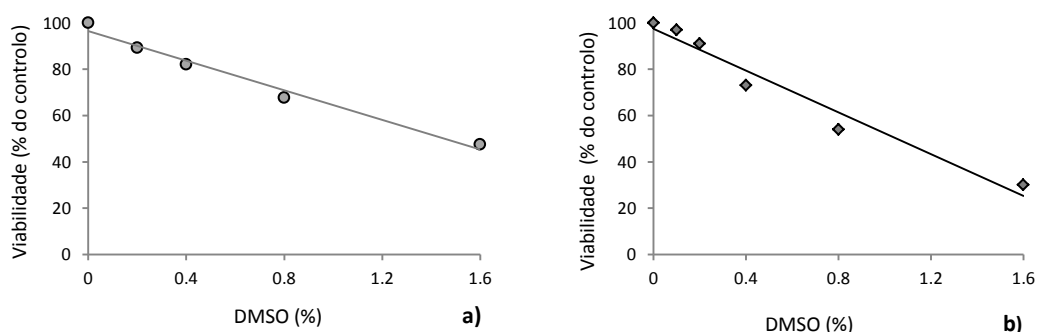


Figura 4.33. Inibição do crescimento celular induzido por diferentes percentagens de DMSO no meio de cultura determinado (a) pelo método do azul de tripano e (b) pelo método do MTT. Os valores obtidos pelo método do azul de tripano são perfeitamente correlacionados por uma recta de regressão linear de equação $y = -31,93x + 96,43$ ($R^2=0,98$), enquanto os valores obtidos pelo método do MTT são correlacionados por uma recta de equação $y = -45,13x + 97,49$ ($R^2=0,96$).

Com base nas rectas de regressão foi possível determinar a percentagem de DMSO que inibe o crescimento das células HT29 em 50% (IC₅₀). Assim, enquanto o valor de IC₅₀ obtido pelo método do azul de tripano foi de 1,45%, o valor obtido pelo método do MTT foi de 1,05%. O facto de o IC₅₀ obtido pelo método do azul de tripano ser ligeiramente superior ao valor do IC₅₀ obtido pelo método do MTT pode ser facilmente compreendido com base nas diferenças entre ambos os métodos. Assim, enquanto o método do MTT, mais sensível, contabiliza as células metabolicamente activas, o método do azul de tripano contabiliza as células cuja membrana se encontra intacta, mas não necessariamente metabolicamente activas. Por consequência, o método do azul de tripano pode sobreavaliar o número de células viáveis, o que se traduz por um valor de IC₅₀ superior.

Com base nos resultados obtidos definiu-se que a concentração final de DMSO a adicionar culturas não deveria exceder os 0,5% (v/v). Esta percentagem já induz uma diminuição considerável da viabilidade celular (≈ 25%). No entanto, atendendo à solubilidade limitada da 2-TQP, só o aumento da percentagem de DMSO permitiria a administração de doses mais expressivas de porfirina nas culturas. Foi neste contexto que surgiu a ideia de utilizar o DCM como veículo de adição.

4.2.2. Avaliação da citotoxicidade do DCM nas células HT29

A citotoxicidade do DCM na linha celular HT29 foi avaliada pelo método do MTT (Figura 4.34), como descrito em 3.2.9.3. 24 h após a preparação das culturas adicionaram-se diferentes volumes de DCM, de modo a obter a concentração final pretendida. As culturas controlo, nas quais não se adicionou DCM, foram preparadas em simultâneo. A viabilidade celular foi determinada depois de um período de incubação de 48 h.

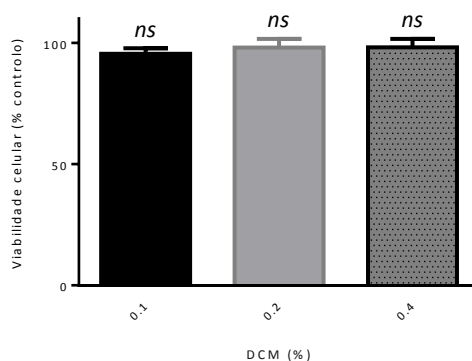


Figura 4.34. Efeito citotóxico induzido por diferentes percentagens de DCM (0,1–0,4%) na linha celular HT29, determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média ± desvio padrão, (n=3). *ns* P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas controlo não expostas ao DCM, após ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

Ao analisar o gráfico obtido deduziu-se que o DCM não era citotóxico. Curiosamente, não só não se observou uma diminuição da viabilidade celular, como, pelo contrário, se verificou um aumento subtil. Este curioso efeito pode estar relacionado com a imiscibilidade do DCM em soluções aquosas. Todavia, apesar da aparente ausência de citotoxicidade, este solvente é mutagénico e pode dar origem a alterações das características das células em cultura. Por consequência, a intenção de utilizar o DCM como veículo de transporte foi rejeitada. Por sua vez, e apesar de algumas limitações, o DMSO é o agente de transporte mais indicado para a adição das porfirinas nas culturas celulares.

4.2.3. Avaliação da citotoxicidade induzida pela 2-TQP e TCPP nas culturas de células HT29

Um dos requisitos fundamentais no *design* de um fotossensibilizador ideal é a inocuidade na ausência de luz ^[73]. Por conseguinte, é fundamental avaliar o efeito destes compostos *per se*, previamente à sua activação pela luz.

A citotoxicidade das porfirinas nas culturas de células HT29 foi avaliada pelo método do MTT, tal como descrito em 3.2.9.4.

4.2.3.1. Citotoxicidade intrínseca à 2-TQP

Devido à solubilidade limitada da 2-TQP em DMSO, apenas foi possível preparar uma solução de concentração 1 mg/mL. Adicionalmente, a percentagem máxima de DMSO na célula não deveria exceder 0,5% (v/v). Estas restrições limitaram a concentração máxima de porfirina a administrar às culturas. As concentrações seleccionadas para os ensaios de citotoxicidade foram de 2,5 e 5 µg/mL. Sucintamente, 24 h após a preparação das culturas adicionaram-se os volumes de solução de 2-TQP em DMSO correspondentes às concentrações de porfirina acima referidas. As culturas controlo, nas quais se adicionou exclusivamente 0,5% (v/v) de DMSO, foram preparadas em paralelo. Ainda que os ensaios de solubilidade tenham indicado que a solução de 2-TQP em DMSO era solúvel no meio de cultura, a observação das culturas a um microscópio óptico sugere a formação de agregados (Figura 4.35).

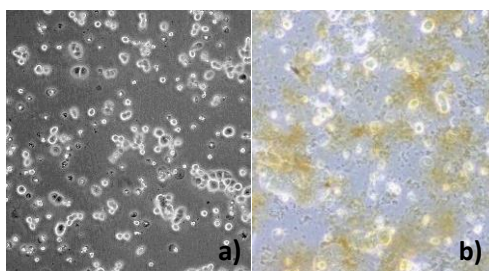


Figura 4.35. Fotografias da cultura de células HT29 obtidas com uma ampliação de 100× antes (a) e após (b) a adição da solução de 2-TQP em DMSO 0,5% (v/v).

Este fenómeno, já previsível com base na natureza hidrofóbica desta porfirina, pode condicionar o sucesso do tratamento fotodinâmico ^[76,226]. Efectivamente, a estrutura e o carácter hidrofóbico/hidrofílico de um FS influenciam não só a sua localização intracelular, mas também as suas propriedades fotofísicas, em especial a capacidade de gerar oxigénio singleto. De modo geral, enquanto os pequenos agregados ainda conseguem atravessar a membrana plasmática, os agregados de maiores dimensões podem ser internalizados por endocitose ^[62]. A determinação da localização exacta do FS é essencial para a compreensão dos eventos envolvidos na destruição tumoral, uma vez que o tempo de vida e a difusão intracelular do ¹O₂ são tão diminutos, que o seu efeito se restringe às imediações do fotossensibilizador. A tendência que um determinado FS apresenta para agregar em soluções aquosas não é motivo para o excluir das práticas clínicas, uma vez que actualmente existem diversas estratégias que permitem transportar e direccionar estes FS para as células tumorais ^[62,230]. Um bom exemplo é o Photofrin® que, apesar de ser constituído por dímeros e oligómeros e apresentar uma grande tendência para agregar, representa um dos FS mais utilizados nas práticas clínicas ^[59,86].

Após a adição da solução de 2-TQP em DMSO incubaram-se as culturas no escuro. Decorridas 48 h efectuou-se a determinação da viabilidade celular pelo método do MTT. Os resultados obtidos estão representados no gráfico da Figura 3.36.

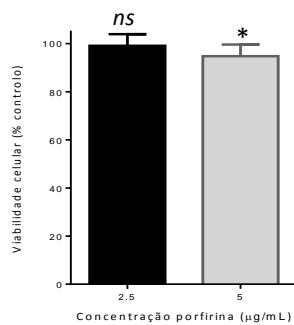


Figura 4.36. Efeito citotóxico induzido por diferentes concentrações de 2-TQP na linha celular HT29, determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=9). *ns* $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,0001$, quando comparado com as culturas controle às quais se adicionou unicamente 0,5% (v/v) de DMSO, após ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

Ao analisar o gráfico obtido verifica-se que a adição de 2,5 µg/mL da solução de 2-TQP em DMSO não promove alterações significativas da viabilidade. Por sua vez, a adição de 5 µg/mL promove uma ligeira diminuição da viabilidade que, apesar de mínima ($\approx 5\%$), é estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Em ambos os casos, a viabilidade celular é superior a 94%. Nestas condições experimentais, o valor de IC_{50} é consideravelmente superior à concentração máxima de porfirina administrada, o que nos permite concluir que, nestas condições, a toxicidade intrínseca à 2-TQP é desprezável.

4.2.3.2. Citotoxicidade intrínseca à TCPP

Em 2009, Hu ^[230] estudou a fototoxicidade da TCPP livre e complexada em nanopartículas, e demonstrou que esta era eficazmente captada por células cancerígenas do cólon SW480 e HT29. Todavia, Hu também verificou que esta porfirina livre apresentava uma grande tendência para formar agregados em meios aquosos ^[230]. Felizmente, nos estudos descritos nesta dissertação não se observou esta predisposição.

Para a determinação da citotoxicidade intrínseca da TCPP nas culturas de células HT29 utilizaram-se duas soluções de concentrações distintas: uma solução 1 mg/mL, que foi diluída de modo a que se obtivessem as concentrações finais 2,5 e 5 µg/mL no meio de cultura celular; e uma solução 4 mg/mL, diluída até à obtenção das concentrações finais 10 e 20 µg/mL. 48 h após a adição da solução de porfirina determinou-se a viabilidade celular pelo método do MTT. Os resultados obtidos estão representados no gráfico da Figura 3.37.

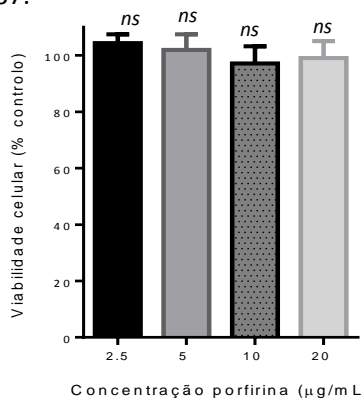


Figura 4.37. Efeito citotóxico induzido por diferentes concentrações de TCPP na linha celular HT29, determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=6). *ns* $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,0001$, quando comparado com as culturas controle às quais se adicionou apenas 0,5% (v/v) de DMSO, após *one-way* ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

O aumento da concentração de TCPP não promove alterações significativas na viabilidade celular, sendo inclusive superior a 100% para as concentrações 2,5 e 5 µg/mL. Curiosamente, o aumento da concentração de porfirina de 10 para 20 µg/mL induz um ligeiro aumento da viabilidade. Este efeito pode estar associado à formação de agregados que dificultem a captação da porfirina, ou ao facto de as células atingirem um ponto de saturação. A existência do ponto de saturação na captação de TCPP pelas células cancerígenas foi referida por Hu, e depende da concentração de porfirina administrada ^[230].

Do conjunto de resultados acima apresentados pode concluir-se que a 2-TQP apresenta, para as mesmas gamas de concentração, uma toxicidade intrínseca superior à da TCPP. Porém, o efeito citotóxico de ambas as porfirinas na ausência de luz não é estatisticamente significativo ($P > 0,05$). Assim, como ambas as porfirinas cumprem este requisito fundamental, o passo seguinte consistiu na avaliação do efeito que estas exercem nas células cancerígenas após activadas com luz visível de comprimento de onda adequado.

4.2.4. Avaliação da fototoxicidade induzida pela 2-TQP e TCPP nas culturas de células HT29

O efeito fotodinâmico induzido pela 2-TQP e pela TCPP em culturas de células HT29 foi determinado em conformidade com o procedimento descrito em 3.2.11. Previamente à irradiação das culturas, o meio de cultura com a porfirina é substituído por PBS. Isto porque, alguns dos componentes presentes no meio de cultura, nomeadamente o vermelho de fenol utilizado como indicador de pH e a riboflavina absorvem na região visível do espectro electromagnético, podendo influenciar o efeito da porfirina. Estudos com células comprovam que a irradiação da riboflavina gera espécies reactivas de oxigénio, em particular oxigénio singlete e peróxido de hidrogénio, capazes de inibir a proliferação celular, possivelmente através da indução da morte celular mediada por caspases ^[231-233]. Por sua vez, o vermelho de fenol exerce um efeito antagonista sob a riboflavina, e inibe a sua capacidade para desencadear a morte das células. Por conseguinte, a irradiação das culturas em PBS exclui a contribuição destes fenómenos e, por conseguinte, elimina possíveis ambiguidades na interpretação dos resultados ^[234]. Porém, verificou-se que as culturas não-irradiadas apresentavam sinais evidentes lise celular após permanência em PBS durante 30 minutos. Ao eliminar o factor irradiação colocou-se a hipótese deste efeito ser mediado pela privação de nutrientes. De facto, a adição D-glucose (na mesma molaridade em que está presente no meio de cultura) ao PBS suprimiu o efeito acima descrito.

Decorridas 24 h da adição das soluções de porfirina, as culturas foram irradiadas com recurso a um projector de slides, equipado com uma lâmpada de 150 W^a e um filtro de radiação. Na descrição experimental apenas foi referida a utilização de um filtro *long-pass*^b OG₅₇₀, caracterizado por bloquear a passagem da radiação de comprimento de onda inferior a 570 nm. No entanto, também se realizaram experiências de fototoxicidade na presença dos filtros RG₆₃₀ e RG₆₁₀, e na ausência dos filtros de radiação.

A intensidade da luz incidente nas culturas celulares, medida com um *power meter* Coherent 212, está intimamente dependente do tipo de filtro utilizado. Assim, enquanto a intensidade média da luz na presença do filtro RG₆₁₀ foi de 4,6 mW/cm², com o OG₅₇₀ foi de 6,3 mW/cm² e sem filtro foi de 10,8 mW/cm². As características ópticas dos filtros (transmitância em função do comprimento de onda), assim como a zona de interacção com o espectro das porfirinas, encontram-se representadas no Anexo III. A fluência da luz (W/cm²) e o tempo de irradiação são factores decisivos na eficácia do tratamento

^a O espectro de emissão da lâmpada HLX-64640 encontra-se representado no **Anexo II**.

^b http://www.schott.com/advanced_optics/english/products/filteroverviewdetail-longpass.html (acedido a 11 de Outubro de 2012)

fotodinâmico [72,198,235]. Nas subsecções que se seguem é analisada a influência dos diferentes filtros no sucesso do tratamento fotodinâmico.

4.2.4.1. Irradiação com o filtro RG₆₁₀

O filtro RG₆₁₀ bloqueia a passagem da radiação de comprimento de onda inferior a 610 nm. As culturas foram irradiadas (4,6 mW/cm²)^a em períodos 15 e 30 min, o que equivale a doses totais de luz de 4,14 e 8,28 J/cm².

Os gráficos das Figuras 4.38 e 4.39 elucidam a eficácia do tratamento fotodinâmico em função da dose de luz e da concentração de fotossensibilizador administrados às culturas.

Ao analisar o gráfico da Figura 4.38, correspondente à TCPP, verifica-se que a diminuição da viabilidade celular após irradiação das culturas, apesar de estatisticamente significativa, não é muito acentuada. Com efeito, a administração de 20 µg/mL de porfirina e irradiação das culturas com uma dose total de luz de 8,28 J/cm² (30 min) promove a diminuição de apenas 20% da viabilidade das células cancerígenas em cultura.

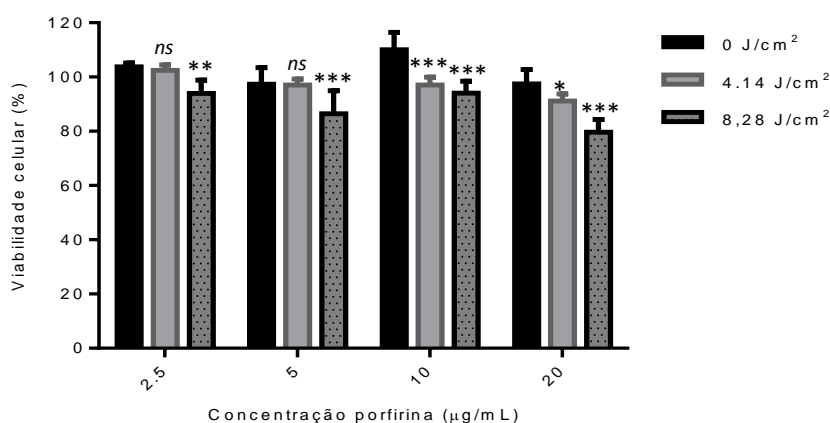


Figura 4.38. Efeito fotodinâmico da TCPP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação (RG₆₁₀) com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média ± desvio padrão, (n=5). ns P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm²), após *two-way*-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

A mesma interpretação é válida para a análise do gráfico da Figura 4.39 correspondente à 2-TQP, no qual a diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração da porfirina e da dose de luz são estatisticamente significativas mas manifestamente insuficientes em termos clínicos. A viabilidade celular determinada após administração de 5 µg/mL de porfirina e irradiação das culturas com uma dose total de luz de 8,28 J/cm² (30 min) foi de 76,85%. Clinicamente, esta percentagem indica que o tratamento foi insuficiente e não permitiria erradicar o tumor do paciente.

^a A conversão da intensidade energética de W/cm² para J/cm² foi efectuada por multiplicação da potência pelo tempo de irradiação em segundos.

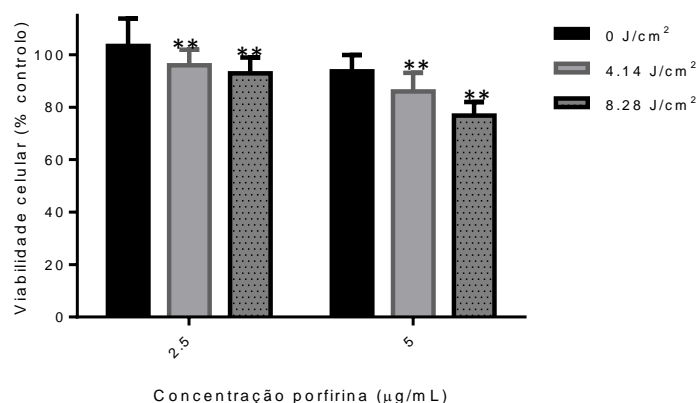


Figura 4.39. Efeito fotodinâmico da 2-TQP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação (RG₆₁₀) com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=5). ns P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm²), após *two-way*-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

Na tentativa de compreender o motivo pelo qual a diminuição da viabilidade celular é tão subtil, analisou-se o espectro do filtro e verificou-se que a sua transmitância máxima ocorre a 700 nm. Adicionalmente, os máximos de absorção das bandas Q_i da TCPP e da 2-TQP registam-se a 645,5 e a 648 nm. A conjugação destes dois aspectos sugere que o FS é activado de forma ineficaz, o que poderá justificar a baixa eficácia do tratamento fotodinâmico.

Na impossibilidade de aumentar a concentração de porfirina administrada, para que a percentagem de DMSO no meio não excedesse os 0,5% (v/v), tentou-se aumentar a eficácia do tratamento fotodinâmico através do aumento da dose de luz incidente nas culturas celulares.

4.2.4.2. Irradiação com o filtro O_{G570}

A substituição de um filtro RG₆₁₀ por um filtro OG₅₇₀ permitiu aumentar a potência energética incidente nas culturas, de 4,6 para 6,3 mW/cm². Adicionalmente, a transmitância máxima deste filtro ocorre a 640 nm, um comprimento de onda coincidente com os comprimentos máximos de absorção das bandas Q_i das porfirinas em análise (Tabela 4.1).

Os gráficos das Figuras 4.40 e 4.41 elucidam a eficácia do tratamento fotodinâmico em função da dose de luz e da concentração de fotossensibilizador administrados às culturas.

Ao analisar o gráfico da Figura 4.40 correspondente à TCPP, verifica-se que o aumento da concentração de porfirina, em associação com o aumento da dose de luz incidente nas culturas, promoveu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular. Assim, enquanto a administração de 5 µg/mL de porfirina e irradiação das culturas com uma dose total de luz de 11,4 J/cm² (30 min) conduziu a uma diminuição da viabilidade de aproximadamente 15% (85,9%), a adição de 20 µg/mL deu origem a uma diminuição de aproximadamente 35% (67,7%).

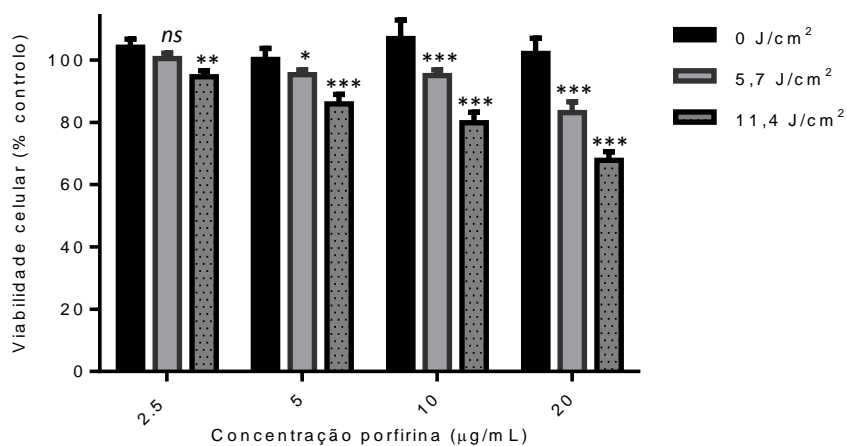


Figura 4.40. Efeito fotodinâmico da TCPP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação (OG₅₇₀) com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=6). *ns* P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm²), após *two-way*-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

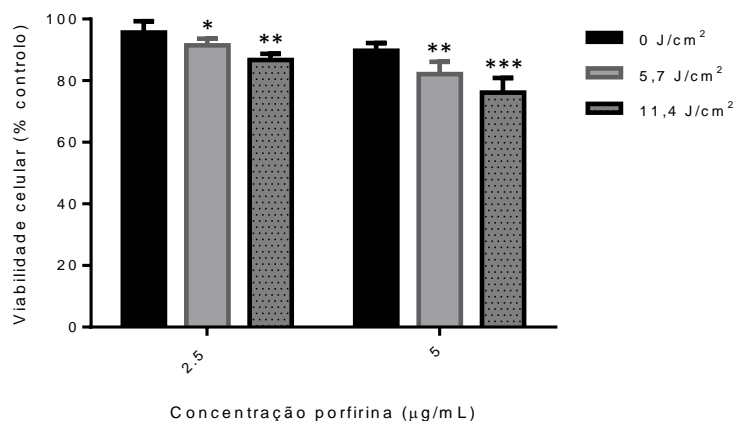


Figura 4.41. Efeito fotodinâmico da 2-TQP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação (OG₅₇₀) com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=6). *ns* P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm²), após *two-way*-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

O gráfico da Figura 4.41 representa a diminuição da viabilidade das células HT29, em função da concentração de 2-TQP e do aumento da dose de luz incidente nas culturas. A administração de 5 µg/mL de porfirina e irradiação das culturas com uma dose total de luz de 11,4 J/cm² (30 min) promoveu uma diminuição de aproximadamente 25% das células cancerígenas em cultura (76,2%).

Apesar de todas as condições avaliadas apresentarem significado estatístico, a diminuição da viabilidade é pouco relevante sob o ponto de vista clínico, não permitindo uma destruição eficaz das células cancerígenas.

4.2.4.3. Irradiação na ausência de filtros

Ao irradiar as culturas celulares na ausência de filtros foi possível compreender o modo como o filtro afecta a potência da luz que atinge as células e influencia o sucesso do tratamento fotodinâmico. Ao irradiar as culturas na ausência de filtros verificou-se um aumento da potência energética para $10,8 \text{ mW/cm}^2$. Em acréscimo, a ausência do filtro permite a irradiação das culturas com uma gama contínua de energia. Esta modalidade de irradiação permite uma activação mais eficiente do fotossensibilizador.

Os gráficos das Figuras 4.42 e 4.43 elucidam a eficácia do tratamento fotodinâmico em função da dose de luz e da concentração de fotossensibilizador administrados às culturas.

Ao analisar o gráfico da Figura 4.42 verifica-se uma diminuição muito significativa ($P < 0,0001$) da viabilidade celular em função do aumento da concentração de TCPP e da dose de luz incidente nas culturas. Este resultado vai ao encontro das conclusões formuladas por Pegaz *et al.* em 2005, que demonstrou que o dano celular provocado pela TCPP após o tratamento fotodinâmico é directamente proporcional ao aumento da dose de luz incidente nas culturas [238].

A administração de $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de porfirina e irradiação com uma dose total de luz de $19,4 \text{ J/cm}^2$ (30 min) promoveu uma diminuição de aproximadamente 60% das células cancerígenas em cultura (41,7%). Por sua vez, a adição de $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e irradiação com a mesma dose de luz conduziu a uma redução de 80% da viabilidade celular (16,8%). Comparativamente com os resultados obtidos por irradiação com os filtros RG_{610} e OG_{570} , a irradiação contínua revelou-se bastante eficiente.

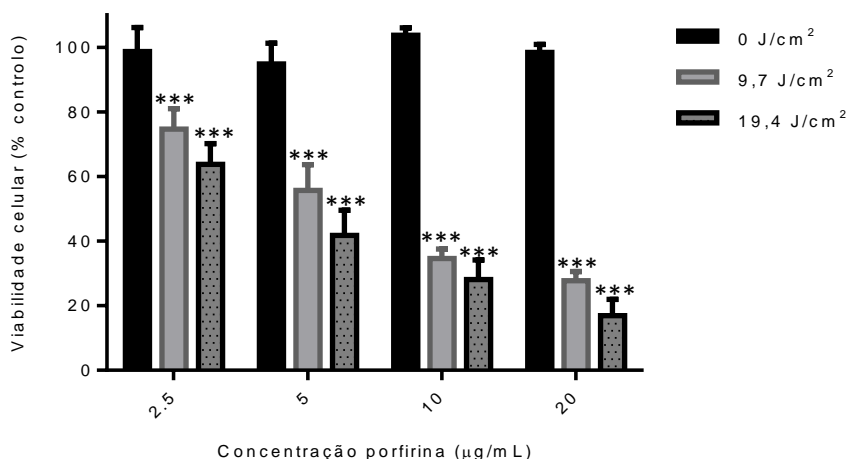


Figura 4.42. Efeito fotodinâmico da TCPP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, ($n=5$). *ns* $P > 0,05$; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,0001$, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm^2), após *two-way*-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

De igual modo, o gráfico da Figura 4,23 evidencia a diminuição considerável da viabilidade celular em função do aumento da concentração de 2-TQP e da dose de luz incidente nas culturas.

A administração de $2,5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de 2-TQP e irradiação das culturas com uma dose total de luz de $19,4 \text{ J/cm}^2$ (30 min) promoveu uma diminuição de cerca de 80% das células cancerígenas em cultura (21,8%), enquanto a administração de $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e irradiação com a mesma dose de luz conduziu a uma diminuição de 90% da viabilidade celular (9,6%).

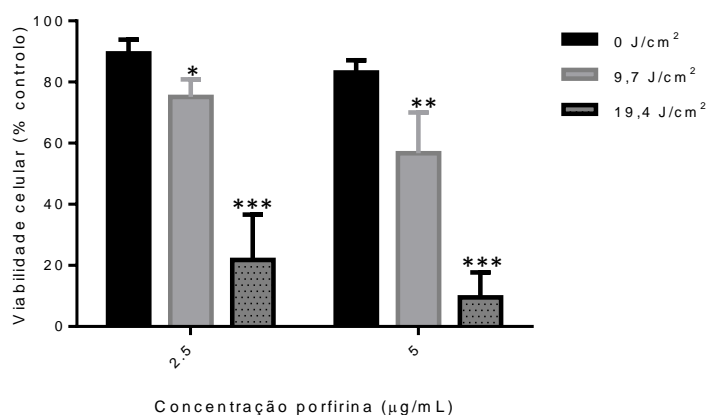


Figura 4.43. Efeito fotodinâmico da 2-TQP na linha celular HT29. O efeito da adição de diferentes concentrações e da irradiação com diferentes doses de luz na viabilidade celular foi determinado pelo método do MTT. Os valores encontram-se representados em função da média \pm desvio padrão, (n=5). ns P >0,05; *P <0,05; **P <0,01 e ***P <0,0001, quando comparado com as culturas não irradiadas (0 J/cm²), após two-way-ANOVA seguido do teste de Dunnett's para comparação de múltiplas.

A diminuição da viabilidade celular depende da concentração do fotossensibilizador e do tempo e intensidade de irradiação [235]. Ao comparar os resultados obtidos para as várias modalidades de irradiação conclui-se que, para a mesma concentração de fotossensibilizador (2,5 e 5 µg/mL), a 2-TQP induz uma destruição mais eficaz das células HT29. Este resultado parece contraditório quando se considera que a 2-TQP tende a agregar no meio de cultura (Figura 4.35) e apresenta um rendimento quântico de oxigénio singleto inferior ao da TCPP [225]. Todavia, a fototoxicidade de um fotossensibilizador está correlacionada não só com a facilidade com que é captado pelas células ou com a capacidade para gerar oxigénio singleto, mas principalmente com a sua localização intracelular [226]. Efectivamente, a localização intracelular de um FS depende, entre outros factores, do balanço hidrofóbico/hidrofílico, do peso molecular, da natureza dos substituintes, e do ambiente químico em torno do FS (e.g., o pH) [76,226]. Deste modo, enquanto os fotossensibilizadores hidrofóbicos se difundem através da membrana celular, geralmente por associação a proteínas com elevada afinidade para o tecido tumoral (e.g., lipoproteínas de baixa densidade), os hidrofílicos são demasiado polares para a conseguirem atravessar, sendo frequentemente internalizados por endocitose [225,226,236,237]. Neste caso em específico, nenhum dos fotossensibilizadores em estudo é hidrofílico. No entanto, Hu constatou que a TCPP (790,8 g.mol⁻¹) era internalizada predominantemente por endocitose [230]. Por sua vez, o elevado peso molecular da 2-TQP (818,9 g.mol⁻¹) pode dificultar a sua internalização. Nestes casos, é frequente efectuar a conjugação prévia do FS com LDL [85]. Ainda assim, serão necessários estudos adicionais que permitam determinar a via de internalização de ambas as porfirinas e validar a autenticidade das experiências descritas por Hu.

Diversos autores defendem que efeito citotóxico das ROS é mais pronunciado em organelos celulares como a mitocôndria, os lisossomas, o reticulo endoplasmático (RE), o complexo de Golgi, a membrana plasmática ou o núcleo [119]. Em suma, o facto de a 2-TQP apresentar uma maior eficácia que a TCPP (para a mesma dose de luz e gama de concentrações), pode sugerir que a sua localização intracelular é mais favorável. Em acréscimo, é comum ocorrer a realocização^a do fotossensibilizador em consequência da fotodegradação do organelo de origem, o que se poderá traduzir por danos celulares adicionais [180]. A realização de estudos de microscopia de fluorescência com recurso a sondas específicas

^a A realocização do fotossensibilizador pode ser comprovada por alterações na morfologia das células, avaliadas com base nos padrões de fluorescência que estas evidenciam antes e após a irradiação [180].

para os principais organelos celulares (e.g., MitoTracker Green para a mitocôndria, LysoSensor Green para os lisossomas, ERTracker Blue para o RE e Bodipy Ceramide para o complexo de Golgi) é imprescindível para que se determine com exactidão a localização de ambos os fotossensibilizadores em estudo, e desse modo se possa confirmar as hipóteses formuladas^[239].

Em 2005 Pegaz^[238] verificou que a TCPP induzia um aumento do dano celular em função do aumento da dose de irradiação. Este efeito foi corroborado pelos resultados experimentais obtidos nesta dissertação, que atestam que a diminuição da viabilidade é proporcional ao aumento da dose de luz e da concentração de porfirina no meio. Porém, é fundamental considerar que um aumento drástico da concentração poderia motivar a agregação do fotossensibilizador, o que condicionaria não só a sua localização intracelular, mas também as suas propriedades fotofísicas, em especial a capacidade para gerar oxigénio singleto^[76,225,226,230]. Por consequência, nem sempre o aumento da concentração de FS é acompanhado pela potenciação do efeito fotodinâmico.

A localização intracelular, assim como a concentração do FS, o tempo de incubação e a dose de luz utilizada, determinam os efeitos biológicos que ocorrem após o tratamento fotodinâmico e estabelecem o mecanismo de morte celular predominante. Os protocolos clínicos sugerem que a irradiação com menores densidades de energia (J/cm^2) resulta num aumento da eficácia do tratamento. Este aspecto pode ser interpretado com base na conservação da oxigenação dos tecidos, essencial à produção de oxigénio singleto^[72,76]. Adicionalmente, menores doses de luz estão geralmente associadas à morte celular por apoptose, enquanto a irradiação com doses elevadas estão associadas à morte por necrose^[72,119,235]. Além da dose de luz incidente, acredita-se ainda que o balanço entre a apoptose e a necrose é também dependente do perfil genético de cada tipo celular e da natureza e localização do FS^[239]. Em 2007, Mikeš e colaboradores constataram que, independentemente da intensidade da reacção fotodinâmica, a via de morte predominante em células HT29 era a necrose^[240]. Em 1990 Rodrigues *et al.* estabeleceram o perfil genético desta e de outras linhas celulares de adenocarcinoma colorectal, e verificaram a existência de uma mutação na proteína p53^[241]. Com efeito, Mikeš pressupõe que esta mutação seja responsável pelo desequilíbrio do balanço entre a apoptose e a necrose no sentido da necrose^[240].

A compreensão dos mecanismos que regulam a distribuição intracelular de um FS é essencial ao *design* de novos FS, que permitam otimizar a interacção com os sistemas biológicos e aumentar a selectividade para os tecidos-alvo e, dessa forma, diminuir efeitos secundários como fotossensibilidade da pele^[62]. Neste contexto, a utilização de sistemas de entrega como lipossomas ou nanocápsulas funcionalizados por anticorpos monoclonais, aptâmeros, polímeros ou outros ligandos, permitirá aumentar a biocompatibilidade, a captação celular e a retenção selectiva no tecido tumoral^[242,243].

5. Conclusões

A PDT é uma abordagem terapêutica que tem por princípio a destruição selectiva de tecido neoplásico com um mínimo de toxicidade para os tecidos saudáveis. A PDT envolve a administração de um agente fotossensibilizador, que se acumula no tumor e é posteriormente activado por luz com um comprimento de onda adequado. Na presença de oxigénio, desencadeia-se uma sequência de processos fotoquímicos que culminam no dano irreversível do tecido tumoral ^[60,86].

Neste trabalho experimental sintetizaram-se e caracterizaram-se derivados porfirínicos com vista à sua aplicação em PDT. Das 5 porfirinas sintetizadas, apenas 2 foram caracterizadas do ponto de vista biológico.

A H₂TCP revelou ser uma mistura de porfirinas e não apenas uma porfirina pura de composição bem definida. Deste modo, como esta porfirina não cumpria um dos requisitos fundamentais de um bom FS, foi excluída dos ensaios biológicos. Porém, também o Photofrin® é constituído por uma mistura de dímeros e oligómeros e, ainda assim, é o FS mais utilizado nas práticas clínicas ^[86]. Adicionalmente, a H₂TCP apresenta um ϕ_{Δ} superior ao do Photofrin®. Deste modo, seria muito interessante avaliar o potencial desta porfirina como agente fotossensibilizador em PDT.

A reacção de síntese da porfirina α -hexilcinamaldeído não foi eficaz e, portanto, não foi possível obter a porfirina desejada. Por sua vez, a 4-TQP não foi utilizada nos ensaios biológicos com células HT29 porque não dispúnhamos de composto suficiente para realização de todas as experiências.

A 2-TQP e a TCPP foram sintetizadas, purificadas, e devidamente caracterizadas do ponto de vista químico, fotofísico e biológico. Ambas as porfirinas exibem bons coeficientes de absorção e produzem oxigénio singleto de forma eficaz.

As porfirinas são pouco solúveis em meios aquosos, pelo que foi necessário utilizar um veículo de adição que permitisse a sua dissolução, mas não fosse demasiado tóxico para as células. O DMSO foi o veículo de adição seleccionado, e a sua concentração final na cultura celular nunca excedeu os 0,5% (v/v). A gama de concentrações das porfirinas em estudo variou de 2,5 a 5 µg/mL para a 2-TQP e de 2,5 a 20 µg/mL para a TCPP.

Ambas as porfirinas são inócuas na ausência de luz.

A activação dos FS pela luz induziu uma diminuição significativa da viabilidade das células HT29.

Nas experiências de fototoxicidade, a diminuição da viabilidade celular é proporcional à concentração da porfirina administrada e à intensidade da luz incidente. A intensidade da luz está intimamente associada com as propriedades ópticas dos filtros de radiação, que bloqueiam a passagem de luz de um determinado comprimento de onda. Este parâmetro condiciona não só a potências de irradiação mas também a eficácia com que o FS é activado. A irradiação na ausência de qualquer filtro corresponde à modalidade mais eficiente.

Para a mesma dose de luz e concentração de porfirina, a 2-TQP promove uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular.

Os resultados obtidos demonstram que estas porfirinas cumprem alguns dos principais requisitos de um FS ideal e, por isso, são potenciais fotossensibilizadores para PDT. Ainda assim, é fundamental aprofundar esta investigação e realizar estudos complementares que permitam uma caracterização mais rigorosa.

A determinação da localização intracelular do fotossensibilizador, efectuada por microscopia de fluorescência com recurso a sondas específicas, permitiria compreender alguns dos fenómenos subjacentes ao efeito fotodinâmico. Com efeito, a dependência entre a via de morte predominante e a localização intracelular do FS encontra-se perfeitamente estabelecida. Deste modo, seria também interessante aplicar os princípios da citometria de fluxo para determinar o tipo de morte celular predominante após o tratamento fotodinâmico. Esta experiência pode ser realizada com recurso a diferentes sondas mas, a anexina V, que marca as células em apoptose, e o iodeto de propídeo, que marca as células em necrose, são as mais usuais^[244]. Estes estudos permitiriam compreender se a maior eficácia da 2-TQP face à TCPP estava associada a diferenças na localização intracelular e na via de morte activada.

É também fundamental confirmar a selectividade destas porfirinas para o tecido tumoral. Com efeito, pretende-se realizar as experiências de cito e de fototoxicidade, nas mesmas condições, numa linha celular não-tumoral. Uma vez confirmada a eficácia destas porfirinas *in vitro*, o passo seguinte consistiria na avaliação do seu potencial fotodinâmico *in vivo*, possivelmente em ratinhos.

6. Bibliografia

- [1] Bertram, J. (2001), *The Molecular Biology of Cancer*, Mol Aspects Med **21**, 167–223
- [2] Lodish, H. *et al.* (2004), *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, Nova Iorque
- [3] Foster, I. (2008), *Cancer: A Cell Cycle Defect*, Radiogr. **14**, 144–149
- [4] Kreeger, P. e Lauffenburger, D. (2010), *Cancer Systems Biology: a Network Modeling Perspective*, Carcinogenesis **31**, 2–8
- [5] Artandi, S. e DePinho, R. (2010), *Telomeres and Telomerase in Cancer*, Carcinogenesis **31**, 9–18
- [6] Hanahan, D. e Weinberg, R. (2011), *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, Cell **144**, 646–674
- [7] Ruan, K. *et al.* (2009), *Role of Hypoxia in the Hallmarks of Human Cancer*, J Cell Biochem **107**, 1053–1062
- [8] Hanahan, D. e Weinberg, R. (2000), *The Hallmarks of Cancer*, Cell **100**, 57–70
- [9] Weinberg, R. (2007), *The Biology of Cancer*, Garland Science, Nova Iorque
- [10] Alberts, B. *et al.* (2007), *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, Nova Iorque
- [11] Gatenby, R. e Gillies, R. (2007), *Glycolysis in Cancer: A Potential Target for Therapy*, Int J Biochem Cell Biol **39**, 1358–1366
- [12] DeBerardinis, R. *et al.* (2008), *The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation*, Cell Metab **7**, 11–20
- [13] Chen, Z. *et al.* (2007), *The Warburg Effect and its Cancer Therapeutic Implications*, J Bioenerg Biomembr **39**, 267–274
- [14] Warburg, O. (1956), *On the Origin of Cancer Cells*, Science **123**, 309–314
- [15] Ferreira, L. (2012), *Metabolic Reprogramming of the Tumor*, Oncogene **31**, 3999–4011
- [16] Jemal, A. *et al.* (2011), *Global Cancer Statistics*, CA Cancer J Clin **61**, 69–90
- [17] Siegel, R. *et al.* (2012), *Cancer Statistics*, CA Cancer J Clin **62**, 10–29
- [18] Aggarwal, B. e Shishodia, S. (2006), *Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer*, Biochem Pharmacol **71**, 1397–1421
- [19] Grivennikov, S. *et al.* (2010), *Immunity, Inflammation, and Cancer*, Cell **140**, 883–899

- [20] Aggarwal, B. *et al.* (2009), *Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe*, Clin Cancer Res **15**, 425–430
- [21] Nelson, D. e Cox, M. (2004), *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, Nova Iorque
- [22] Malumbres M. e Barbacid, M. (2001), *To Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in Cancer*, Nat Rev Cancer **1**, 222–231
- [23] Tyson, J. e Novak, B. (2008), *Temporal Organization of the Cell Cycle*, Curr Biol **18**, 759–768
- [24] Johnson, D. e Walker, C. (1999), *Cyclins and Cell Cycle Checkpoints*, Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**, 295–312
- [25] Harper, J. e Brooks, G. (2005), *The Mammalian Cell Cycle: An Overview*, Methods Mol Biol **296**, 113–153
- [26] Malumbres M. e Barbacid, M. (2009), *Cell cycle, CDKs and Cancer: a Changing Paradigm*, Nat Rev Cancer **9**, 153–166
- [27] Lukas, J. *et al.* (2004), *Mammalian Cell Cycle Checkpoints: Signalling Pathways and Their Organization in Space and Time*, DNA Repair **3**, 997–1007
- [28] Lapenna, S. e Giordano, A. (2009), *Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer*, Nat Rev Drug Discov **8**, 547–566
- [29] Satyanarayana, A. e Kaldis, P. (2009), *Mammalian Cell-Cycle Regulation: Several Cdks, Numerous Cyclins and Diverse Compensatory Mechanisms*, Oncogene **28**, 2925–2939
- [30] Malumbres M. e Barbacid, M. (2007), *Cell Cycle Kinases in Cancer*, Curr Opin Genet Dev **17**, 60–65
- [31] Williams, G. e Stoeber, K. (2012), *The Cell Cycle and Cancer*, J Pathol **226**, 352–364
- [32] Blagosklonny, M. (2001), *Cell Cycle Checkpoints and Cancer*, Landes Bioscience, Austin
- [33] Elmore, S. (2007), *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*, Toxicol Pathol **35**, 495–516
- [34] Sherr, C. (1996), *Cancer Cell Cycles*, Science **274**, 1672–1677
- [35] Levesque, A. e Eastman, A. (2007), *p53-based Cancer Therapies: is Defective p53 the Achilles Heel of the Tumor*, Carcinogenesis **28**, 13–20
- [36] Chen, F. *et al.* (2010), *Current Strategies to Target p53 in Cancer*, Biochem Pharmacol **80**, 724–730
- [37] Kastan, M. *et al.* (1995), *P53, Cell Cycle Control and Apoptosis: Implications for Cancer*, Cancer Metast Rev **14**, 3–15
- [38] Colman, M, *et al.* (2000), *Regulation of p53 Stability and Activity in Response to Genotoxic Stress*, Mutat Res **462**, 179–188
- [39] Cotter, T. (2009), *Apoptosis and Cancer: the Genesis of a Research Field*, Nat Rev Cancer **9**, 501–507
- [40] Lane, D. *et al.* (2010), *p53-based Cancer Therapy*, Cold Spring Harb Perspect Biol **2**, 1–24
- [41] Wong, D. *et al.* (2008), *Revealing Targeted Therapy for Human Cancer by Gene Module Maps*, Cancer Res **68**, 369–378
- [42] Yano, S. *et al.* (2011), *Current States and Future Views in Photodynamic Therapy*, J Photochem Photobiol **12**, 46–67
- [43] Mitton, D. e Ackroyd, R. (2008), *A Brief Overview of Photodynamic Therapy in Europe*, Photodiagn Photodyn **5**, 103–111
- [44] MacDonald, I. e Dougherty, T. (2001), *Basic Principles of Photodynamic Therapy*, J Porphyrins Phthalocyanines **5**, 105–129
- [45] Hamblin, M. (ed) e Mroz, P. (ed) (2008), *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*, Artech House, Londres
- [46] MacCormack, M. (2006), *Photodynamic Therapy*, Adv Dermatol **22**, 219–258
- [47] Ritz, R. (2011), *Visualization and Photodynamic Therapy in Malignant Glioma - An Overview and Perspectives, Advances in the Biology, Imaging and Therapies for Glioblastoma*, InTech, Piedmont, USA
- [48] Moan, J. e Peng, Q. (2003), *An Outline of the History of PDT: Photodynamic Therapy*, RSC, Londres
- [49] Taller, R. *et al.* (1983), *Potential Use of Radiolabelled Porphyrins for Tumour Scanning*, Adv Exp Med Biol **160**, 265–278
- [50] Diamond, I. *et al.* (1975), *Photochemotherapy of Glioma Cells by Visible Light and Hematoporphyrin*, Cancer Res **35**, 2567–2570
- [51] Dougherty, T. *et al.* (1978), *Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors*, Cancer Res **38**, 2628–2635.
- [52] Kelly, J. *et al.* (1975), *Photodynamic Destruction of Human Bladder Carcinoma*, Br J Cancer **31**, 237–244
- [53] Dolmans, D. *et al.* (2003), *Photodynamic Therapy for Cancer*, Nat Rev Cancer **3**, 380–387
- [54] Jacob, C. (ed) e Winyard, P. (ed) (2009) *Redox Signalling and Regulation in Biology and Medicine*, Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [55] Kessel, D. *et al.* (1987), *Chemistry of Hematoporphyrin-derived Photosensitizers*, Photochem Photobiol **46**, 563–568
- [56] Huang, Z. (2005), *A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy*, Technol Cancer Res Treat. **4**, 283–293
- [57] O’Connor, A. *et al.* (2009), *Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*, Photochem Photobiol **85**, 1053–1074

- [58] Juarranz, A. *et al.* (2008), *Photodynamic Therapy of Cancer: Basic Principles and Applications*, Clin Transl Oncol **10**, 148–154
- [59] Ethirajan, M. *et al.* (2011), *The Role of Porphyrin Chemistry in Tumor Imaging and Photodynamic Therapy*, Chem Soc Rev **40**, 340–362
- [60] Agostinis, P. *et al.* (2011), *Photodynamic Therapy of Cancer: An Update*, CA Cancer J Clin **61**, 250–281
- [61] Wojtyk, J. *et al.* (2006), *Exploiting Tumour Biology to Develop Novel Drug Delivery Strategies for PDT*, Med Laser Appl **21**, 225–238
- [62] Osterloh, J. e Vicente, G (2002), *Mechanisms of Porphyrinoid Localization in Tumors*, J. Porphyrins Phthalocyanines **6**, 305–324
- [63] Lukšienė, Ž. (2003), *Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to Improve the Efficiency of Treatment*, Medicina **12**, 1137–1150
- [64] Triesscheijn, M. *et al.* (2006), *Photodynamic Therapy in Oncology*, Oncologist **11**, 1034–1044
- [65] Henderson, B. e Dougherty, T. (1992), *How Does Photodynamic Therapy Work?*, Photochem Photobiol **1**, 145–157
- [66] Gupta, A. *et al.* (2012), *Shining Light on Nanotechnology to Help Repair and Regeneration*, Biotechnol Adv, 1–25
- [67] Nyman, E. e Hynninen, P. (2004), *Research Advances in the Use of Tetrapyrrolic Photosensitizers for Photodynamic Therapy*, J Photochem Photobiol **73**, 1–28
- [68] Robertson, C. *et al.* (2009), *Photodynamic Therapy (PDT): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for PDT*, J Photochem Photobiol **96**, 1–8
- [69] Sharman, W. *et al.* (1999), *Photodynamic Therapeutics: Basic Principles and Clinical Applications*, DDT **4**, 507–517
- [70] Castano, A. *et al.* (2004), *Mechanisms in Photodynamic Therapy: Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization*, Photodiagn Photodyn **1**, 279–293
- [71] Verma, S. *et al.* (2007), *Strategies for Enhanced Photodynamic Therapy Effects*, Photochem and Photobiol **83**, 996–1005
- [72] Seshadri, M. *et al.* (2008), *Light Delivery over Extended Time Periods Enhances the Effectiveness of Photodynamic Therapy*, Clin Cancer Res **14**, 2796–2805
- [73] Plaetzer, K. *et al.* (2009), *Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects*, Lasers Med Sci **24**, 259–268
- [74] Huang, Z. *et al.* (2008), *Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors: Potential and Technical Challenges*, Technol Cancer Res Treat **7**, 309–320
- [75] Bonnet, R. (1995), *Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy*, Chem Soc Rev **24**, 19–33
- [76] Ricchelli, F. (1995), *Photophysical Properties of Porphyrins in Biological Membranes*, J Photochem Photobiol **29**, 109–118
- [77] Hatz, S. *et al.* (2007), *Measuring the Lifetime of Singlet Oxygen in a Single Cell: Addressing the Issue of Cell Viability*, Photochem Photobiol Sci **6**, 1106–1116
- [78] Almeida, R. *et al.* (2004), *Intracellular Signalling Mechanisms in Photodynamic Therapy*, Biochim Biophys Acta **1704**, 59–86
- [79] Yoon, I. *et al.* (2013) *Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy*, Clin Endosc **46**, 7–23
- [80] Jori, G. (1996), *Tumour Photosensitizers: Approaches to Enhance the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy*, J Photochem Photobiol **36**, 87–93
- [81] Gomer, C. (1991), *Preclinical Examination of First and Second Generation Photosensitizers Used in Photodynamic Therapy*, Photochem Photobiol **54**, 1093–1107
- [82] Mazière, C. *et al.* (1990), *Cellular Uptake and Photosensitizing Properties of Anticancer Porphyrins in Cell Membranes and Low and High Density Lipoproteins*, J Photochem Photobiol **6**, 61–68
- [83] Hamblin, M. e Newman, E. (1994), *On the Mechanism of the Tumour-localising Effect in Therapy*, J Photochem Photobiol **23**, 3–8
- [84] Jori, G. *et al.* (1984), *Evidence for a Major Role of Plasma Lipoproteins as Hematoporphyrin Carriers in Vivo*, Cancer Lett **24**, 291–297
- [85] Bonneau, S. *et al.* (2007), *Tetrapyrrole-photosensitizers Vectorization and Plasma LDL: A Physico-chemical Approach*, Int J Pharm **344**, 78–87
- [86] Dougherty, T. *et al.* (1998), *Photodynamic Therapy*, J Natl Cancer Inst **90**, 889–905

- [87] Pottier, R. e Kenedy, J. (1990), *New Trends in Photobiology: The Possible role of Ionic Species in Selective Biodistribution of Photochemotherapeutic Agents Toward Neoplastic Tissue*, J Photochem Photobiol **8**, 1–16
- [88] Ochsner, M. (1997), *Photophysical and Photobiological Processes in the Photodynamic Therapy of Tumours*, J Photochem Photobiol **39**, 1–18
- [89] Allison, R. e Sibata, C. (2010), *Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review*, Photodiagn Photodyn **7**, 61–75
- [90] Senge, M. (2012), *mTHPC: A drug on its Way from Second to Third Generation Photosensitizer?*, Photodiagn Photodyn **9**, 170–179
- [91] Wachowska, M. et al. (2011), *Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer*, Molecules **16**, 4140–4164
- [92] Visscher, S. et al. (2011), *Fluorescence Localization and Kinetics of mTHPC and Liposomal Formulations of mTHPC in the Window-Chamber Tumor Model*, Lasers Surg Med **43**, 528–536
- [93] Milgrom, R. (1997), *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press, Oxford
- [94] Smith, K. (ed) (1975), *Porphyryns and Metalloporphyryns*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amesterdão
- [95] Král, V. et al. (2006), *Quo Vadis Porphyrin Chemistry*, Physiol Res **55**, 3–26
- [96] Dolphin, D. (1978), *The Porphyrins: Structure and Synthesis PartA*, vol.1, Academic Press Inc, Nova Iorque
- [97] Dolphin, D. (1979), *The Porphyrins: Structure and Synthesis PartB*, vol.2, Academic Press Inc, Nova Iorque
- [98] Gouterman, M. (1961), *Spectra of Porphyrins*, J Mol Spectrosc **6**, 138–163
- [99] Uddin, J. (ed) (2012), *Macro to Nano Spectroscopy*, InTech, Nova Iorque
- [100] Ravikanth, M. e Chandrashekar, T. (1995), *Nonplanar Porphyrins and Their Biological Relevance: Ground and Excited State Dynamics*, Struct Bond **82**, 105–188
- [101] Strand, L. et al. (1970), *Heme Biosynthesis in Intermittent Acute Porphyria: Decreased Hepatic Conversion of Porphobilinogen to Porphyrins and Increased Delta Aminolevulinic Acid Synthetase Activity*, P Natl Acad Sci **67**, 1315–1320
- [102] Sheldon, R. (ed) (1994), *Metalloporphyryns in Catalytic Oxidations*, Marcel Dekker Inc., Nova Iorque
- [103] Rothemund, P. e Menotti, A. (1941), *Porphyry Studies: The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine*, J Am Chem Soc **63**, 267–270
- [104] Lindsey, J. et al. (1987), *Rothemund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyryns under Equilibrium Conditions*, J Org Chem **52**, 827–836
- [105] Kadish, K. et al. (ed) (2000), *The Porphyrin Handbook: Synthesis and Organic Chemistry*, Academic Press, Nova Iorque
- [106] Shanmugathan, S. et al. (2000), *Advances in Modern Synthetic Porphyrin Chemistry*, Tetrahedron **56**, 1025–1046
- [107] Adler, A. et al. (1967), *A Simplified Synthesis for meso-Tetraphenylporphine*, J Org Chem **32**, 476–476
- [108] Lindsey, J. et al. (1986), *Synthesis of Tetraphenylporpyryns under Very Mild Conditions*, Tetrahedron Lett **27**, 4969–4970
- [109] Geir, G. e Lindsey, J. (2001), *Investigation of Porphyrin-forming Reactions. Pyrrole + Aldehyde Oligomerization in Two-Step, One-Flask Syntheses of meso-Substituted Porphyrins*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. **2**, 677–686
- [110] Nascimento, B. et al. (2007), *Microwave-Assisted Synthesis of Porphyrins and Metalloporphyryns: A Rapid and Efficient Synthetic Method*, J Porphyrins Phthalocyanines **11**, 77–84
- [111] Kappe, C. (2004), *Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis*, Angew Chem Int Ed **43**, 6250–6284
- [112] Hoz, A. et al. (2000), *Microwaves in Organic Synthesis. Thermal and Non-Thermal Microwave Effects*, Chem Soc Rev **34**, 164–178
- [113] Mikus, A. et al. (2011), *Synthesis of meso-TPP Revisited: Its “Green-Oriented” Optimization under Controlled Microwave Heating*, Synthetic Commun **41**, 3703–3713
- [114] Yaseen, M. et al. (2009), *Microwave-Assisted Synthesis, Metallation, and Duff Formylation of Porphyrins*, J. Heterocyclic Chem **46**, 251–255
- [115] Chandrasekharam, M. et al. (2007), *Microwave-Assisted Synthesis of Metalloporphyryns*, Tetrahedron Lett **48**, 2627–2630
- [116] Chauhan, S. et al. (2001), *Microwave-Assisted Synthesis of 5,10,15,20-Tetraaryl Porphyrins*, Synth Commun **31**, 33–37
- [117] Liu, M. et al. (2004), *Microwave-assisted Synthesis and Reverse Saturable Absorption of Phthalocyanines and Porphyrins*, J Organomet Chem **689**, 1078–1084

- [118] Serra, A. et al. (2010), *In Vitro Photodynamic Activity of 5,15-bis(3-Hydroxyphenyl)porphyrin and Its Halogenated Derivatives Against Cancer Cells*, Photochem Photobiol **86**, 206–212
- [119] Serra, V. et al. (2010), *New Porphyrin Amino Acid Conjugates: Synthesis and Photodynamic Effect in Human Epithelial Cells*, Bioorg Med Chem **18**, 6170–6178
- [120] Zakavi, S. et al. (2010), *meso-Tetracinnamylporphyrin: Synthesis, Characterization and the Catalytic Activity of its Mn(III) Complex in Olefin Epoxidation with Tetra-n-butylammonium Hydrogen Monopersulfate*, Polyhedron **29**, 1492–1496
- [121] Pavia, L., Lampman, G. e Kriz, G. (2000), *Introduction to Spectroscopy*, Brooks/Cole Pub. Co, Pacific Grove
- [122] Burrows, H. e Pereira, M. (2006), *Química: Síntese e Estrutura. Uma Abordagem Prática*, Escolar Editora, Lisboa
- [123] Fried, B. e Sherma, J. (1999), *Thin-Layer Chromatography, Revised and Expanded*, Marcel Dekker Inc., Nova Iorque
- [124] Ahuja, S. e Jespersen, N. (ed) (2006), *Modern Instrumental Analysis. Comprehensive Analytical Chemistry Vol. 47*, Elsevier Science, Amesterdão
- [125] Wall, P. (2005), *Thin Layer Chromatography: A Modern Practical Approach*, RSC, Londres
- [126] Lim, C. (ed) (2010) *High-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry of Porphyrins, Chlorophylls and Bilins*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapura
- [127] Ho, C. et al. (2003), *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*, Clin Biochem Rev **24**, 3–12
- [128] Griffiths, J. et al. (2001), *Electrospray and Tandem Mass Spectrometry in Biochemistry*, Biochem J **355**, 545–561
- [129] Meyers, R. (ed) (2001), *Encyclopedia of Physical Science and Technology - Analytical Chemistry*, Academic Press, Nova Iorque
- [130] Fenn, B. (2002), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began*, J Biomol Tech **13**, 101–118
- [131] Ardrey, R. (2003), *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., Nova Iorque
- [132] Wong, P. e Cooks, R. (2007), *Ion Trap Mass Spectrometry*
- [133] Jacobsen, N. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Jérícia
- [134] Rocha-Gonsalves, A e Pinho e Melo, T. (2007), *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, Imprensa da Universidade de Coimbra
- [135] Richards, S. e Hollerton, J. (2011), *Essential Practical NMR for Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Nova Iorque
- [136] Gottlieb, H. et al. (1997), *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities*, J Org Chem **62**, 7512–7515
- [137] Albani, J. (2007), *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell Science Ltd, Oxford
- [138] Silva, P. et al. (2010), *A New Nonconjugated Naphthalene Derivative of meso-tetra-(3-hydroxy)-phenyl-porphyrin as a Potential Sensitizer for Photodynamic Therapy*, Photochem Photobiol, **86**, 1147–1153
- [139] Oliveira, A. et al. (2009), *A Singlet Oxygen Photogeneration and Luminescence Study of Unsymmetrically Substituted Mesoporphyrinic Compounds*, Int J Photoenergy, 1–10
- [140] Pineiro, M. et al. (1998), *Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies*, Chem Eur J **4**, 2299–2307
- [141] Kuimova, M. et al. (2009), *Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants*, J Am Chem Soc **131**, 332–340
- [142] Skovsen, E. et al. (2005), *Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell*, J Phys Chem B **109**, 8570–8573
- [143] Samia, A. et al. (2006), *Quantum Dot-based Energy Transfer: Perspectives and Potential for Applications in Photodynamic Therapy*, Photochem Photobiol **82**, 617–625
- [144] DeRosa, M. e Crutchley, R. (2002), *Photosensitized Singlet Oxygen and its Applications*, Coord Chem Rev **233**, 351–371
- [145] Deda, D. et al. (2012), *Correlation of Photodynamic Activity and Singlet Oxygen Quantum Yields in Two Series of Hydrophobic Monocationic Porphyrins*, J. Porphyrins Phthalocyanines **16**, 55–63
- [146] Martí, C. et al. (1996), *Aromatic Ketones as Standards for Singlet Molecular Oxygen 1O_2 ($^1\Delta_g$) Photosensitization. Time-Resolved Photoacoustic and near-IR Emission Studies*, J Photochem Photobiol A **97**, 11–18
- [147] Freshney, R. (2005), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, John Wiley & Sons Inc., Nova Jérícia
- [148] Sinha, B. e Kumar, R. (2008), *Principles of Animal Cell Culture*, International Book Distributing Co., Nova Iorque
- [149] Fan, X. et al. (2011), *Isolation and Characterization of Spheroid Cells from the HT29 Colon Cancer Cell Line*, Int J Colorectal Dis **26**, 1279–1285

- [150] Tom, B. *et al.* (1976), *Human Colonic Adenocarcinoma Cells, In Vitro* **12**, 180–191
- [151] Lesuffleur, T. *et al.* (1991), *Dihydrofolate Reductase Gene Amplification-associated Shift of Differentiation in Methotrexate-adapted HT29 Cells*, *J Cell Biol* **115**, 1409–1418
- [152] Huet, C. *et al.* (1987), *Absorptive and Mucus-secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation*, *J Cell Biol* **105**, 345–357
- [153] Kolios, G. *et al.* (1995), *Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in a Human Colonic Epithelial Cell Line, HT29*, *Br J Pharmacol* **116**, 2866–2872
- [154] Lafitte, M. *et al.* (1989), *Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene*, *Cancer Res* **49**, 6566–6571.
- [155] Langdon, S. (ed) (2004), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Humana Press Inc, Nova Jérσία
- [156] Aschner, M. *et al.* (ed) (2011), *Cell Culture Techniques*, Humana Press Inc, Nova Jérσία
- [157] Masters, J. (ed) (2000), *Animal Cell Culture: A practical Approach*, Oxford University Press, Oxford
- [158] Tran, S. *et al.* (2011), *Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of Bacillus cereus*, *Plos One* **6**, 1–5
- [159] Strober, W. (2001), *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*, *Curr Protoc Immunol* **A3B**, 1–2
- [160] Louis, K. e Siegel, A. (2011), *Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods*, *Methods Mol Biol* **740**, 7–12
- [161] Altman, S. *et al.* (1993), *Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations*, *Biotechnol Prog* **9**, 671–674.
- [162] Castano, A. *et al.* (2005), *Mechanisms in Photodynamic Therapy: Photosensitizer Pharmacokinetics, Biodistribution, Tumor Localization and Modes of Tumor Destruction*, *Photodiag Photodyn* **2**, 91–106
- [163] Pappas, D. (2010), *Practical Cell Analysis*, John Wiley & Sons, Ltd, Nova Iorque
- [164] Liu, Y. *et al.* (1997), *Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction*, *J Neurochem* **69**, 581–593
- [165] Stockert, J. *et al.* (2012), *MTT Assay for Cell Viability: Intracellular Localization of the Formazan Product is in Lipid Droplets*, *Acta Histochem* **114**, 785–796
- [166] Mosman, T. (1983), *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*, *J Immunol Methods* **65**, 55–63
- [167] Hamid, R. *et al.* (2004), *Comparison of Alamar blue and MTT Assays for High Through-put Screening*, *Toxicol In Vitro* **18**, 703–710
- [168] Cole, S. (1986), *Rapid Chemosensitivity Testing of Human Lung Tumor Cells Using the MTT Assay*, *Cancer Chemother Pharmacol* **17**, 259–263
- [169] Freimoser, F. *et al.* (1999), *The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities*, *Appl Environ Microbiol* **65**, 3727–3729
- [170] Carmichael, J. *et al.* (1987), *Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing*, *Cancer Res* **47**, 936–942,
- [171] Dias, N. *et al.* (1999), *Miniaturization and Application of the MTT Assay to Evaluate Metabolic Activity of Protozoa in the Presence of Toxicants*, *J Basic Microbiol* **39**, 103–108
- [172] Liu, W. e Dagleish, A. (2009), *MTT Assays Can Underestimate Cell Numbers*, *Cancer Chemother Pharmacol* **64**, 861–862
- [173] Denizot, F. e Lang, R. (1986), *Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability*, *J Immunol Methods* **89**, 271–277
- [174] Edmondson, J. *et al.* (1988), *A Rapid and Simple MTT-based Spectrophotometric Assay for Determining Drug Sensitivity in Monolayer Cultures*, *J Tissue Cult Methods* **11**, 15–17
- [175] Gerlier, D. e Thomasset, N. (1986), *Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation*, *J Immunol Methods* **94**, 57–63
- [176] Berridge, M. e Tan, A. (1993), *Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction*, *Arch Biochem Biophys* **303**, 474–82.
- [177] Slater, T. (1963), *Studies on a Succinate-Neotetrazolium Reductase System of Rat Liver*, *Biochim Biophys Acta* **77**, 365–382

- [178] Bernas, T. e Dobrucki, J. (2002), *Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes*, *Cytometry* **47**, 236–242
- [179] Berridge, M. et al. (2005), *Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights Into Their Cellular Reduction*, *Biotechnol Annu Rev* **11**, 127–152
- [180] Alvarez, M. et al. (2011), *Cell Death Causes Relocalization of Photosensitizing Fluorescent Probes*, *Acta Histochem* **113**, 363–368
- [181] Balanguer, M. et al. (2011), *Functional Properties of Bioplastics Made from Wheat Gliadins Modified with Cinnamaldehyde*, *J Agric Food Chem* **59**, 6689–6695
- [182] Wei, K. et al. (2011), *The Antimicrobial Activities of the Cinnamaldehyde Adducts with Amino Acids*, *Int J Food Microbiol* **150**, 164–170
- [183] Kwon, H. et al. (2010), *Cinnamon Extract Induces Tumor Cell Death Through Inhibition of NF κ B and AP1*, *BMC Cancer* **392**, 1–10
- [184] Ywaoka, Y. et al. (2010), *Selective Stimulation by Cinnamaldehyde of Progesterone Secretion in Human Adrenal Cells*, *Life Sci* **86**, 894–898
- [185] Wu, S. et al. (2005), *Cinnamaldehyde-induced Apoptosis in Human PLC/PRF/5 Cells Through Activation of the Proapoptotic Bcl-2 Family Proteins and MAPK Pathway*, *Life Sci* **77**, 938–951
- [186] Bassossy, H. et al. (2011), *Cinnamaldehyde Protects from the Hypertension Associated with Diabetes*, *Food Chem Toxicol* **49**, 3007–3012
- [187] Chao, L. et al. (2008), *Cinnamaldehyde Inhibits Pro-inflammatory Cytokines Secretion from Monocytes/Macrophages Through Suppression of Intracellular Signaling*, *Food Chem Toxicol* **46**, 220–231
- [188] Ka, H. et al. (2003), *Cinnamaldehyde Induces Apoptosis by ROS-mediated Mitochondrial Permeability Transition in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells*, *Cancer Lett* **196**, 143–152
- [189] Jeong, H. et al. (2003), *Antitumor Effect of the Cinnamaldehyde Derivative CB403 Through the Arrest of Cell Cycle Progression in the G2/M Phase*, *Biochem Pharmacol* **65**, 1343–1350
- [190] Hongyan, C. e Hongbing, J. (2011), *β -Cyclodextrin Promoted Oxidation of Cinnamaldehyde to Natural Benzaldehyde in Water*, *Chinese J Chem Eng* **19**, 972–977
- [191] Chen, H. et al. (2012), *Oxidative Cleavage of C=C Bond of Cinnamaldehyde to Benzaldehyde in the Presence of β -Cyclodextrin under Mild Conditions*, *Supramol Chem* **24**, 247–254
- [192] Chen, H. et al. (2009), *Aerobic Oxidative Cleavage of Cinnamaldehyde to Benzaldehyde Catalyzed by Metalloporphyrins Under Mild Conditions*, *Catal Commun* **10**, 828–832
- [193] Chen, H. et al. (2010), *Green Synthesis of Natural Benzaldehyde from Cinnamon Oil Catalysed by Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin*, *Tetrahedron* **66**, 9888–9893
- [194] Zhang, Y. et al. (2000), *Catalytic Selective Hydrogenation of Cinnamaldehyde to Hydrocinnamaldehyde*, *Appl Catal A* **192**, 247–251
- [195] Machado, B. et al. (2012), *Preparation of Carbon Aerogel Supported Platinum Catalysts for the Selective Hydrogenation of Cinnamaldehyde*, *Appl Catal A* **425**, 161–169
- [196] Cló, E. et al. (2007), *Control and Selectivity of Photosensitized Singlet Oxygen Production: Challenges in Complex Biological Systems*, *Chem Bio Chem* **8**, 475–481
- [197] Skovsen, E. et al. (2005), *Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell*, *J. Phys Chem B* **109**, 8570–8573
- [198] Silva, E. et al. (2010), *Mechanisms of Singlet-Oxygen and Superoxide-Ion Generation by Porphyrins and Bacteriochlorins and their Implications in Photodynamic Therapy*, *Chem Eur J* **16**, 9273–9286
- [199] Mathai, S. et al. (2007), *Singlet Oxygen quantum Yields of Potential Porphyrin-based Photosensitisers for Photodynamic Therapy*, *Photochem Photobiol Sci* **6**, 995–1002
- [200] Salokhiddinov, K. et al. (1981), *Lifetime of Singlet Oxygen in Various Solvents*, *J Appl Spectrosc* **34**, 561–564
- [201] Tanielian, C. et al. (1996), *Singlet Oxygen Production in Water: Aggregation and Charge-Transfer Effect*, *J. Phys. Chem* **100**, 6555–6560
- [202] Kessel, D. (2004), *Correlation between Subcellular Localization and Photodynamic Efficacy*, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **8**, 1009–1014
- [203] Silva, E. et al. (2012), *Irradiation- and Sensitizer-Dependent Changes in the Lifetime of Intracellular Singlet Oxygen Produced in a Photosensitized Process*, *J Phys Chem B* **116**, 445–461
- [204] Marek, G. et al. (2006), *Spectroscopic Properties and Photodynamic Effects of New Lipophilic Porphyrin Derivatives: Efficacy, Localisation and Cell Death Pathways*, *J Photochem Photobiol B* **84**, 1–14

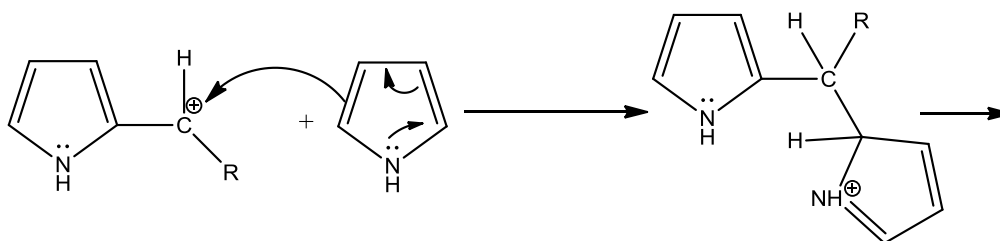
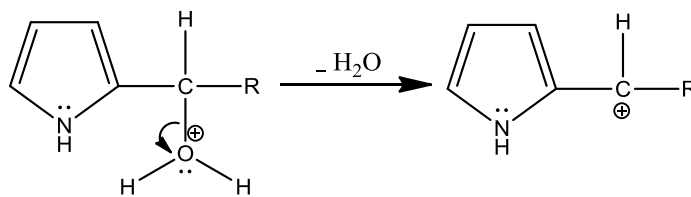
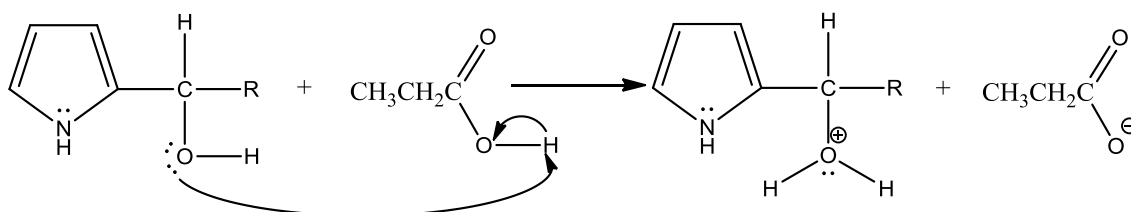
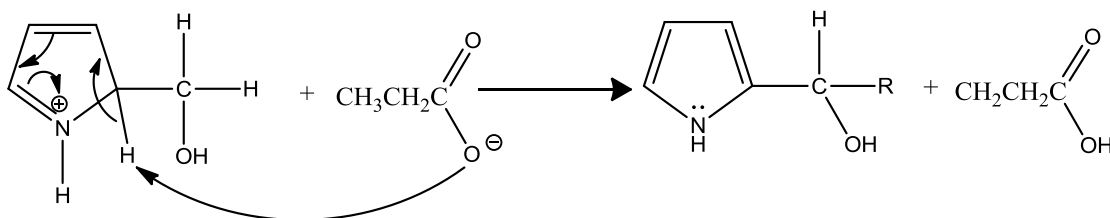
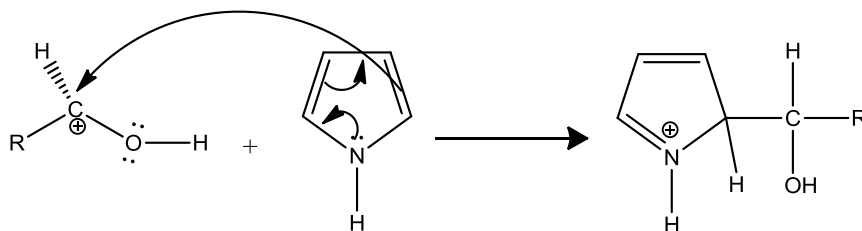
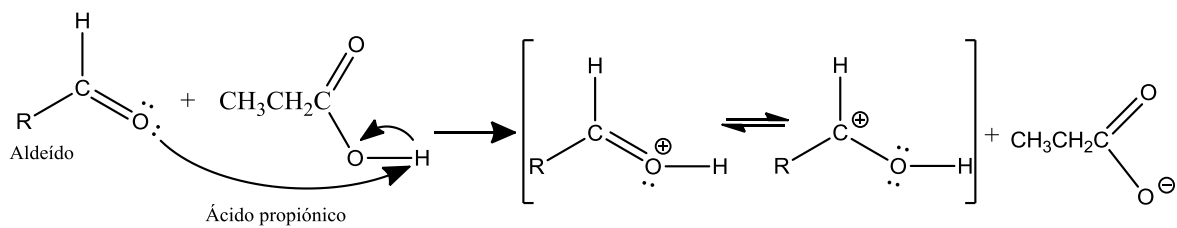
- [205] Rhee, S. et al. (2000), *Synthesis, Structures and Electrochemical Characterization of Ferrocene-substituted Porphyrin and Porphodimethene*, *Inorg Chim Acta* **309**, 49–56
- [206] Manaka, A. et al. (2003), *Chemical Analysis for Small Amounts of Horseradish Peroxidase Using “Porphyrinogen” as a Chromogenic Reagent*, *Anal Chim Acta* **478**, 37–42
- [207] Xi, H. et al. (1994), *Syntheses, Structure, Properties and Chemistry of 1,1-Di(pyrrolyl)ethenes*, *J Chem Soc, Chem Commun*, 791–792
- [208] Sobral, A. et al. (2003), *One-step Synthesis of Dipyrromethanes in Water*, *Tetrahedron Lett* **44**, 3971–3973
- [209] Escribá, P. (2006), *Membrane-lipid Therapy: a New Approach in Molecular Medicine*, *TRENDS Mol Med* **12**, 34–43
- [210] Graves, P. et al. (2002), *Discovery of Novel Targets of Quinoline Drugs in the Human Purine Binding Proteome*, *Mol Pharmacol* **62**, 1364–1372
- [211] Holla, B. et al. (2005), *Synthesis and Characterization and Antibacterial Activity Studies on Some Fluorine Containing Quinoline-4-Carboxylic Acids and Their Derivatives*, *Indian J Chem* **44**, 2114–2119
- [212] Shi, A. et al. (2008), *Synthesis and Anti-Breast Cancer Activities of Substituted Quinolines*, *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 3364–3368
- [213] Amaravathi, M. et al. (2007), *Synthesis of meso-tetrakis(2-chloroquinolin-3-yl) Porphyrins*, *Arkivoc* **1**, 148–153
- [214] Breitmaier, E. (2002), *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Ltd, Nova lorque
- [215] Chen, Y. et al. (2001), *Active oxygen generation and photo-oxygenation involving temporfin (m-THPC)*, *Dyes Pigm* **51**, 63–69
- [216] MacRobert, A. et al. (1989), *What Are the Ideal Photoproperties for a Sensitizer?*, *Novartis Foundation Symposium*
- [217] Yamamoto, J. et al. (2006), *Monitoring of Singlet Oxygen Is Useful for Predicting the Photodynamic Effects in the Treatment for Experimental Glioma*, *Clin Cancer Res* **12**, 7138–7139
- [218] Shiavon, M. et al. (2000), *Synthesis and Characterization of a Novel Series of meso (Nitrophenyl) and meso (Carboxyphenyl) Substituted Porphyrins*, *J Braz Chem Soc* **11**, 458–466
- [219] Dorian, C. et al. (2011), *System and Method for Analyzing Samples Labeled with 5, 10, 15, 20 Tetrakis(4-Carboxyphenyl) Porphine (TCPP)*, US2011/0014647 A1
- [220] Castriciano, M. et al. (2006), *Structural Features of meso-Tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin Interacting with Amino-Terminated Poly(propylene oxide)*, *Macromolecules* **39**, 5489–5496
- [221] Cole D. et al. (1992), *Method of using 5,10,15,20-tetrakis(carboxyphenyl)porphine for Detecting Cancers of the Lung*, US5162231 A
- [222] Strauss, W. et al. (1994), *Meso-tetra (4-carboxyphenyl) Porphyrin: Fluorescence Behavior, Photodynamic Treatment, and Tissue Distribution*, *Proc Spie* **2078**, 515–520
- [223] Bonnet, R. et al. (1988), *Photophysical Properties of meso-Tetraphenylporphyrin and Some meso-Tetra(Hydroxyphenyl)Porphyrins*, *Photochem Photobiol* **48**, 271–276
- [224] Marchal, S. et al. (2004), *Modality of Cell Death Induced by Foscan®-based Photodynamic Treatment in Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT29*, *Biochem (Mosc)* **69**, 57–63
- [225] Mojziso, H. et al. (2007), *Structural and Physico-Chemical Determinants of the Interactions of Macrocyclic Photosensitizers with Cells*, *Eur Biophys J* **36**, 943–953
- [226] Peng, C. et al. (2010), *The Synthesis and Photodynamic Properties of meso-substituted, Cationic Porphyrin Derivatives in HeLa Cells*, *Dyes Pigm* **84**, 140–147
- [227] Morlière, P. et al. (1990), *Synthesis, Cellular Uptake of, and Cell Photosensitization by a Porphyrin Bearing a Quinoline Group*, *J Photochem Photobiol B* **5**, 49–67
- [228] Gomer, C. (ed) (2010), *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols*, Humana Press Inc, Nova Jérсія
- [229] Jensen, T. et al. (2010), *Effect of Overall Charge and Charge Distribution on Cellular Uptake, Distribution and Phototoxicity of Cationic Porphyrins in HEp2 Cells*, *J Photochem Photobiol B* **100**, 100–111
- [230] Hu, Z. et al. (2009), *meso-tetra(carboxyphenyl) Porphyrin (TCPP) Nanoparticles Were Internalized by SW480 Cells by a Clathrin-mediated Endocytosis Pathway to Induce High Photocytotoxicity*, *Biomed Pharmacother* **63**, 155–164
- [231] Besaratinia, A. et al. (2007), *Riboflavin Activated by Ultraviolet A1 Irradiation Induces Oxidative DNA Damage-mediated Mutations Inhibited by Vitamin C*, *PNAS* **104**, 5953–5958
- [232] Queiroz, K. et al. (2007), *A Possible Anti-proliferative and Anti-metastatic Effect of Irradiated Riboflavin in Solid Tumours*, *Cancer Lett* **258**, 126–134

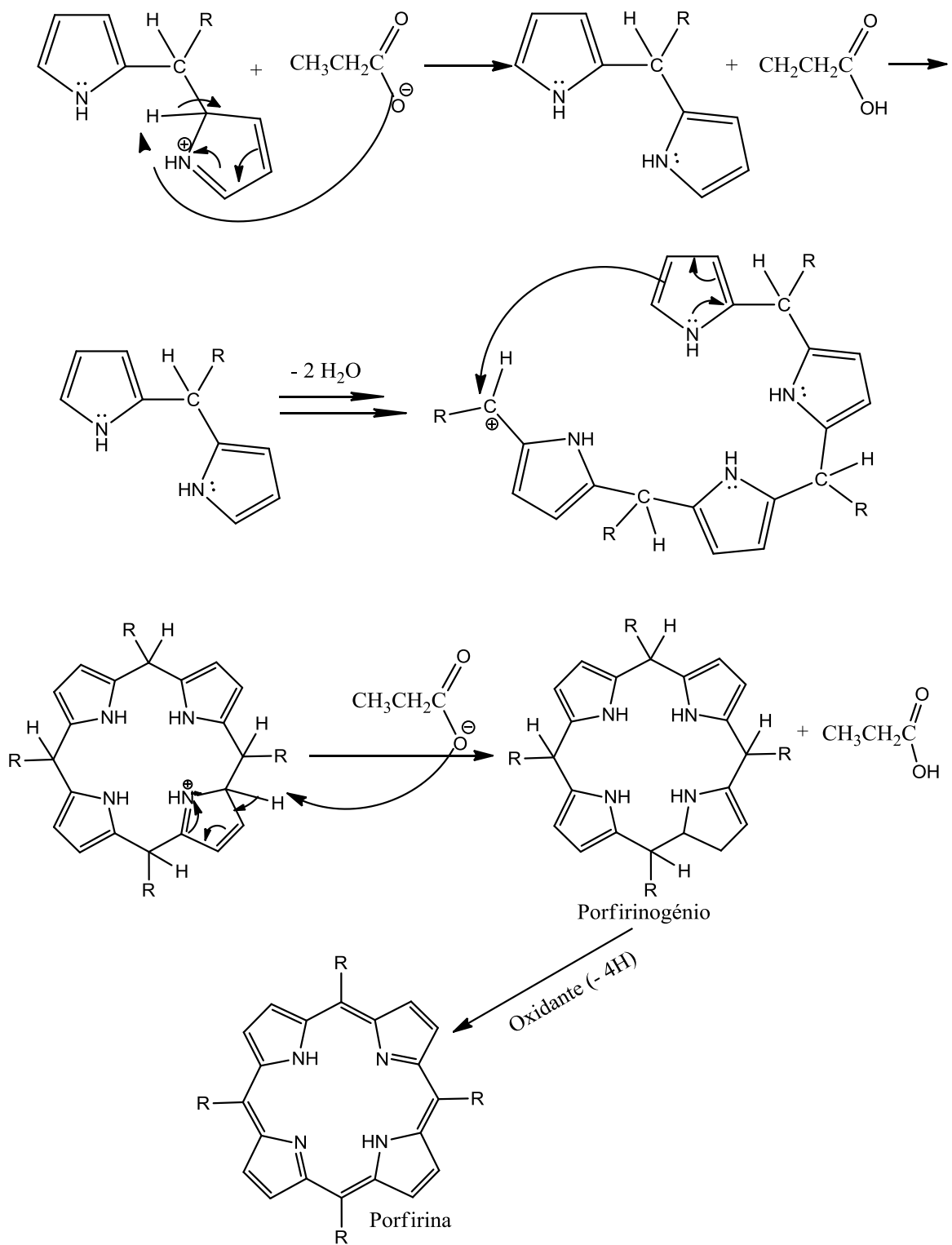
- [233] Sato, K. *et al.* (1995), *The Primary Cytotoxicity in Ultraviolet-a-Irradiated Riboflavin Solution is Derived from hydrogen Peroxide*, *J Invest Dermatol* **105**, 608–612
- [234] Maguire, A. *et al.* (2011), *Medium-mediated Effects Increase Cell Killing in a Human Keratinocyte Cell Line Exposed to Solar-simulated Radiation*, *Int J Radiat Biol* **87**, 98–111
- [235] Alvarez, M. *et al.* (2005), *Photodynamic Damages Induced by a Monocationic Porphyrin Derivative in a Human Carcinoma Cell Line*, *I J Biochem Cell Biol* **37**, 2504–2512
- [236] Josefsen, J. e Boyle, R. (2012), *Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy*, *Imaging and Theranostics*, *Theranostics* **2**, 916–964
- [237] Dabrowski, J. *et al.* (2012), *Combined Effects of Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical in Photodynamic Therapy with Photostable Bacteriochlorins: Evidence from Intracellular Fluorescence and Increased Photodynamic Efficacy in vitro*, *Free Radic Biol Med* **52**, 1188–1200
- [238] Pegaz, B. *et al.* (2005), *Encapsulation of Porphyrins and Chlorins in Biodegradable Nanoparticles: The effect of Dye Lipophilicity on the Extravasation and the Photothrombic Activity. A comparative Study*, *J Photochem Photobiol Biol B* **80**, 19–27
- [239] Piette, J. *et al.* (2003), *Cell Death and Growth Arrest in Response to Photodynamic Therapy with Membrane-bound Photosensitizers*, *Biochem Pharm* **66**, 1651–1659
- [240] Mikeš, J. *et al.* (2007), *Necrosis Predominates in the Cell Death of Human Colon Adenocarcinoma HT29 Cells Treated under Variable Conditions of Photodynamic Therapy with Hypericin*, *Photochem Photobiol Sci* **6**, 758–766
- [241] Rodrigues, N. *et al.* (1990), *p53 Mutations in Colorectal Cancer*, *Proc Natl Acad Sci* **87**, 7755–7759
- [242] Hao, E. *et al.* (2009), *Synthesis of Porphyrin-carbohydrate Conjugates Using “click” Chemistry and their Preliminary Evaluation in Human Hep2 Cells*, *J Porphyrins Phthalocyanines* **13**, 51–59
- [243] Ben-Dror, S. *et al.* (2006), *On the Correlation Between Hydrophobicity, Liposome Binding and Cellular Uptake of Porphyrin Sensitizers*, *Photochem Photobiol* **82**, 695–701
- [244] Miyamoto, Y. *et al.* (1999), *Comparison of Phototoxicity Mechanism Between Pulsed and Continuous Wave Irradiation in Photodynamic Therapy*, *Photochem Photobiol B* **53**, 53–59
- [245] Ortel, B. *et al.* (2009), *Molecular Mechanisms of Photodynamic Therapy*, *Front Biosci* **14**, 4157–4172

7. Anexos

ANEXO I

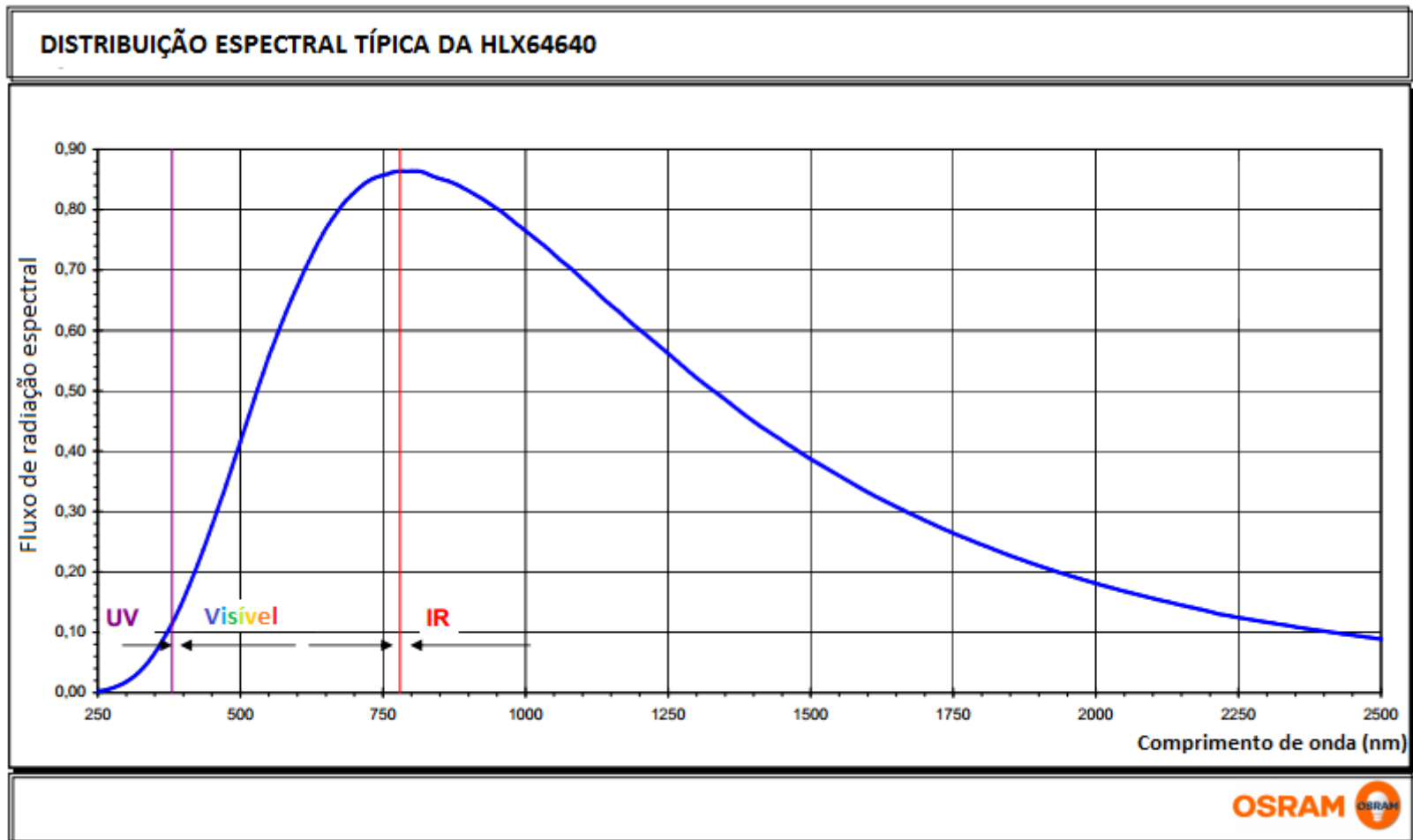
Mecanismo geral para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas (**R** = grupo substituinte do aldeído), pelo método de Adler-Longo.





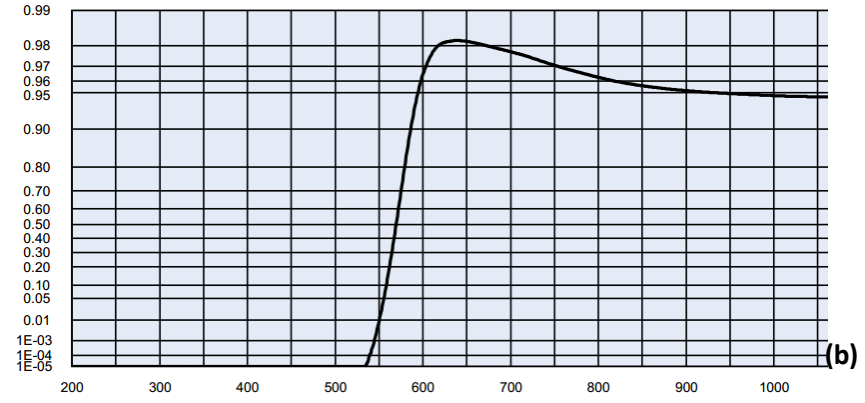
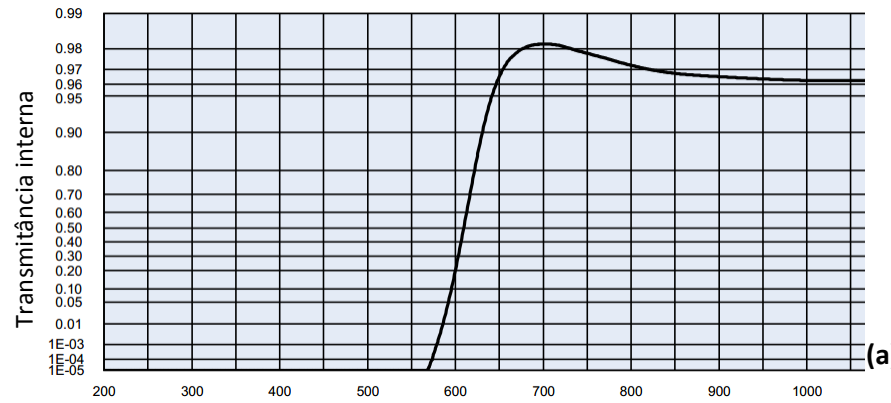
ANEXO II:

Espectro de emissão da lâmpada HLX64640 utilizada na irradiação das culturas de células HT29



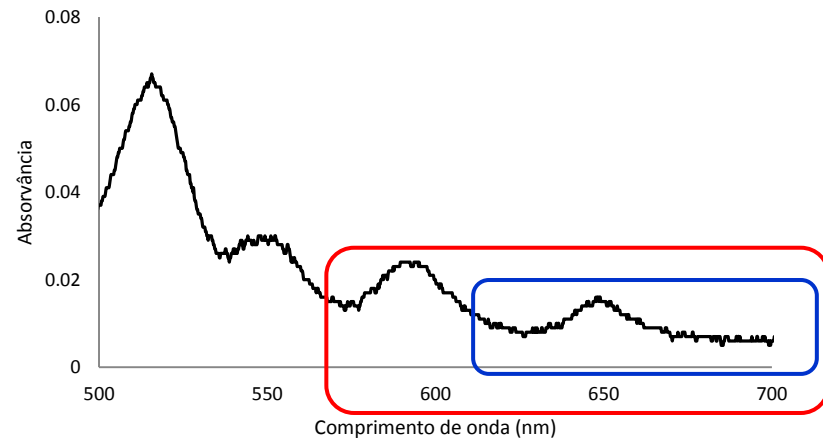
ANEXO III:

Propriedades ópticas do filtro **RG₆₁₀** (a) e do filtro **OG₅₇₀** (b) (transmitância em função do comprimento de onda).

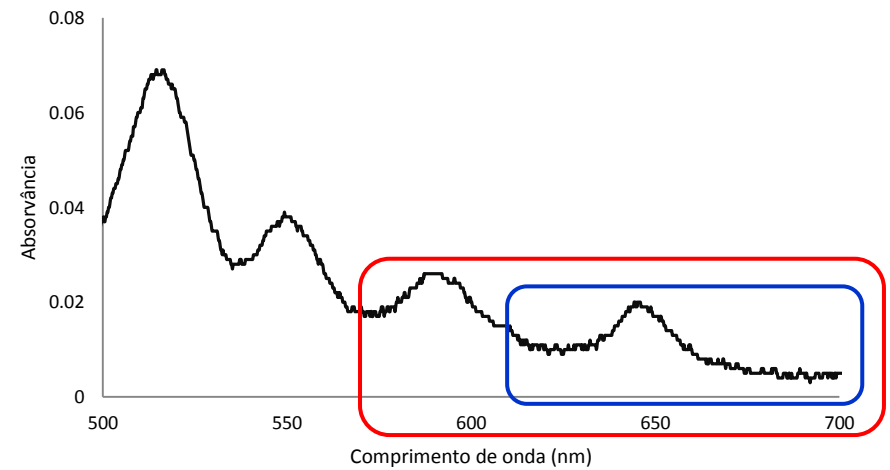


Comprimento de onda (nm)

Zona de interação da luz que pode ser transmitida através dos filtros **RG₆₁₀** (azul) e **OG₅₇₀** (vermelho) com os espectros das porfirinas 2-TQP e TCPP.



Espectro de absorção UV-Vis da 2-TQP em THF.



Espectro de absorção UV-Vis da TCPP em THF.