



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Joana Sofia da Silva Duarte

**CARATERIZAÇÃO DE  
FOTOSSENSIBILIZADORES PARA TERAPIA  
FOTODINÂMICA**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal  
orientada pelo Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut  
Moreira e apresentada ao Departamento de Química**

Outubro de 2021

Faculdade de Ciências Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

# Caraterização de Fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica

Joana Sofia da Silva Duarte

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Orientação: Prof. Dr. Luis G. Arnaut

Novembro de 2021



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



## Agradecimentos

---

Ao Professor Doutor Luís Arnaut , pela orientação e ajuda na realização da dissertação.

Aos professores do grupo de Química Orgânica do Departamento de Química a da Universidade de Coimbra pela cedência das porfirinas e clorinas.

À Doutora Lúcia Silva e Doutor Fábio Schaberle por todo o apoio oferecido no laboratório.

Ao grupo de investigação, pelo apoio e ajuda na realização da dissertação.

Ao Hugo, por todo o carinho, motivação e preocupação demonstrado ao longo do trabalho.

Aos meus pais e irmã, por demonstrarem interesse no trabalho, preocupação e muito apoio moral.

Aos meus amigos que marcaram o meu percurso académico.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha avó, que apesar de já não estar entre nós, continuará a ser um pilar importante na minha vida.

## Resumo

---

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma das grandes áreas da investigação no que diz respeito à descoberta de novos medicamentos antineoplásicos. Esta também tem sido explorada para outras aplicações, como o tratamento de doenças virais, bacterianas, dermatológicas e arteriosclerose. A grande vantagem da PDT na clínica é inatividade biológica do fotossensibilizador (PS) no escuro. Assim apenas a zona irradiada apresenta efeitos terapêuticos, diminuindo os efeitos colaterais. A PDT é constituída por 3 variáveis diferentes, sendo estas o PS, dose de luz administrada e oxigénio. Para tal, existe a constante procura de novos PS, tentando otimizar a eficácia e seletividade destes.

Neste projeto procurou-se estudar as características fotoquímicas e fotofísicas, bem como o comportamento *in vitro* de novos fotossensibilizadores derivados da porfirina. Este trabalho teve um foco maior na forma neutra da porfirina a estudar, porém também foram realizados alguns estudos na sua forma dicatiónica e em clorinas similares.

A porfirina neutra apresentou um elevado tempo de vida do estado tripleto, comparado a outras porfirinas. Para soluções saturadas em azoto de DMSO,  $\tau_T^0$  ( $\mu\text{s}$ ) = 89, de etanol  $\tau_T^0$  ( $\mu\text{s}$ ) = 53 e em etanol arejado o tempo de vida do estado tripleto baixou para  $\tau_T$  ( $\mu\text{s}$ ) = 0,41.

Em relação ao rendimento quântico do oxigénio singleto,  $\Phi\Delta = 1,05$  em DMSO e  $\Phi\Delta = 0,70$  em etanol. O valor em DMSO é de 1 dentro da incerteza experimental.

Nos estudos *in vitro* a porfirina neutra (5,10-(di-2-(1-metil)imidazol)porfirina) apresentou uma rápida internalização por parte da linha celular CT26, sendo que 1 minuto após o composto ser administrado, a amostra já apresentava cerca de 20% do sinal observado às 24h. Aos 5min este é cerca de 50%. Este sinal continua a crescer gradualmente até à 1h de incubação onde o valor é similar com o das 24h. Também foi observado que a clorina neutra (5,10-(di-2-(1-metil)imidazol)clorina) apresenta um perfil de internalização similar. Já a porfirina (5,10-(di-2-(1,3-dimetil)imidazol)porfirina) e clorina dicatiónicas (5,10-(di-2-(1,3-dimetil)imidazol)clorina) demonstraram uma baixa internalização por parte da linha celular CT26.

Nos estudos de citotoxicidade a porfirina catiónica não apresentou toxicidade entre a 3,125  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , tal como a clorina dicatiónica. A porfirina e clorina neutra apresentam alguma toxicidade nas concentrações mais elevadas, sendo porfirina neutra a mais tóxica.

Na fototoxicidade para concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , a diferença entre 6 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  não é significativa, na porfirina neutra, sendo a viabilidade celular cerca de 20 e 10%, respectivamente.

## Abstract

---

Photodynamic therapy (PDT) is one of the great areas of research regarding the discovery of new anticancer drugs. It is also used for other applications, such as the treatment of viral, bacterial, dermatological and arteriosclerosis diseases. One of the great advantages of PDT, in the clinic, is the biological inactivity of the photosensitizer (PS) in the dark. Thus, only the irradiated zone has therapeutic effects, reducing side effects. PDT is made of 3 different variables, these being the PS, light dose and oxygen. Therefore, there exists a constant search for a new PS, with the aim to optimize their effectiveness and selectivity.

In this project, we sought to study the photochemical and photophysical characteristics, as well as the *in vitro* behavior of new porphyrin-derived photosensitizers. This work had a greater focus on the neutral form of the porphyrin, but some studies were also carried out on its dicathionic form and on similar chlorins.

The neutral form porphyrin had a long triplet state lifespan compared to other porphyrins. For the nitrogen saturated DMSO solutions,  $\tau_T^0$  ( $\mu\text{s}$ ) = 89, ethanol  $\tau_T^0$  ( $\mu\text{s}$ ) = 53 and for ethanol exposed to the oxygen the lifespan of the triplet state decreased to  $\tau_T$  ( $\mu\text{s}$ ) = 0,41.

In relation to the quantum yield of singlet oxygen,  $\Phi\Delta = 1.05$  in DMSO and  $\Phi\Delta = 0.70$  in ethanol. The value of DMSO is 1 within experimental uncertainty.

In *in vitro* studies, neutral form porphyrin (5,10-(di-2-(1-methyl)imidazol)porphyrin) showed rapid internalization by the cell line CT26. One minute after the compound was placed, the sample already showed about 20% of the signal observed at 24h. At 5min this is already about 50%. This signal continues to grow gradually until 1h of incubation where the value is similar to that at 24h. A similar internalization profile was also observed in the neutral form chlorin (5,10-(di-2-(1-methyl)imidazol)chlorin). Dicationic porphyrin (5,10-(di-2-(1,3-dimethyl)imidazol)porphyrin) and chlorin (5,10-(di-2-(1,3-dimethyl)imidazol)chlorin), on the other hand, showed low internalization by the cell line.

In cytotoxicity studies, cationic porphyrin did not show toxicity between 3,125  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ , as did dicathionic chlorine. Neutral form porphyrin and chlorin showed some toxicity at higher concentrations, with the porphyrin being the most toxic.

In phototoxicity, at concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$ , the difference between 6 and 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  is not significant, in the neutral porphyrin, with cell viability being around 20 and 10%, respectively.



# Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Terapia Fotodinâmica.....	1
1.1.2 Fundamentos da PDT.....	2
1.1.3 Fotossensibilizadores.....	3
1.1.3 Porfirinas.....	4
2. Secção experimental.....	7
2.1 Objetivos e plano de trabalho.....	7
2.2 Secção Experimental.....	7
2.2.1 Reagentes.....	7
2.2.2 Fotossensibilizadores.....	8
2.2.3 Ensaios Fotofísicos e Fotoquímicos.....	9
2.2.3.1 Coeficiente de absorvidade molar.....	9
2.2.3.2 Rendimento quântico de fluorescência.....	9
2.2.3.3 Rendimento Quântico Oxigénio singleto.....	9
2.2.3.4 Tempo de vida do estado tripleto.....	10
2.2.4 Ensaios <i>In Vitro</i> .....	10
2.2.4.1 Linhas celulares.....	10
2.2.4.2 Internalização do fotossensibilizador.....	10
2.2.4.3 Microscopia Confocal.....	11
2.2.4.4 Citotoxicidade do fotossensibilizador.....	11
2.2.4.5 Fototoxicidade do fotossensibilizador.....	12
3. Resultados.....	13
3.1 Espectros UV-Vis em DMSO.....	13
3.1.1 Coeficiente de Absortividade molar em DMSO.....	13
3.1.2 Coeficiente de Absortividade molar em Etanol.....	15
3.2 Espectros de Fluorescência.....	16
3.3 Rendimento Quântico Oxigénio Singleto.....	18
3.4 Tempo de Vida do Tripleto.....	19

<b>3.5 Internalização do fotossensibilizador</b> .....	20
<b>3.5.1 Porfirina Neutra</b> .....	20
<b>3.5.2 Clorina Neutra</b> .....	21
<b>3.5.3 Porfirina Dicatiónica</b> .....	21
<b>3.5.4 Clorina Dicatiónica</b> .....	22
<b>3.6 Microscopia Confocal</b> .....	22
<b>3.6.1 24horas</b> .....	22
<b>3.6.2 1 hora</b> .....	23
<b>3.7 Citotoxicidade</b> .....	24
<b>3.8 Fototoxicidade</b> .....	24
<b>4. Discussão</b> .....	26
<b>5. Conclusão</b> .....	29
<b>6. Bibliografia</b> .....	30

## Índice Figuras

Figura 1. Digrama de Jablonski. (Tzerkovsky, Dmitr 2018).....	2
Figura 2. Sistema de deslocalização da porfirina. ....	4
Figura 3. Estrutura química da porfirina, clorina e bacterioclorina (Esquerda para a direita.).....	5
Figura 4. Espectro de Absorção e Emissão da TPP. (Uttamlal, Mahesh 2008) .....	5
Figura 5. Espectros de absorção da porfirina, clorina e bacterioclorina (Hamblin, Michael 2016).....	6
Figura 6. 5,10-(di-2-(1-methyl)imidazol)porphyrin .....	8
Figura 7. 5,10-(di-2-(1,3-dimethyl)imidazol)porphyrin .....	8
Figura 8. Espectro UV-Vis, normalizado, da Porfirina Neutra e Dicatiónica em DMSO. ....	13
Figura 9. Espectros UV-Vis da solução A1-1 .....	14
Figura 10. Espectros UV-Vis da solução A2-1 .....	14
Figura 11. Reta de regressão linear da solução A1-1. ....	14
Figura 12. Reta de regressão linear da solução A2-1. ....	14
Figura 13. Espectros UV-Vis da solução A1-2 .....	15
Figura 14. Espectros UV-Vis da solução A2-2 .....	15
Figura 15. Reta de regressão linear da solução A1-2 .....	15
Figura 16. Reta de regressão linear da solução A2-2 .....	15
Figura 17. Espectro de emissão, normalizado, da porfirina neutra em DMSO e Etanol	16
Figura 18. Espectro UV-Vis da TPP e Porfirina .....	16
Figura 19. Rendimento quântico de fluorescência em função da absorvância.....	17
Figura 20. Decaimento exponencial .....	18
Figura 21. Reta de regressão linear, fenalenona em DMSO. ....	18
Figura 22. Reta de regressão linear, porfirina neutra em DMSO.....	18
Figura 23. Reta de regressão linear, porfirina neutra em DMSO.....	19
Figura 24. Reta de regressão linear, fenalenona em etanol. ....	19
Figura 25. Decaimento exponencial do estado tripleto, 440 nm, com tempo de vida $1,02 \times 10^{-5}$ segundos .....	19

Figura 26. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação, em três experiências diferentes (1a -1c), como os respectivos histogramas (2a – 2c). Porfirina Neutra. ....	20
Figura 27. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respectivos histogramas. Clorina Neutra.....	21
Figura 28. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respectivos histogramas. Porfirina Dicatiónica. ....	21
Figura 29. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respectivos histogramas. Clorina Dicatiónica. ....	22
Figura 30. Micrográficos fluorescentes – a: controlo; b: porfirina neutra; porfirina catiónica.....	22
Figura 31. Micrográficos fluorescentes - Porfirina Neutra $\Delta t = 60$ minutos.....	23
Figura 32. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, de diferentes fotossensibilizadores. ....	24
Figura 33. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, Porfirina Catiónica. ....	25
Figura 34. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, Porfirina Neutra .....	25

## Abreviaturas

---

PDT: Terapia fotodinâmica

PS: Fotossensibilizador

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Dubbelco's Modified Eagle's Medium

UV-Vis: Espectroscopia de absorção Ultravioleta-Visível

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TPP: 5,10,15,20-tetrafenilporfirina

PBS: Tampão fosfato-salino

S0: Estado fundamental

S1: Estado excitado

ISC: Cruzamento Intersistemas

T1: Estado tripleto

VR: Relaxamento vibracional

# 1. Introdução

## 1.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica pouco invasiva, com aplicações na clínica, que consiste na interação entre luz, um fotossensibilizador (PS) e oxigénio de que resulta a geração fotoquímica de espécies reativas de oxigénio (ROS). Alguns exemplos da utilização desta é em tratamentos antineoplásicos, doenças virais, bacterianas, dermatológicas e doenças autoimunes como artrite reumatoide. <sup>[1-4]</sup>

### 1.1.1 PDT na História

A utilização de luz com forma de tratamento médico remota a várias civilizações antigas como a egípcia, grega, romana e chinesa. Esta técnica era centrada na exposição do corpo à luz solar, sendo então denominada na altura como helioterapia. Durante o século 19, médico suíço Arnold Rikli voltou a reintroduzir a utilização de exposição solar como tratamento para doenças crónicas e outras desordens funcionais. Rikli é assim considerado o pioneiro no que consideramos atualmente como fototerapia moderna.

Já a utilização de fotossensibilizador no processo fotodinâmico foi estudado por Oscar Raab em 1898. Raab examinou os efeitos da luz e de pigmentos em paramécia. O PS usado foi a acridina e verificou-se que na presença de luz e acridina tinha uma eficácia maior na morte da paramécia do que quando esta era usada individualmente ou quando o PS era primeiro exposto à luz inicialmente e só depois adicionado à paramécia. Desta forma foi possível concluir que a luz ativava a acridina, matando a paramécia.

Posteriormente Von Tappeiner continuou a pesquisa de Raab, juntamente com dermatologista Jesionek, utilizando eosina como fotossensibilizador no tratamento do cancro da pele. Em 1904, von Tappeiner e Jodlbauer reportaram que a presença de oxigénio era requerida no processo de fotossensibilização. Por fim, em 1907 von Tappeiner referiu-se ao termo terapia fotodinâmica como o processo de fotossensibilização dependente de oxigénio.

Atualmente, porfirinas e os seus diferentes derivados são o grupo de fotossensibilizador mais estudados e utilizados na terapia fotodinâmica. Estas possuem uma diversa gama de comprimentos de onda onde a luz é absorvida, incluindo a janela fototerapêutica de 650-

800nm. Scherer, em 1841, descobriu a primeira porfirina enquanto realizava estudos com sangue, sendo esta a hematoporfirina. [5-9]

### 1.1.2 Fundamentos da PDT

Os fotossensibilizadores, quando eletronicamente excitados, transferem um elétron para o oxigênio molecular ou outras espécies aceitadoras de elétrons presentes, levando à formação de superóxidos e radicais (reação do tipo I). Poderá também ocorrer a transferência de energia eletrônica para o oxigênio no estado fundamental, formando oxigênio singleto (reação do tipo II).

Inicialmente no processo fotodinâmico, ocorre a absorção de um fóton ao comprimento de onda apropriado, originando a produção de uma espécie do PS num estado eletronicamente excitado (S1), este possui um tempo de vida reduzido. O PS pode então decair para o estado fundamental (S0) emitindo luz, por fluorescência ou por cruzamento intersistemas (ISC) converter para um estado tripleto (T1) onde ocorre o relaxamento vibracional (VR). No estado T1, as moléculas têm um maior tempo de meia-vida, permitindo que ocorram as reações do tipo I ou II, senão podem voltar ao estado S0 por processos não radiativos ou fosforescência. (Figura 1).

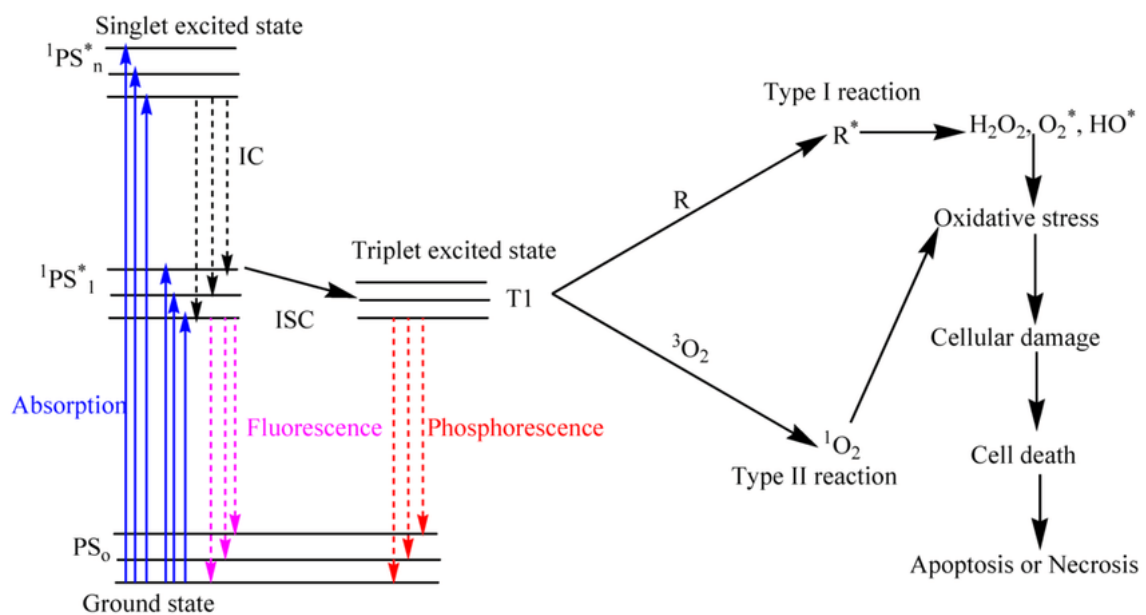


Figura 1. Diagrama de Jablonski. (Tzerkovsky, Dmitri 2018)

Assim nas reações tipo I existe a transferência de um elétron ou átomo de hidrogénio do PS, no estado tripleto, para substratos celulares formando radicais livres. Estes irão interagir com o oxigénio molecular presente formando espécies reativas de oxigénio (ROS). Entre estas encontra-se o superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ). Os ROS causam então dano oxidativo ao sistema biológico.

Na reação tipo II, existe transferência de energia diretamente entre o PS e o oxigénio molecular. Desta reação resulta a formação de oxigénio singleto *in situ*. Uma vez que o oxigénio singleto é muito reativo e tem um tempo de vida curto, este irá reagir com as moléculas na sua proximidade. Uma vez que a reação tipo II consiste na transferência de energia entre PS e oxigénio, o PS exibe características catalíticas, podendo voltar a originar oxigénio singleto desde que haja a presença de luz e oxigénio.

No sistema biológico, apesar de ambas as reações poderem ocorrer, uma costuma dominar em detrimento da outra. Apesar da reação II ser considerada a principal responsável pelo dano nas células, fatores como as características do PS e a presença de oxigénio/substratos celulares poderão influenciar.

Devido à grande variedade de utilidades para a PDT, é necessária a escolha adequada do fotossensibilizador a utilizar, como também a irradiação. <sup>[10-13]</sup>

### **1.1.3 Fotossensibilizadores**

Os fotossensibilizadores (PS) são então moléculas biologicamente inativas no escuro, sendo ativadas após excitação de luz. Idealmente, estes possuem um pico de excitação entre os 650 a 850 nm, onde os tecidos biológicos são mais transparentes à luz. A primeira geração de PS a serem utilizados eram derivados da hematoporfirina, exemplos sendo Photofrin®. Estes fotossensibilizadores apesar de terem um pico onde absorvem na região do vermelho, onde esta é foto-ativa, este é de fraca intensidade. Também possuem uma baixa seletividade para o tecido tumoral. Estes fotossensibilizadores apresentavam problemas em relação à pureza da substância, não sendo possível isolar a principal substância ativa.

Para melhorar alguns dos problemas dos PS de 1ª geração, foram sintetizados derivados de porfirinas reduzidas como clorinas e bacterioclorina, ftalocianinas, nartolocianinas e benzoporfirinas. As vantagens das clorinas e bacterioclorinas é que estas apresentam uma banda de absorção intensa na região do vermelho (Clorinas 660-690 e Bacterioclorinas 730-760). As ftalocianinas e naftalocianinas apresentam uma banda



intensa entre 670 nm e 820 nm, também na zona do vermelho. Já as benzoporfirinas tem uma boa seletividade para células neoplásicas.

Assim, algumas das características importantes num PS são:

- Pico de absorção na zona do vermelho ( $\lambda > 650$  nm), aumentando a penetração nos tecidos biológicos;
- Baixa toxicidade na ausência de luz ;
- Fotoestabilidade;
- Solúvel em sistemas biológicos;
- Seletividade para o alvo terapêutico;
- Síntese fácil com um elevado rendimento e alta pureza;
- Elevado rendimento de oxigénio singleto ou produção de ROS;
- Não mutagénico e não genotóxico.

A eficácia do fotossensibilizador é então dependente da dose de luz utilizada, a sua estrutura química e a habilidade de se ligar ao alvo terapêutico. <sup>[14-17]</sup>

### 1.1.3 Porfirinas

As porfirinas são caracterizadas pelo seu macrociclo aromático, composto por 20 átomos de carbono e 4 átomos de azoto. O anel porfirínico é assim constituído por 4 anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metilénicas. O macrociclo contém 22 eletrões  $\pi$ , dos quais 18 participam no sistema deslocalização (Figura 2) o que obedece à regra de Hückel ( $4n+2$  eletrões  $\pi$ ) para a aromaticidade.

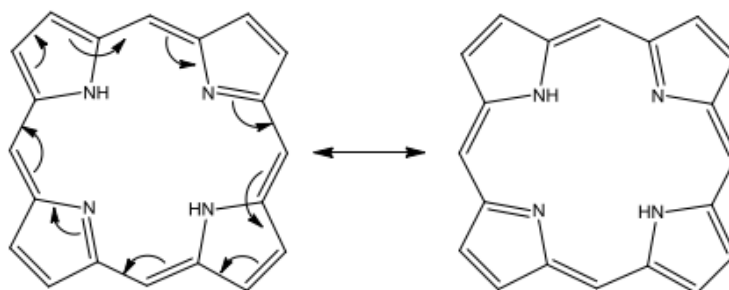


Figura 2. Sistema de deslocalização da porfirina.

As duas ligações duplas que não participam no sistema deslocalização podem ser reduzidas dando origem a novos macrociclos tetrapirrólicos, sendo que uma redução leva à formação de uma clorina e duas reduções a bacterioclorina (Figura 3).

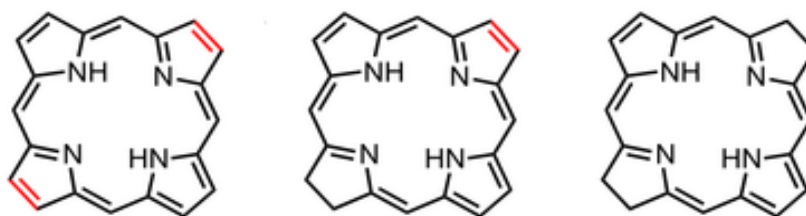


Figura 3. Estrutura química da porfirina, clorina e bacterioclorina (Esquerda para a direita.)

Em relação à absorção, as porfirinas apresentam uma banda de absorção intensa na região do visível (400-450nm) designada de banda Soret e quatro bandas de menor intensidade (500-700nm), chamadas bandas Q (Figura 4). As bandas são influenciadas pelos grupos substituintes presentes diferentes no caso de metaloporfirinas, não metálico no meio do macrociclo.

Para detectar a emissão de fluorescência, a porfirina é excitada no comprimento de onda correspondente à banda Soret. Os espectros são compostos por duas bandas na região do vermelho, aproximadamente entre os comprimentos de onda de 650 e 720nm (Figura 4).

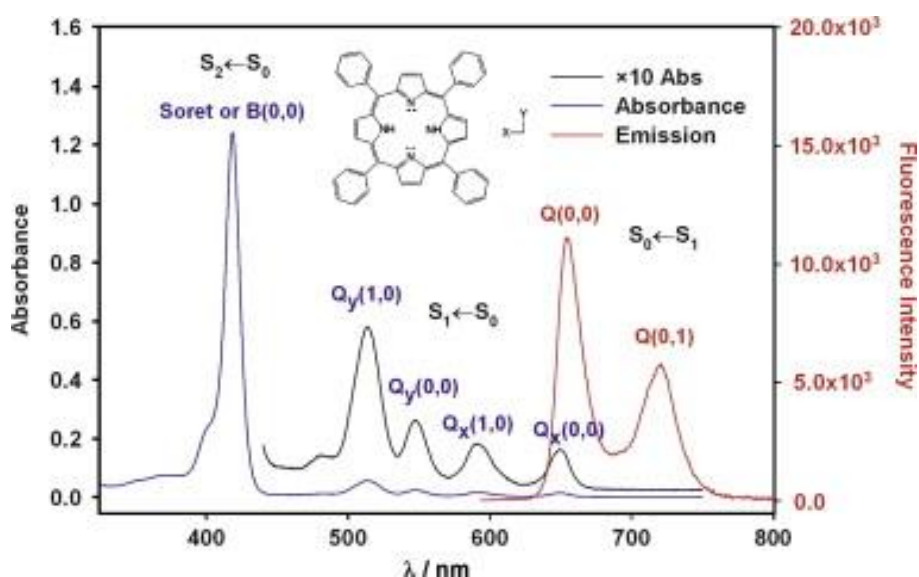


Figura 4. Espectro de Absorção e Emissão da TPP. (Uttamlal, Mahesh 2008)

Já as clorinas e bacterioclorina apresentam bandas de absorção intensa entre os 600-690 nm e 730-760 nm, como já foi referido anteriormente (Figura 5). [18-20]

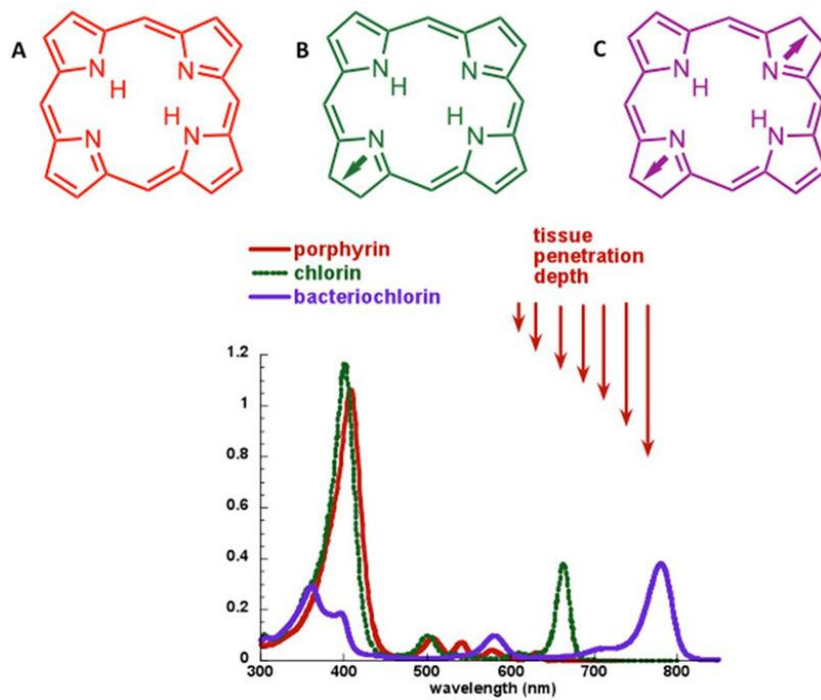


Figura 5. Espectros de absorção da porfirina, clorina e bacterioclorina (Hamblin, Michael 2016).

## 2. Secção experimental

### 2.1 Objetivos e plano de trabalho

Com o objetivo de avaliar o potencial da porfirina sintetizada como fotossensibilizador é necessário estudar esta em relação às suas interações com a luz e o seu comportamento no sistema biológico. Este trabalho teve um foco maior na forma neutra da porfirina, porém também foram realizados alguns estudos na sua forma dicatiónica e realizadas algumas comparações a uma clorina similar.

O PS neutro, 5,10-(di-2-(1-methyl)imidazol)porphyrin, foi então submetido a uma série de ensaios fotoquímicos e fotofísicos de forma a caracterizar este. A partir os espectros de absorção e fluorescência, além de estudar os picos de absorção e emissão, é possível calcular o coeficiente de absorvidade molar e rendimento quântico de fluorescência, respetivamente.

Em relação às espécies reativas de oxigénio, foi utilizada a fotólise por relâmpago e a fosforescência resolvida no tempo para determinar o tempo de vida do oxigénio singleto e o tempo de vida do estado tripleto.

Nos estudos *in vitro* com a linha celular CT26, foi testada a velocidade de internalização dos quatro PS, de forma a comparar a internalização da forma neutra versus a forma catiónica, como também entre a porfirina e a clorina.

Através da microscopia confocal, foi estudado o comportamento do PS neutro na primeira hora de internalização, ao fim de 24 horas e o PS também ao fim de 24 horas. Os quatro fotossensibilizadores foram analisados em relação à sua toxicidade na ausência de luz. Já as porfirinas também foram testadas para fototoxicidade a diferentes doses de luz.

### 2.2 Secção Experimental

#### 2.2.1 Reagentes

Os reagentes comerciais foram utilizados diretamente, não tendo sido efetuadas purificações adicionais destes.

Reagentes: Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma Aldrich; Etanol (Et) Sigma Aldrich; Dubbelco's Modified Eagle's Medium (DMEM); Tampão fosfato-salino (PBS) Biomed; HEPES Sigma Aldrich; Bicarbonato de sódio Sigma Aldrich; Penicilina Sigma Aldrich; Tolueno Sigma Aldrich; Tripsina; alamarBlue™ (Resasurina) Invitrogen.

## 2.2.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores utilizados nestes estudos foram preparados pelo grupo de Química Medicinal do Centro de Química de Coimbra. As estruturas das porfirinas utilizadas encontram-se nas figuras 6 e 7.

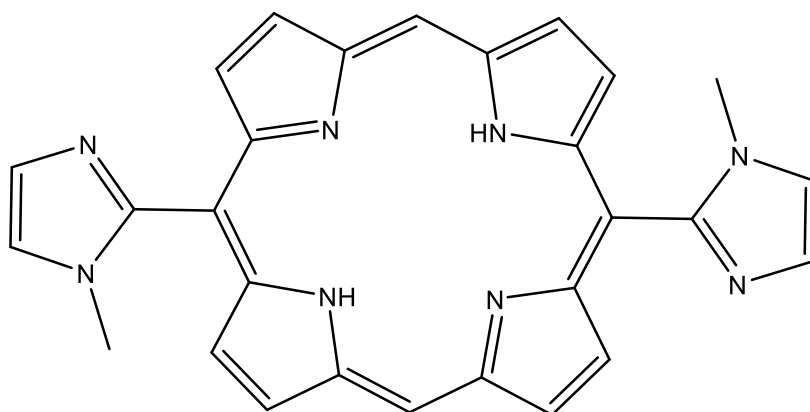


Figura 6. 5,10-(di-2-(1-metil)imidazol)porfirina

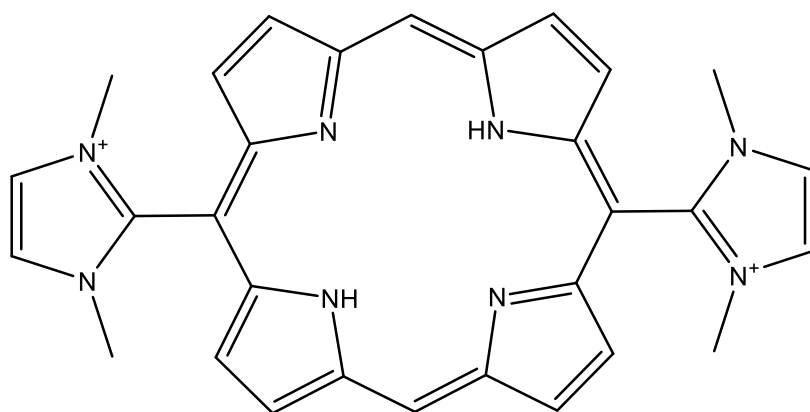


Figura 7. 5,10-(di-2-(1,3-dimetil)imidazol)porfirina

## **2.2.3 Ensaios Fotofísicos e Fotoquímicos**

### **2.2.3.1 Coeficiente de absorvidade molar**

Foram preparados dois stocks do PS, massa iniciais diferentes, para 1mL de DMSO. A solução A1 e A2 foram diluídas para um volume de 3mL DMSO para uma concentração final de  $9,80 \times 10^{-6}$  M e  $8,00 \times 10^{-6}$  respectivamente. As soluções foram novamente diluídas em 5 soluções diferentes, volume final 3mL DMSO (A1-1: 240  $\mu$ L, 140 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 50 $\mu$ L, 12 $\mu$ L; A2-1: 195 $\mu$ L, 135 $\mu$ L, 75 $\mu$ L, 30 $\mu$ L, 15 $\mu$ L). A absorvância das soluções foi medida dentro dos comprimentos de onda 300nm e 700nm (Perkin Elmer LambdaTM 25).

Utilizando o etanol como solvente, os stocks foram diluídos para o volume de 3mL, com concentrações  $7,35 \times 10^{-5}$  e  $7,20 \times 10^{-5}$ . Das duas soluções, 5 diluições foram preparadas para análise (A1-2: 30  $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 2 $\mu$ L; A2-2: 30  $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 2 $\mu$ L), volume final 3mL. Leituras feitas dentro dos 300 e 700 nm.

### **2.2.3.2 Rendimento quântico de fluorescência**

Para determinar o rendimento quântico de fluorescência, foram preparadas 4 soluções de PS (Abs: 0,2, 0,1, 0,01, 0,001) em DMSO e Etanol. Como Referência, soluções de TPP (5,10,15,20-tetrafenilporfirina), em tolueno, foram utilizadas (Abs: 0,1 e 0,01). As soluções foram excitadas a 415 nm e a emissão recolhida entre 600 e 800 nm no fluorímetro (HORIBA Scientific FluoroMax® 4). Duas experiências independentes foram realizadas.

### **2.2.3.3 Rendimento Quântico Oxigênio singleto**

A quantificação do rendimento quântico do oxigênio singleto do PS foi determinada a através da medição da sua fosforescência resolvida no tempo . Como referência foram utilizadas soluções de fenalenona, em DMSO e Etanol. Em relação ao PS, também foram preparadas duas soluções (DMSO e Etanol). Os espectros de absorção molar foram recolhidos em 300 e 700 nm (Perkin Elmer LambdaTM 25).

Usando um equipamento de fotólise, o PS é excitado a 355 nm e a fosforescência do oxigénio singlete recolhida a 1270 nm. Espectros das soluções foram recolhidos com energias do laser entre 2 e 10.

#### **2.2.3.4 Tempo de vida do estado tripleto**

O tempo de vida do estado tripleto foi determinado através de fotólise por relâmpago. De forma a comparar o tempo de vida em diferentes solventes, soluções de PS foram preparadas em DMSO e Etanol. Os espectros foram retirados entre os 300 e 700 nm, em intervalos de 10 nm. Para as soluções sem a presença de oxigénio, estas foram saturadas em azoto e foram retirados 5 espectros de cada solução. Foram realizadas duas experiências independentes.

#### **2.2.4 Ensaaios *In Vitro***

##### **2.2.4.1 Linhas celulares**

Os estudos em vitro foram realizados utilizando as linhas celulares CT26 (carcinoma colorretal) e U2OS GFP/Golgi (Osteossarcoma com marcação do complexo de Golgi através da proteína fluorescente GFP). Estas foram mantidas em DMEM, a uma temperatura controlada de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de humidade.

##### **2.2.4.2 Internalização do fotossensibilizador**

Os estudos de internalização do PS foram realizados utilizando a linha celular CT26. Inicialmente são plaquedas 40.000 células em placas de 24 poços, para um volume final de 1mL de meio de cultura. O stock de fotossensibilizador foi preparado em DMEM, para uma concentração final de 2,5 uM, tendo em consideração que o volume de DMSO inferior a 1%. Após 24 horas, o meio de cultura é aspirado e adicionam-se 500 µL do stock de PS. Cada codição foi testada em triplicado. As células foram incubadas em diferentes intervalos de tempo. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados 2 a 3 vezes com 500 µL de PBS. Para destacar as células foram utilizados 250 µL de tripsina e estas foram transferidas para uma placa U-Shape de 96 poços, sendo centrifugadas durante 5 minutos, a 1200 rpm. Após o sobrenadante ser descartado, as células são

incubadas com 250µL PFA 4%, durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. A placa é novamente centrifugada a 1200 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante é novamente descartado. Lavar uma vez com PBS e resuspender as células em 200 uL de PBS. Proteger da luz a 4°C até à análise por citometria.

No citometro (NovoCyte® 3000 + NovoSampler® Pro, ACEA Bioscience), as amostras foram excitadas a 405 nm e o filtro utilizado de 675/30. A intensidade da fluorescência foi recolhida dentro do gate apropriado, tendo como condições de paragem a utilização dos 200 uL de amostra ou 10.000 células dentro do gate.

### **2.2.4.3 Microscopia Confocal**

Foram plaqueadas 20000 células U2OS GFP/Golgi em placas de 8 poços, para um volume final de 300 µL. Soluções stock do PS neutro e dicatiónico foram preparadas, com concentrações de 25 µM. Após 24 horas, são adicionadas as soluções de PS a dois poços diferentes.

Aspirar e lavar as células com PBS (24 horas de incubação) e colocar 300 µL de meio.

Na microscopia confocal, as amostras foram excitadas a 405 nm e recolhidas a comprimentos de onda superiores a 630 nm.

A internalização do PS neutro foi avaliada durante a primeira hora de incubação (tempo (minutos): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60).

### **2.2.4.4 Citotoxicidade do fotossensibilizador**

A citotoxicidade foi testada na linha celular CT26. Inicialmente foram plaqueadas 20.000 células em placas de 96 poços para um volume final de 200 µL de meio de cultura. A placa foi guardada na estufa durante 24h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram preparados stocks dos fotossensibilizadores para as diferentes concentrações (concentrações 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM), tendo em consideração a percentagem de DMSO, inferior a 1%. Para cada concentração foram realizados triplicados. Após 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e as células incubadas com 100 µL de fotossensibilizador durante 24h. Após incubação, lavar os poços com PBS entre 2 e 3 vezes. A viabilidade celular foi avaliada passadas 24h com resazurina, após incubação desta entre 1 a 3 horas. Ler a placa. Duas experiências foram realizadas independentemente.



#### **2.2.4.5 Fototoxicidade do fotossensibilizador**

Similar às experiências de citotoxicidade, a fototoxicidade do PS foi testada na linha celular CT26. Inicialmente foram plaqueadas 20.000 células em placas de 96 poços para um volume final de 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. A placa foi guardada na estufa durante 24h a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Foram preparados stocks dos fotossensibilizadores para as diferentes concentrações (10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ ), tendo em consideração a percentagem de DMSO, inferior a 1%. Após 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e as células incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de fotossensibilizador. No caso do PS neutro este foi incubado durante 1h e o PS dicatiónico 24h. Após incubação, os poços são lavados 2 a 3 vezes com PBS e as células irradiadas com doses de luzes diferentes (1J/cm<sup>2</sup>, 6J/cm<sup>2</sup> e 10J/cm<sup>2</sup>). A viabilidade celular foi avaliada passadas 24h com resazurina, após incubação desta entre 1 a 3 horas. Ler a placa. Duas experiências foram realizadas independentemente.

### 3. Resultados

#### 3.1 Espectros UV-Vis em DMSO

Na Figura 8, encontram-se os espectros UV-Vis da porfirina neutra e da porfirina dicatiónica, no qual se observaram as seguintes bandas: Soret aos 409/401 nm, QIV aos 503/500 nm, QIII aos 537/536 nm, QII aos 574/573 nm e QI aos 627/625 nm, respetivamente. Pode-se assim observar um desvio do espectro para esquerda da porfirina dicatiónica em relação à porfirina neutra.

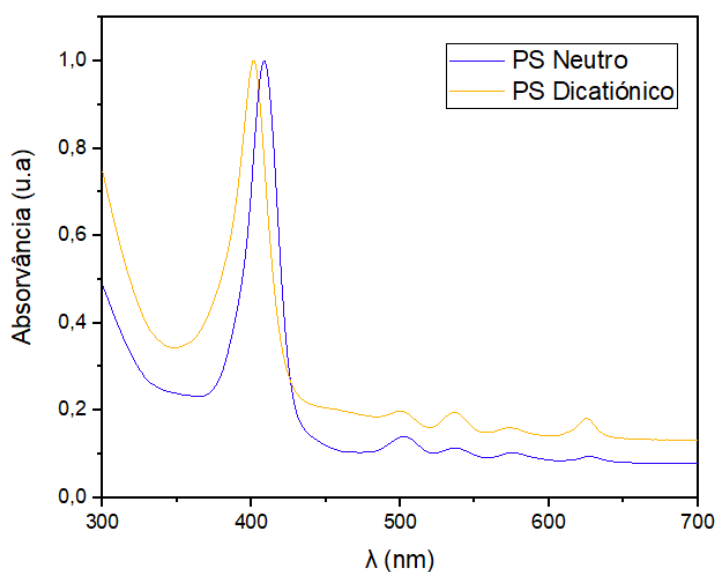


Figura 8. Espectro UV-Vis, normalizado, da Porfirina Neutra e Dicatiónica em DMSO.

##### 3.1.1 Coeficiente de Absortividade molar em DMSO

O coeficiente de absorvância molar foi determinado a partir da lei de Beer-Lambert ( $A=\epsilon lc$ ). Nas figuras 9 e 10 encontra-se os espectros UV-Vis da porfirina neutra em DMSO, com absorvâncias entre os 0,01 e 0,1.

A Lei de Beer-Lambert só pode ser utilizada se ocorrer um aumento linear da absorvância da amostra em relação à sua concentração. Logo, caso ocorresse a agregação da porfirina, o  $\epsilon$  não poderia ser calculado.

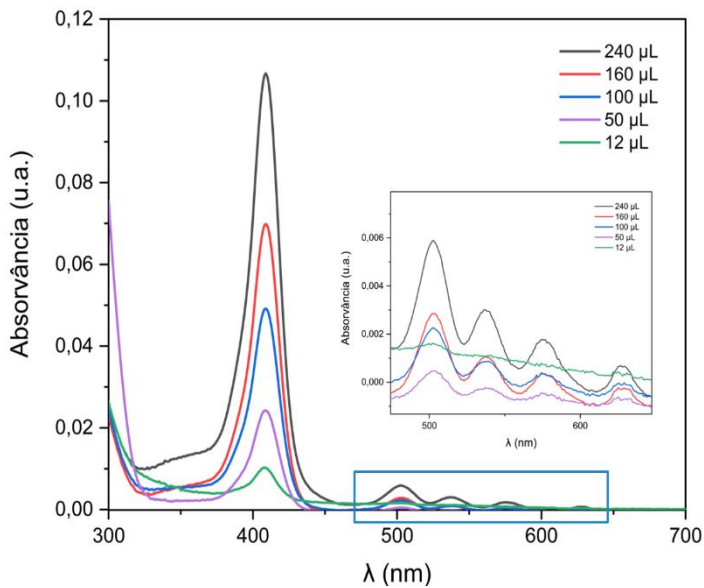


Figura 9. Espectros UV-Vis da solução A1-1

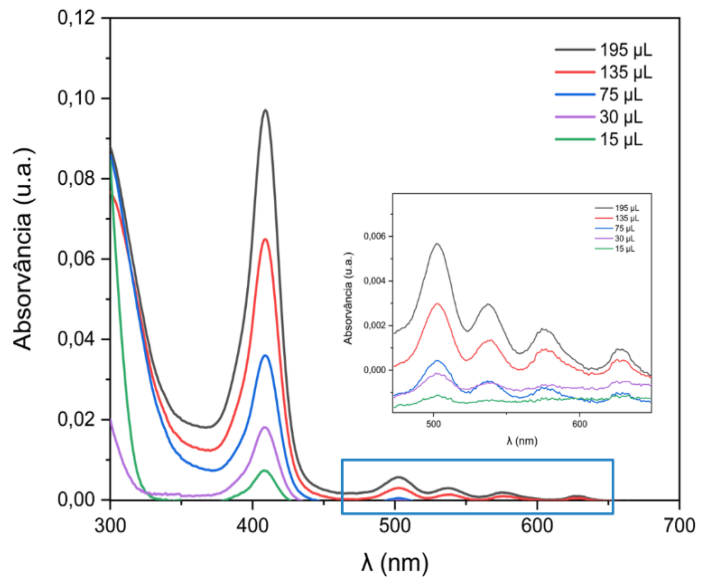


Figura 10. Espectros UV-Vis da solução A2-1

A partir dos dados obtidos nos espectros UV-Vis é calculado o coeficiente de absorvância molar através da reta de regressão linear (Figuras 11 e 12). No caso da figura 11, os pontos correspondentes às concentrações mais elevadas não foram tidos em consideração (linha vermelha), de forma que a reta intersekte o eixo do Y no 0 (linha preta).

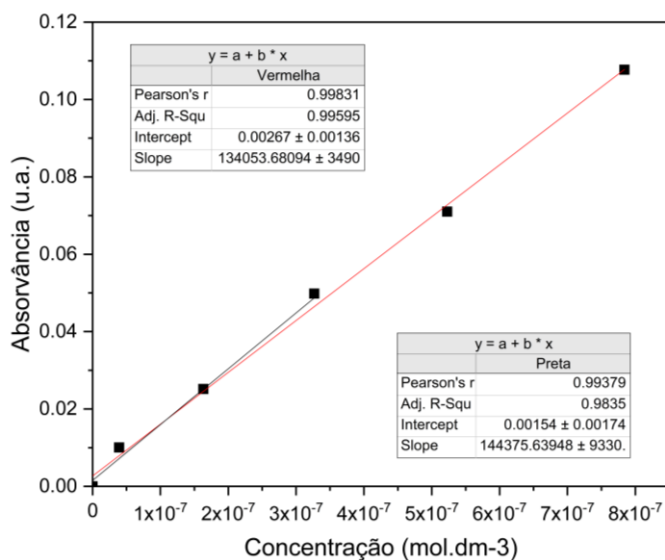


Figura 11. Reta de regressão linear da solução A1-1.

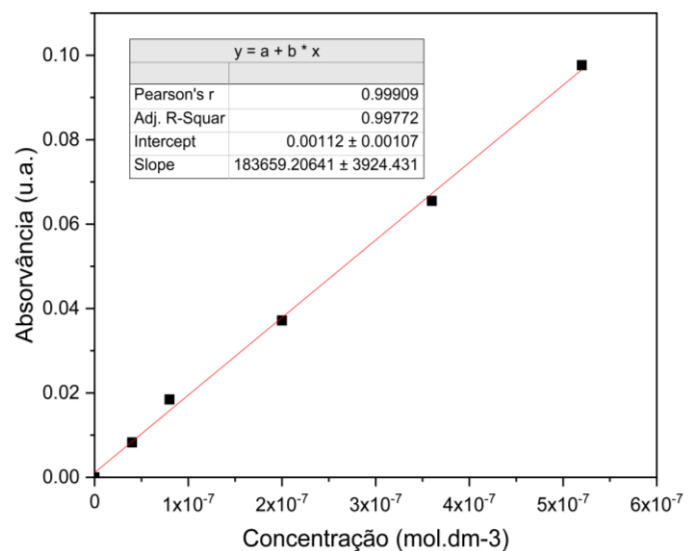


Figura 12. Reta de regressão linear da solução A2-1.

O valor do coeficiente de absorvância molar obtido foi de  $\epsilon(409) = 163143,5 \pm 20205,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em DMSO.

### 3.1.2 Coeficiente de Absortividade molar em Etanol

O mesmo processo foi repetido, mudando o solvente de DMSO para Etanol. Neste solvente, a porfirina neutra apresentava o pico da banda Soret a 401 nm. Foram assim obtidos os espectros UV-Vis das Figuras 13 e 14 e os gráficos de regressão linear nas figuras 14 e 15. Mais uma vez, um ponto estatístico foi excluído de forma que a reta interseste o eixo do Y no 0.

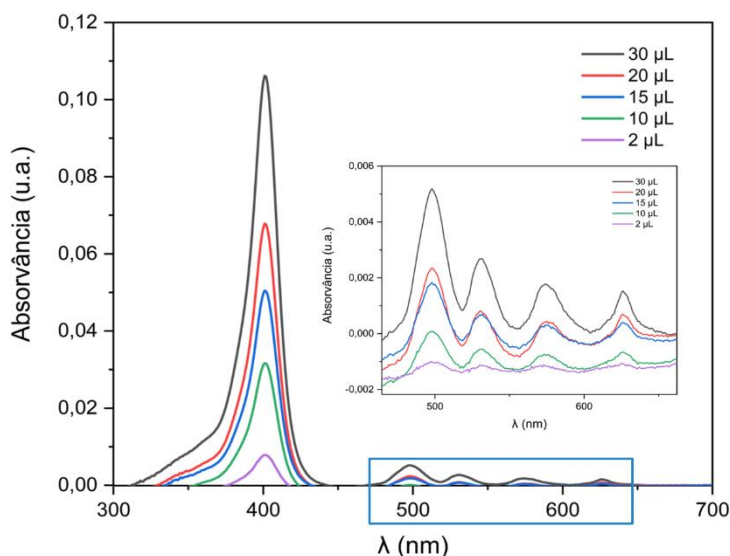


Figura 13. Espectros UV-Vis da solução A1-2

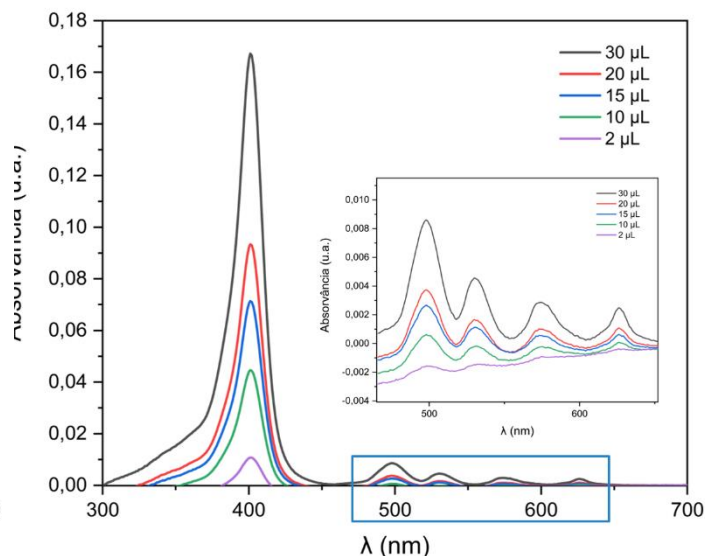


Figura 14. Espectros UV-Vis da solução A2-2

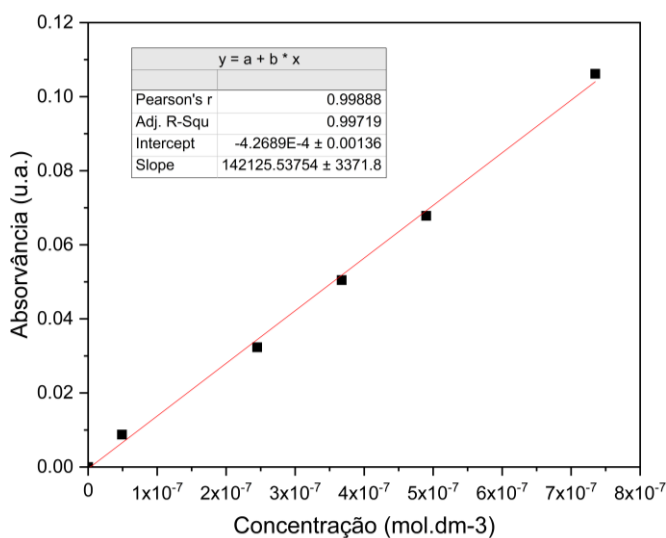


Figura 15. Retas de regressão linear da solução A1-2

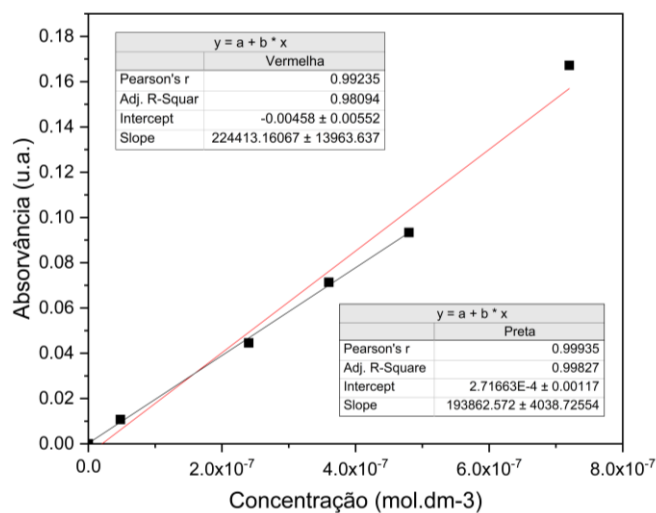


Figura 16. Retas de regressão linear da solução A2-2

O valor do coeficiente de absorvidade molar obtido foi de  $\epsilon(401) = 166132 \pm 26198 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em etanol.

## 3.2 Espectros de Fluorescência

Na Figura 17, encontram-se os espectros de emissão da porfirina neutra em DMSO e etanol. As amostras foram excitadas a 415 nm e a emissão recolhida de 600nm a 800 nm. A porfirina neutra em DMSO apresenta dois picos de emissão 635 nm e a 697 nm. Já em etanol estes valores desviam-se para 630 nm e 695 nm. A porfirina dicatiónica tem como picos de emissão 640 nm e 685 nm.

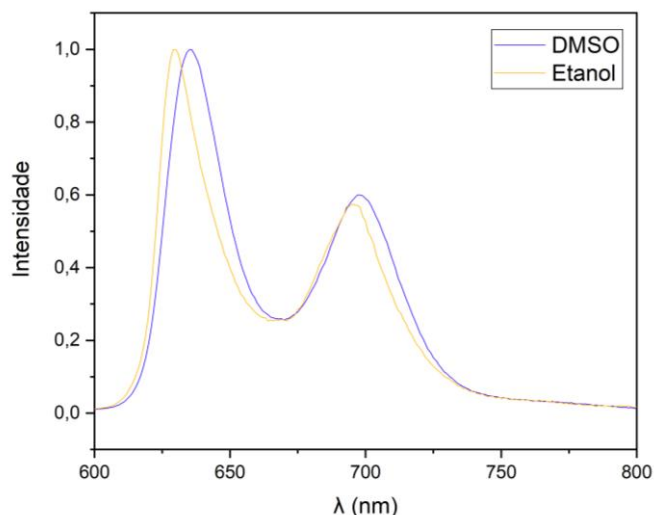


Figura 17. Espectro de emissão, normalizado, da porfirina neutra em DMSO e Etanol

### 3.2.1 Rendimento quântico de fluorescência

Para calcular o rendimento quântico de fluorescência foi utilizada a TPP, em tolueno, como referência. Esta tem um valor de  $\Phi_F$  de 0,11. As soluções foram excitadas a 415, onde o TPP e a porfirina neutra, em DMSO e etanol, absorvem (Figura 18).

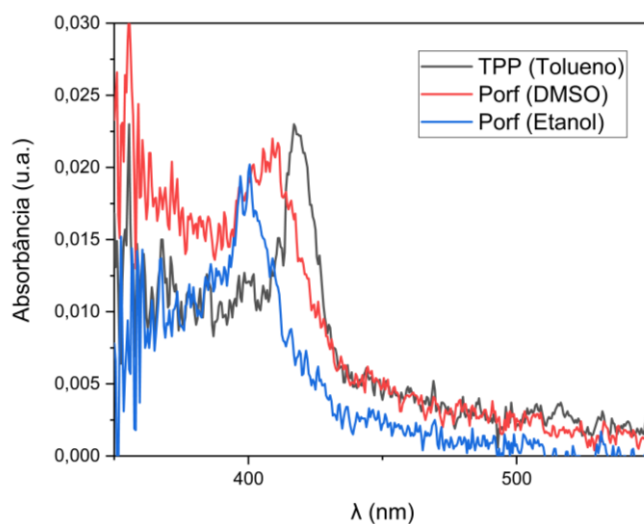


Figura 18. Espectro UV-Vis da TPP e Porfirina.

O rendimento quântico de fluorescência foi calculado através da seguinte equação:

$$\Phi = \Phi_R \times \frac{Int}{Int_R} \frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A}} \frac{n^2}{n_R^2}$$

Onde  $\Phi$  é o rendimento quântico,  $Int$  a área sob o pico de emissão,  $A$  a absorvância e o  $n$  é o índice de refração do solvente. O R subscripto é referente aos valores da referência a utilizar. A figura 19 demonstra a relação entre a absorvância das soluções analisadas com o  $\Phi$  calculado.

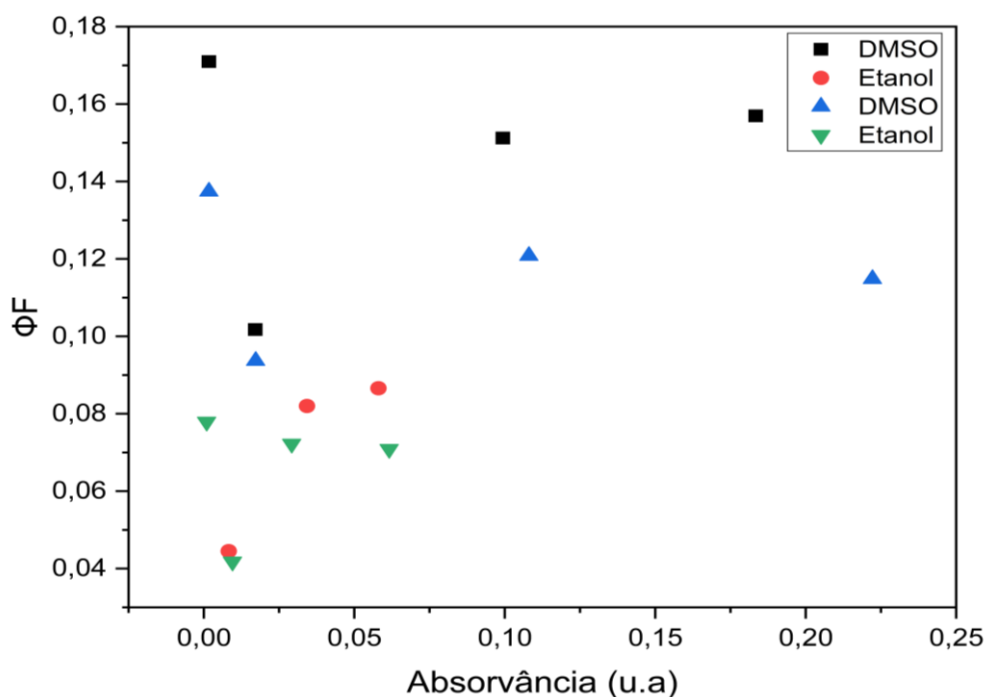


Figura 19. Rendimento quântico de fluorescência em função da absorvância.

Como esperado, o  $\Phi_F$  mantem-se constante ao longo da absorvância. Um decaimento deste com a absorvância é indicativo de agregação da molécula.

Os valores finais de  $\Phi_F$  foram calculados através da média das experiências, em DMSO e etanol. Em DMSO,  $\Phi_F$  da porfirina neutra foi  $0,1597 \pm 0,0058$  e em etanol  $0,0843 \pm 0,00231$ .

### 3.3 Rendimento Quântico Oxigênio Singlete

O rendimento quântico do oxigênio singleto foi determinado através do decaimento da fosforescência do oxigênio singleto. O PS foi excitado a um comprimento de onda de 355 e a emissão recolhida a 1200 nm. Como referência foi utilizada a fenalenona, pois esta apresenta elevados valores,  $\Phi_{\Delta} > 0,94$ , em diferentes solventes.

Dos espectros de emissão, foram retirados os valores da constante de decaimento exponencial para cada energia do utilizada.

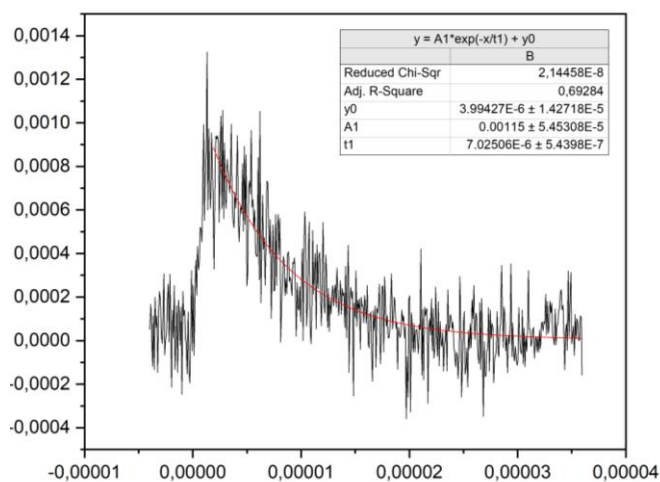


Figura 20. Decaimento exponencial

Foram construídos os gráficos de regressão linear entre a energia do laser e a intensidade do decaimento para o tempo  $t=0$ . Os pontos a vermelhos não foram considerados para os cálculos.

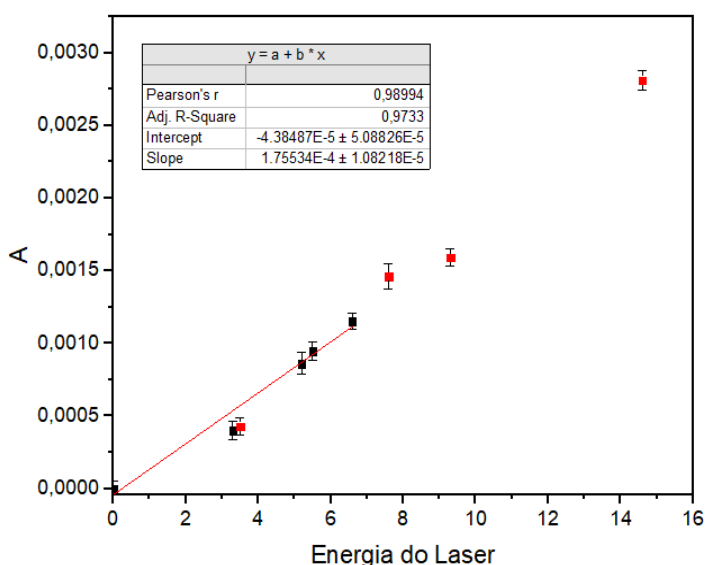


Figura 21. Retas de regressão linear, fenalenona em DMSO.

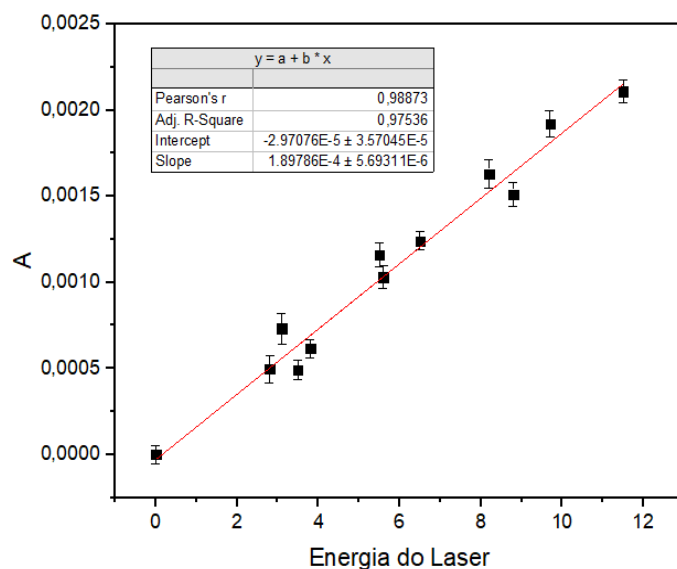


Figura 22. Retas de regressão linear, porfirina neutra em DMSO.

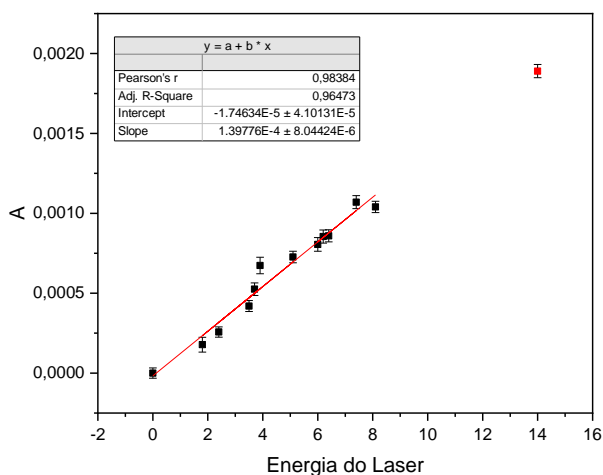


Figura 23. Retas de regressão linear, fenalenona em etanol.

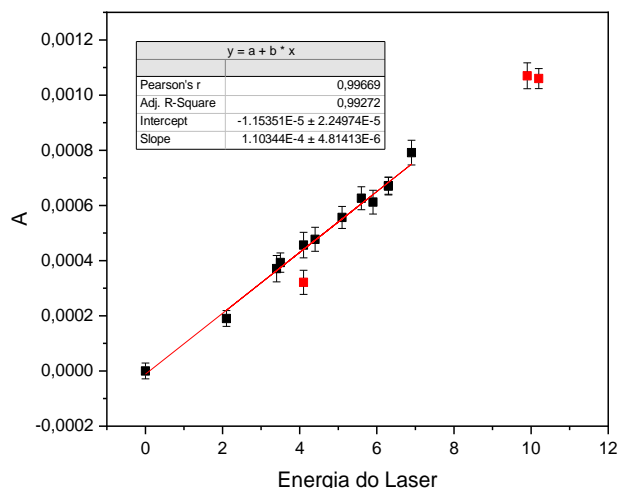


Figura 24. Retas de regressão linear, porfirina neutra em DMSO.

O rendimento quântico foi calculado utilizando a mesma fórmula da fluorescência, porém em vez de ser utilizada a área sob a curva de emissão, foi usado o declive das retas de regressão.

Para a solução em DMSO, a porfirina neutra teve um  $\Phi_{\Delta}$  de 1,05 e em etanol de 0,70. O valor em DMSO é igual a 1 dentro da incerteza experimental.

### 3.4 Tempo de Vida do Tripleto

Para a quantificação do tempo de vida do estado tripleto, foi realizada uma média dos valores obtidos através do decaimento exponencial dos espectros, a diferentes comprimentos de onda. A porfirina neutra, em DMSO, apresentou um tempo de vida do tripleto de 89  $\mu$ s nas soluções saturadas em azoto. Em etanol, os tempos de vida foram de 0,41  $\mu$ s, na presença de ar, e 53  $\mu$ s em azoto.

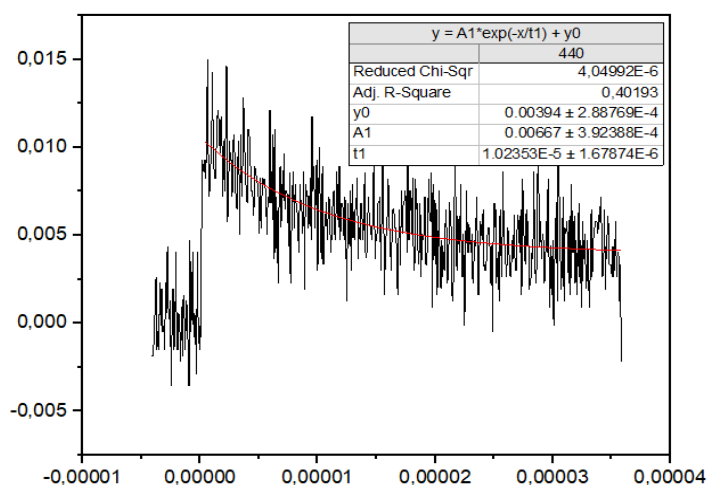


Figura 25. Decaimento exponencial do estado tripleto, 440 nm, com tempo de vida  $1,02 \times 10^{-5}$  segundos.



### 3.5 Internalização do fotossensibilizador

Os dados de internalização dos fotossensibilizadores foram obtidos através de citometria de fluxo. As amostras foram excitadas a 405 e a emissão recolhida a 675/30 nm.

#### 3.5.1 Porfirimina Neutra

Em relação à porfirimina neutra, esta apresentou uma rápida internalização por parte da linha celular. Em geral, no após 1 minuto de incubação, a amostra já apresentava cerca de 20% do sinal observado às 24h. Aos 5min este é cerca de 50%. O sinal continua a crescer gradualmente até à 1h de incubação onde o valor é similar com o das 24h (Figura 26).

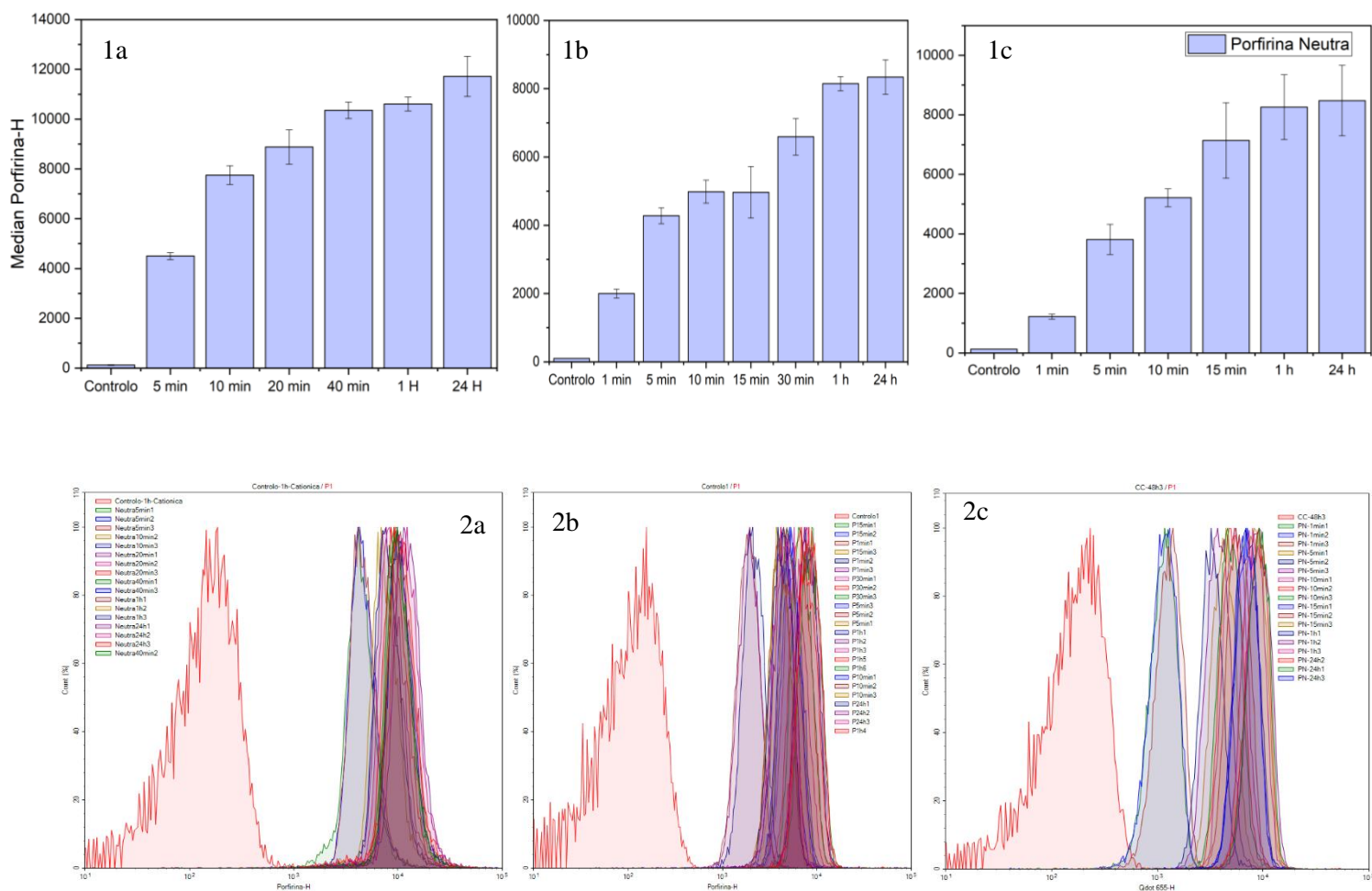


Figura 26. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação, em três experiências diferentes (1a -1c), como os respetivos histogramas (2a – 2c). Porfirimina Neutra.

### 3.5.2 Clorina Neutra

A clorina neutra apresenta um gráfico do mesmo perfil da porfirina neutra, onde o sinal aumenta gradualmente até à 1 hora, sendo este valor semelhante às 24 horas (Figura 27)

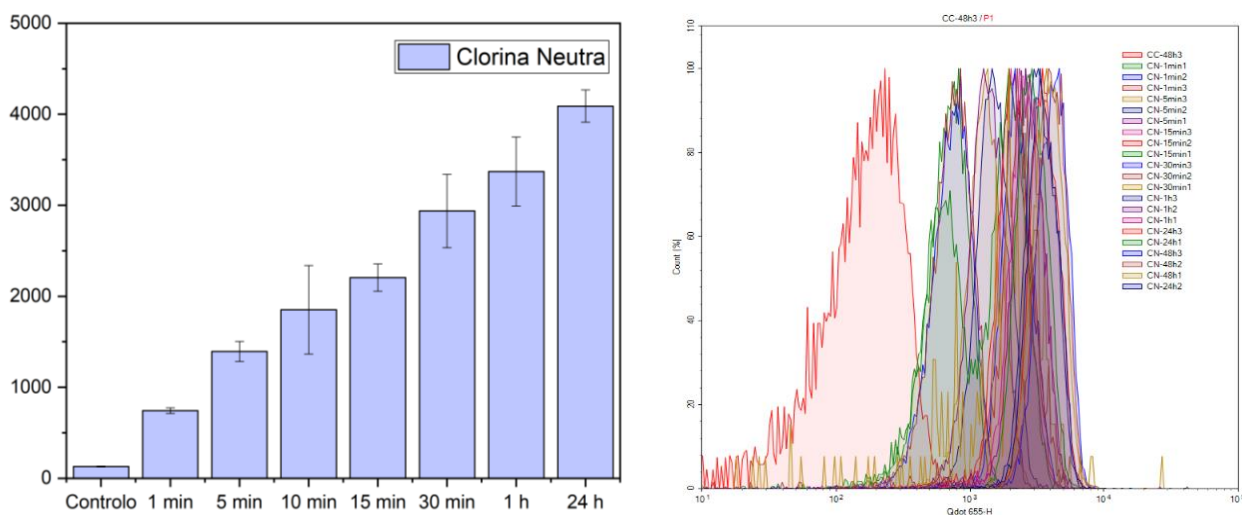


Figura 27. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respetivos histogramas. Clorina Neutra.

### 3.5.3 Porfirina Dicatiónica

Apesar de apresentar um aumento gradual entre o controlo e o tempo de incubação às 24 horas, este chega a ser cerca de 4 vezes menor que o sinal apresentado pela porfirina neutra durante o primeiro minuto de incubação (Figura 28).

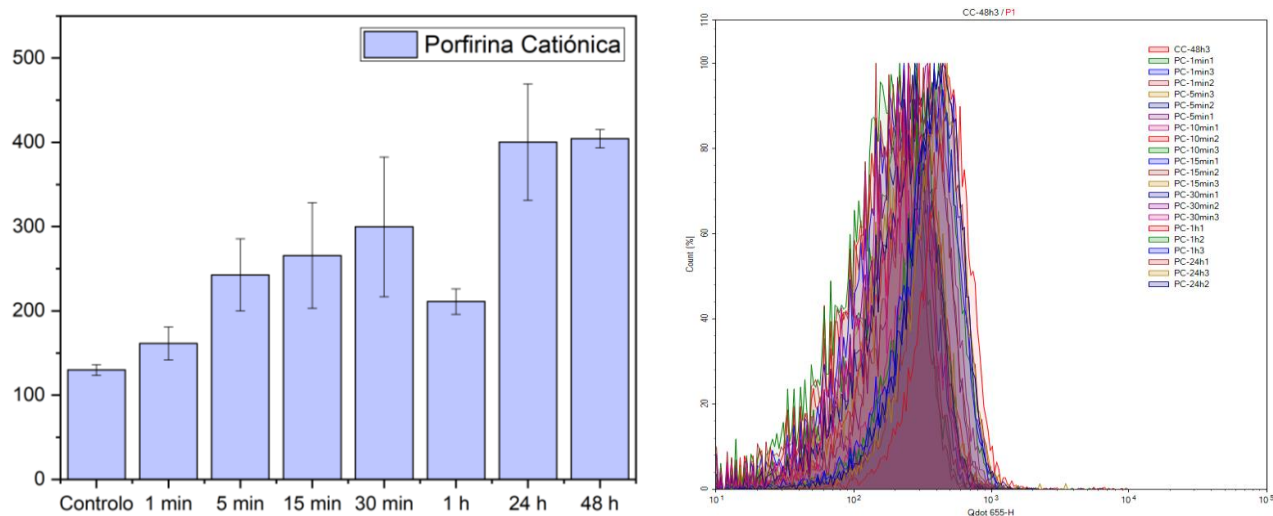


Figura 28. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respetivos histogramas. Porfirina Dicatiónica.

### 3.5.4 Clorina Dicatiónica

Internalização da clorina catiónica é muito reduzida, uma vez que o sinal do controlo é comparável ao sinal ao fim de 24 horas (Figura 29).

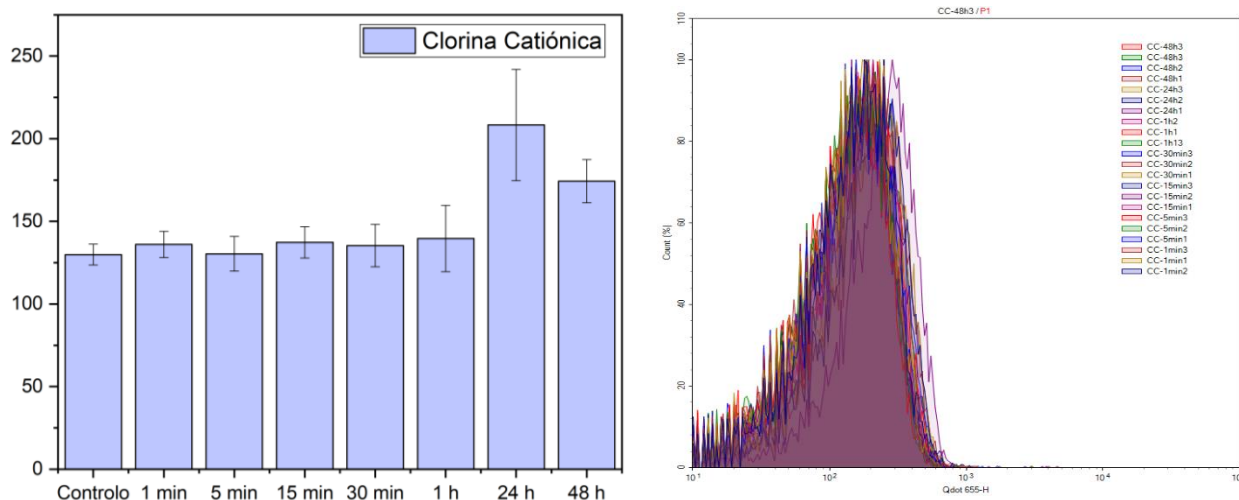


Figura 29. Representação gráfica do sinal obtido em função do tempo de incubação e respetivo histograma. Clorina Dicatiónica.

### 3.6 Microscopia Confocal

#### 3.6.1 24horas

A presença do fotossensibilizador dentro das células foi confirmado por microscopia confocal. É possível observar a fluorescência emitida pela porfirina neutra ao fim de 24 horas. (Figura 30). No caso da porfirina catiónica, o sinal é mais difuso nas células e apresenta uma menor intensidade. Em relação à sua localização, ambas apresentam uma baixa interseção com o marcador do complexo de Golgi.

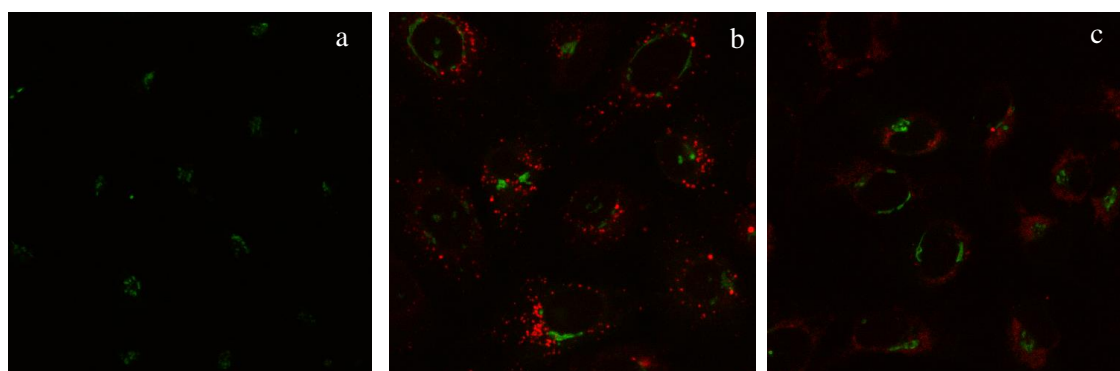


Figura 30. Micrográficos fluorescentes – a: controlo; b: porfirina neutra; porfirina catiónica.

### 3.6.2 1 hora

Como podemos observar através das imagens, as células apresentam sinal da porfirina neutra, apenas 1 minuto após incubação (Figura 31). Comprovando assim a rápida internalização do PS. Em relação à intensidade do sinal, este mantém valores similares durante os primeiros 20 minutos, aumentando apenas aos 30 min e gradualmente até aos 60 minutos.

Comparando com a porfirina neutra às 24h, estas aparentam ter localizações diferentes dentro célula.

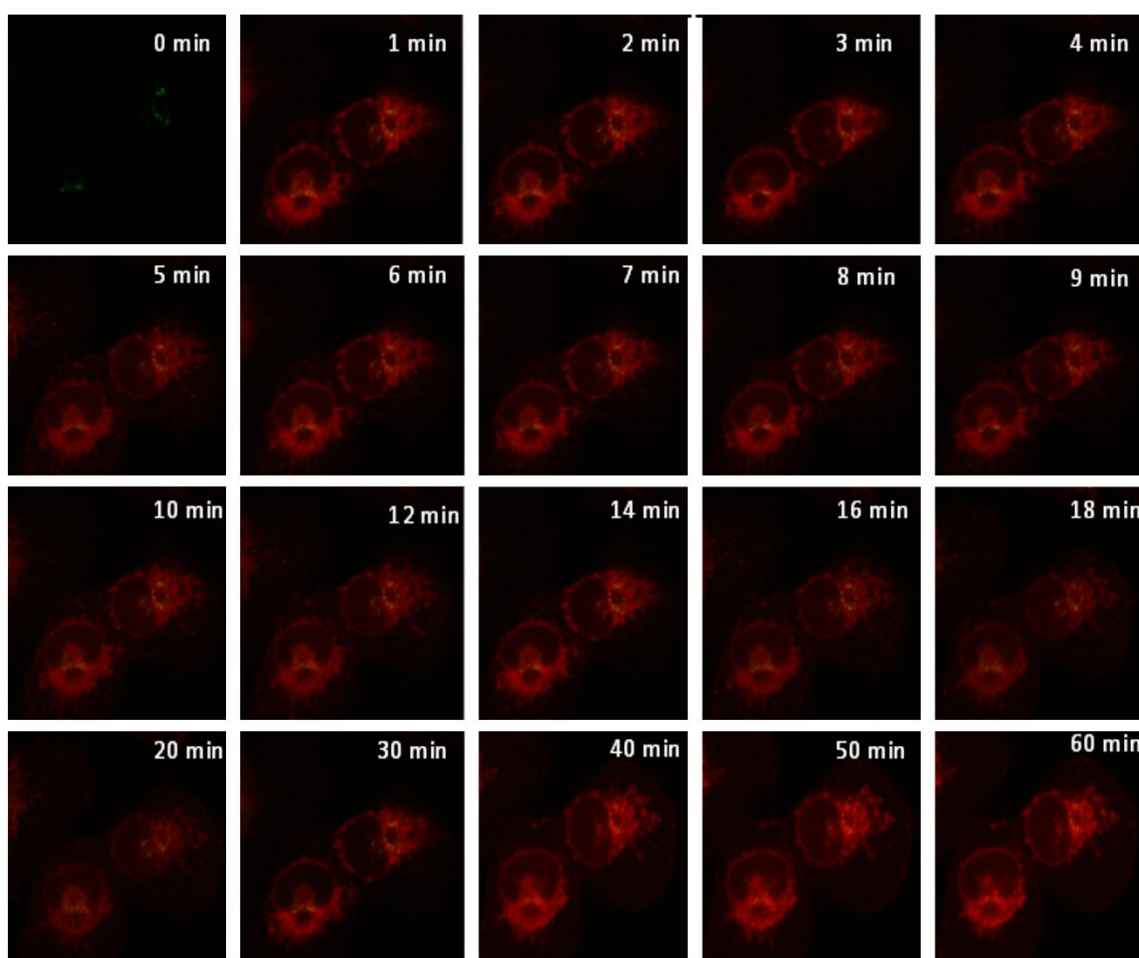


Figura 31. Micrográficos fluorescentes - Porfirina Neutra  $\Delta t = 60$  minutos.

### 3.7 Citotoxicidade

No que diz respeito à toxicidade dos fotossensibilizadores no escuro, a porfirina neutra não apresenta toxicidade significativa até aos 12,5  $\mu\text{M}$ . Aos 25  $\mu\text{M}$  esta teve uma viabilidade de 60% porém o valor encontra-se com um erro associado de 20%. Por fim aos 50  $\mu\text{M}$ , a viabilidade era apenas de 30%.

A clorina neutra também não apresentou toxicidade até aos 12,5  $\mu\text{M}$  e para os valores de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  a viabilidade celular foi de 80% e 60%, respetivamente. Sendo assim menos tóxica que a porfirina neutra.

A porfirina e clorina dicatiónicas não apresentara toxicidade até aos 50  $\mu\text{M}$ , possivelmente devido à baixa internalização (Figura 32).

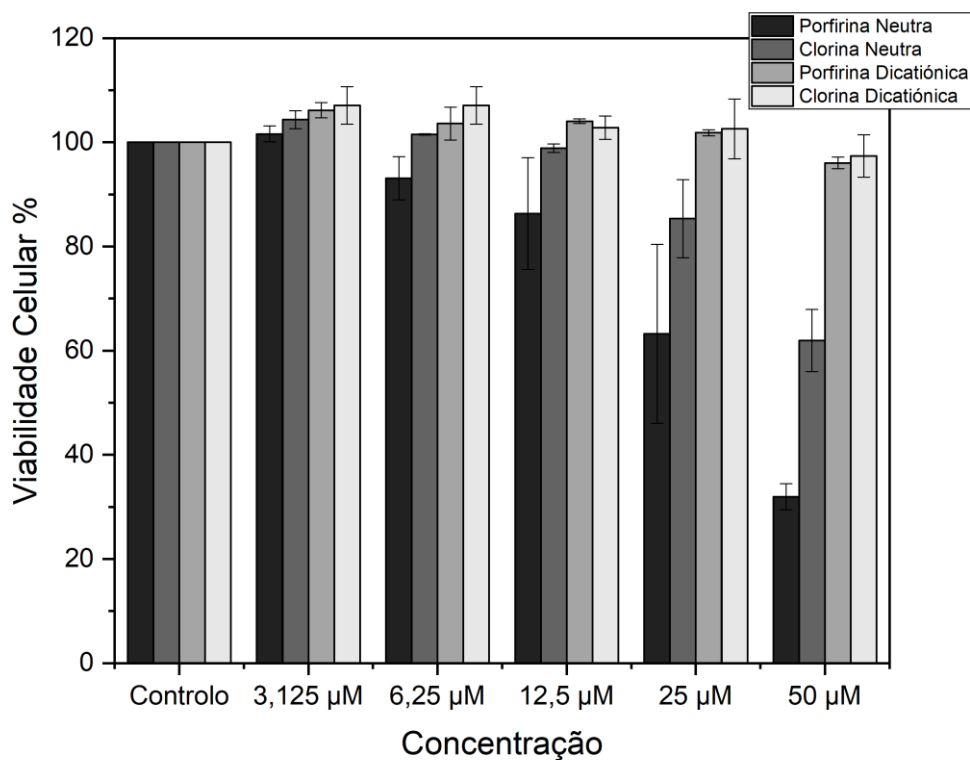


Figura 32. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, de diferentes fotossensibilizadores.

### 3.8 Fototoxicidade

A porfirina catiónica mais uma vez não apresentou sinais de toxicidade no meio celular, para um tempo de incubação de 24 horas (Figura 33).

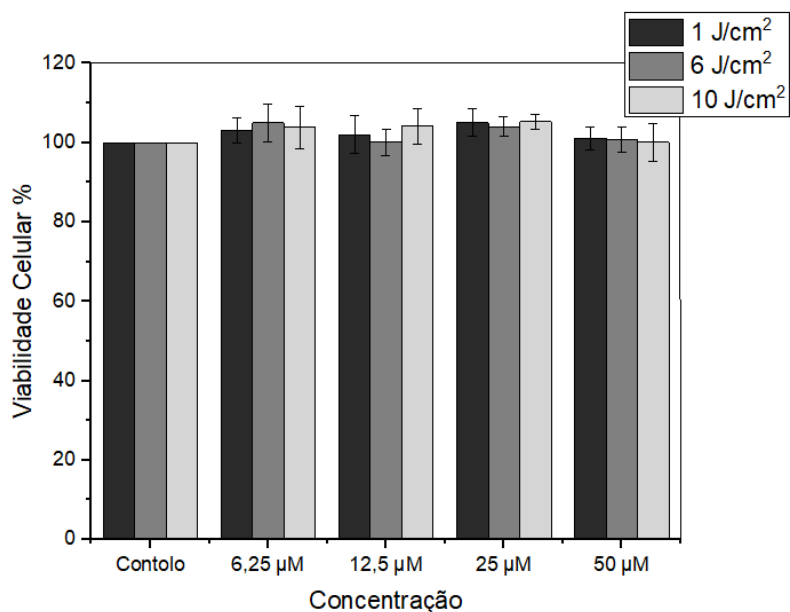


Figura 33. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, Porfirina Catiônica.

A porfirina neutra não apresentou toxicidade para as células nas duas menores concentrações, nas 3 doses de luzes diferentes. Para a concentração de 5 μM, a dose de 1 J/cm<sup>2</sup> não apresentou toxicidade porém em 6 e 10 J/cm<sup>2</sup>, a viabilidade celular foi cerca de 17% e 25% respectivamente. Por fim, para uma concentração de 10 μM, 1 J/cm<sup>2</sup> teve uma viabilidade de 35%, 6 J/cm<sup>2</sup> de 3% e 10 J/cm<sup>2</sup> de 10%. É de notar que em relação às concentrações de 5 e 10 μM, a diferença entre 6 e 10 J/cm<sup>2</sup> não é significativa, não sendo necessário então aumentar a dose de luz para ter o mesmo efeito terapêutico (Figura 34).

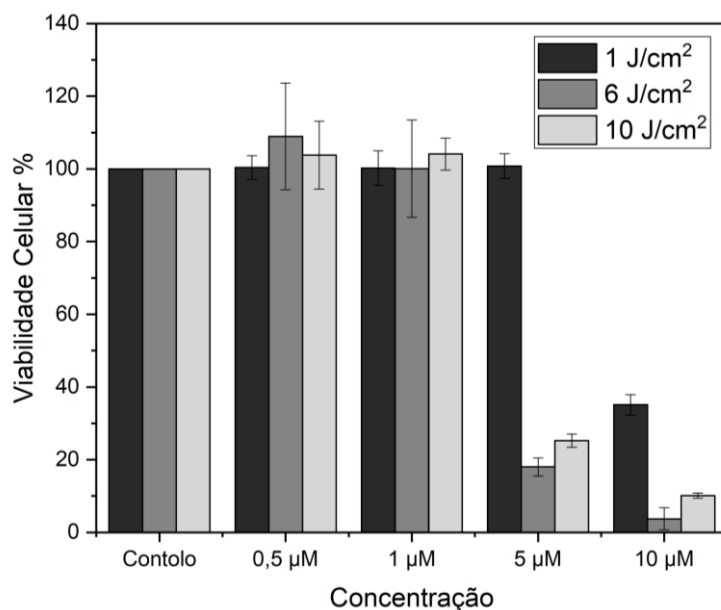


Figura 34. Viabilidade Celular, na linha celular CT26, Porfirina Neutra

## 4. Discussão

A otimização da eficácia e seletividade de fotossensibilizadores, para a utilização em terapia fotodinâmica, é uma das áreas de constante pesquisa na técnica. O desenvolvimento de novos fotossensibilizadores permite não só uma melhoria nos tratamentos antineoplásico, como também em outras terapias como doenças virais e microbianas.

Os fotossensibilizadores estudados neste trabalho foram testados contra células cancerígenas, porém estes poderão vir a ter usos noutras áreas de interesse.

Em relação às características dos fotossensibilizadores estudados. A porfirina neutra e dicatiónica, em DMSO, apresentaram picos máximos de absorção a 409 e 401 nm, respetivamente. Uma vez que a janela terapêutica se encontra entre 650 a 850 nm, as porfirinas irão ser excitadas no comprimento da banda QI. Este é um dos principais problemas na utilização de porfirinas na terapia fotodinâmica. A baixa absorção na banda QI leva a maiores tempos de irradiação para a geração das mesmas doses de ROS. Uma das alternativas para otimizar este parâmetro é a utilização de derivados como as clorinas e bacterioclorinas, já que estas apresentam picos de elevada absorção dentro da janela terapêutica. Considerando que não existem mudanças significativas em outros parâmetros importantes, com a alteração da estrutura da molécula, o estudo de derivados é importante na otimização do fotossensibilizador. À cerca do valor do coeficiente de absorvidade molar, apesar do pico da Soret em etanol se desviar para a esquerda em relação à solução em DMSO, este é similar entre os dois solventes. O valor obtido foi de  $\epsilon(409) = 163143,5 \pm 20205,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em DMSO e  $\epsilon(401) = 166132 \pm 26198 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em etanol.

A eficácia do fotossensibilizador também depende da sua capacidade de formação de espécies reativas de oxigénio. A porfirina neutra apresentou elevados valores de rendimento quântico do oxigénio singleto, em DMSO e etanol, comparando com outros fotossensibilizadores da literatura [22]. Estes valores foram de  $\sim 1$  em DMSO e 0,70 em etanol. Para a porfirina em DMSO, o valor obtido terá erros associados, como erros experimentais, o facto que a experiência foi realizada apenas 1 vez. A presença de outros fenómenos, como fluorescência onde o rendimento quântico foi de  $0,1597 \pm 0,0058$  em DMSO, permite afirmar que o valor de 1,05 possui erros associados. Já em etanol, o valor do rendimento quântico de fluorescência foi de  $0,0843 \pm 0,00231$ . Mesmo tendo em consideração os possíveis erros associados ao valor da solução em DMSO, é possível

afirmar que a porfirina neutra é um fotossensibilizador eficaz no que diz respeito à produção de oxigénio singleto.

O outro fator que influencia a produção de espécies reativas de oxigénio é o tempo de vida do estado tripleto. Fotossensibilizadores com maiores tempos de vida têm um maior intervalo para interagir como substratos celulares ou oxigénio presente. Neste parâmetro, a porfirina neutra é extremamente eficaz uma vez que os tempos de vida do estado tripleto encontram-se na ordem de grandeza dos microssegundos, comprando com os nanossegundos de outros fotossensibilizadores da literatura<sup>[22]</sup>. Na presença de oxigénio, as soluções tiveram um tempo de vida de 0,41  $\mu$ s. Quando as soluções foram saturadas em azoto, estes valores aumentaram para 89  $\mu$ s, em DMSO, e 53  $\mu$ s, em etanol. Desta forma, também é possível verificar que existe interações entre o oxigénio presente e o fotossensibilizador, uma vez que o tempo de vida aumenta quando este é retirado.

Nos estudos *in vitro*, foi possível observar diferenças na internalização dos fotossensibilizadores neutros estudados em relação aos fotossensibilizadores dicatiónicos. Na porfirina neutra, 1 minuto após administração do fotossensibilizador, já era possível observar-se cerca de 20% do sinal observado às 24h, demonstrando rápida internalização do fotossensibilizador pela linha celular utilizada, CT26. Aos 5 minutos este aumentou para cerca de 50%, continuando a crescer gradualmente até à 1 hora de internalização, onde o valor se mantém constante até às 24 horas. Um perfil de internalização similar foi observado para a clorina neutra, demonstrando que os fotossensibilizadores estudados apresentavam rápidas internalizações, nas condições estudadas. Uma das possibilidades para a rápida internalização do fotossensibilizador é se esta for realizada através de transporte ativo. Estudos futuros associados ao consumo de ATP seriam necessários de forma a provar a hipótese de transporte ativo. A presença de carga nos fotossensibilizadores estudados também parece ser um fator limitante para a sua internalização. Na porfirina e clorina dicatiónica, o valor obtido ao fim de 24 e 48 horas de internalização dos fotossensibilizadores era similar ao valor emitido por células não expostas ao fotossensibilizador. Em relação a estudos futuros, além dos estudos de transporte ativo, também seria importante comparar a internalização em diferentes linhas celulares, para avaliar como esta varia na presença de células de constituições diferentes, como também comparar a internalização de diferentes atropisómeros do fotossensibilizador, uma vez que a localização espacial dos átomos da molécula pode afetar a internalização, principalmente no caso de se tratar de transporte ativo.



A presença do fotossensibilizador dentro das células foi confirmado por microscopia confocal. No caso da porfirina neutra esta apresenta um sinal definido ao fim de 24 horas, já o sinal da porfirina catiónica é mais difuso e apresenta uma menor intensidade. Desta forma os resultados foram coerentes com aqueles obtidos através de citometria de fluxo. Em relação à sua localização na célula, ambos fotossensibilizadores apresentam uma baixa interseção com o marcador do complexo de Golgi utilizado. A utilização de diferentes marcadores poderá ser utilizada do futuro para se localizar exatamente o fotossensibilizador e também a diferentes tempos de incubação.

Por fim, os estudos *in vitro* de citotoxicidade e fototoxicidade são cruciais para a determinação do potencial do fotossensibilizador. Em relação à porfirina e clorina dicatiónicas, estas não apresentaram toxicidade até à concentração máxima testada de 50  $\mu\text{M}$ . A baixa toxicidade das moléculas pode ser justificada com a sua baixa internalização por parte das células. No caso da porfirina neutra, esta não apresentou toxicidade significativa no escuro até à concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  e para a concentração máxima estudada de 50  $\mu\text{M}$ , a viabilidade foi de apenas 30%. Comparando com a clorina neutra que também não apresentou toxicidade significativa até aos 12,5  $\mu\text{M}$ , porém para 50  $\mu\text{M}$ , a viabilidade foi de 60%, o dobro em relação à porfirina neutra. Desta forma, é possível concluir que a clorina é menos tóxica no escuro.

Na fototoxicidade, mais uma vez a porfirina dicatiónica não apresentou toxicidade para as concentrações de fotossensibilizador e dose de luz testadas. Podemos concluir que a porfirina dicatiónica não é um fotossensibilizador ideal para a terapia antineoplásica, porém poderá ser usada em outros estudos como antimicrobianos, devido a carga da molécula.

A porfirina neutra não apresentou fototoxicidade nas duas concentrações mais baixas testadas, nas diferentes doses de luz. Na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , a linha celular não apresentou toxicidade para a dose de 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , porém utilizando 6 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , a viabilidade celular foi cerca de 17% e 25% respetivamente. Por fim, para uma concentração de 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\text{J}/\text{cm}^2$  teve uma viabilidade de 35%, 6  $\text{J}/\text{cm}^2$  de 3% e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  de 10%. Desta forma foi possível observar que não ocorreu mudanças significativas entre 6 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , nas concentrações de 6 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  testadas.

## 5. Conclusão

Este trabalho procurou estudar diferentes fotossensibilizadores em relação às suas características fotoquímicas e fotofísicas, como também as suas interações no meio biológico.

Em termos de fotossensibilizador, a porfirina neutra apresentou como vantagens um tempo de vida do estado tripleto na ordem dos microssegundos. Muitas das porfirinas referidas na literatura apresentam tempos de vida na ordem dos nanossegundos. Ao passar mais tempo no estado tripleto, aumenta a probabilidade de formação de espécies reativas de oxigénio. Esta também apresentou um elevado rendimento quântico de oxigénio singlete permite uma alta formação deste *in situ*.

Também a rápida internalização deste pelas células poderá ser utilizado, não só para tratamentos antineoplásicos, como também outros tipos de PDT como antimicrobiana e viral.

Porém este apresenta uma grande desvantagem, sendo esta o baixo pico de absorção na janela foto terapêutica. Para tal, é necessário a utilização de maiores tempos de irradiação.

O desenvolvimento de clorinas e bacterioclorina com base nesta porfirina neutra, deverá aumentar a absorção no vermelho e no infravermelho. Como já foi provado neste trabalho que uma clorina neutra de estrutura similar também apresentou uma rápida internalização nas células, sendo menos citotóxicas para células no escuro. No futuro, será interessante estudar a sua fototoxicidade.

Em relação a forma catiónica, a baixa internalização e falta de fototoxicidade, tornam este tipo de fotossensibilizadores pouco interessantes para na terapia antineoplásica. Porém, é sabido que fotossensibilizadores dicatiónicos são particularmente interessantes em PDT antimicrobiana pelo que é promissor realizar estudos de foto-inativação de bactérias com estes fotossensibilizadores.<sup>[24]</sup>

Também estudos futuros sobre a localização exata do PS dentro da célula a vários intervalos de tempo e sobre o mecanismo de internalização celular excepcionalmente rápido, poderão esclarecer sobre as propriedades dos fármacos que facilitam a permeação de membranas celulares. O conhecimento dessas propriedades poderá expandir o domínio das moléculas capazes de atingir alvos terapêuticos dentro das células.

## 6. Bibliografia

- [1] Breskey, J. D., Lacey, S. E., Vesper, B. J., Paradise, W. A., Radosevich, J. A., & Colvard, M. D. (2013). Photodynamic Therapy: Occupational Hazards and Preventative Recommendations for Clinical Administration by Healthcare Providers. In *Photomedicine and Laser Surgery* (Vol. 31, Issue 8, pp. 398–407). Mary Ann Liebert Inc.
- [2] Gallardo-Villagrán, M., Leger, D. Y., Liagre, B., & Therrien, B. (2019). Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 13, p. 3339). MDPI AG.
- [3] Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? In *Photochemical & Photobiological Sciences* (Vol. 3, Issue 5, p. 436). Springer Science and Business Media LLC.
- [4] Wiehe, A., O'Brien, J. M., & Senge, M. O. (2019). Trends and targets in antiviral phototherapy. In *Photochemical & Photobiological Sciences* (Vol. 18, Issue 11, pp. 2565–2612). Springer Science and Business Media LLC.
- [5] Daniell, M. D., & Hill, J. S. (1991). A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. In *ANZ Journal of Surgery* (Vol. 61, Issue 5, pp. 340–348). Wiley
- [6] Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 9). Frontiers Media SA.
- [7] Abdel-kader, M. H. (2016). CHAPTER 1. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present. In *Comprehensive Series in Photochemical & Photobiological Sciences* (pp. 1–21). Royal Society of Chemistry.
- [8] Allison, R. R., Mota, H. C., & Sibata, C. H. (2004). Clinical PD/PDT in North America: An historical review. In *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Vol. 1, Issue 4, pp. 263–277).
- [9] Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 74, Issue 5, p. 656). Wiley.
- [10] Malatesti, N., Munitic, I., & Jurak, I. (2017). Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. In *Biophysical Reviews* (Vol. 9, Issue 2, pp. 149–168). Springer Science and Business Media LLC.

- [11] Nyman, E. S., & Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (Vol. 73, Issues 1–2, pp. 1–28). Elsevier BV.
- [12] Ding, H., Yu, H., Dong, Y., Tian, R., Huang, G., Boothman, D. A., Sumer, B. D., & Gao, J. (2011). Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 156, Issue 3, pp. 276–280). Elsevier BV.
- [13] Dąbrowski, J. M., & Arnaut, L. G. (2015). Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. In *Photochemical & Photobiological Sciences* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1765–1780). Springer Science and Business Media LLC.
- [14] Kou, J., Dou, D., & Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 46, pp. 81591–81603). Impact Journals, LLC.
- [15] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. In *Clinical Endoscopy* (Vol. 46, Issue 1, p. 24). The Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy.
- [16] Calvete, M. J. F., Gomes, A. T. P. C., & Moura, N. M. M. (2009). Chlorins in Photodynamic Therapy - Synthesis and applications. In *Revista Virtual de Química* (Vol. 1, Issue 2). Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- [17] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. In *Clinical Endoscopy* (Vol. 46, Issue 1, p. 24). The Korean Society of Gastrointestinal Endoscopy.
- [18] WITTENBERG, J. B. (1959). Formation of the Porphyrin Ring. In *Nature* (Vol. 184, Issue 4690, pp. 876–878). Springer Science and Business Media LLC.
- [19] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. In *Biomedicine & Pharmacotherapy* (Vol. 106, pp. 1098–1107). Elsevier BV
- [20] Gottfried, J. M. (2015). Surface chemistry of porphyrins and phthalocyanines. In *Surface Science Reports* (Vol. 70, Issue 3, pp. 259–379). Elsevier BV.
- [21] Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O<sub>2</sub>(<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) sensitization. In *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (Vol. 79, Issues 1–2, pp. 11–17). Elsevier BV.

- [22] Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Dąbrowski, J. M., Silva, E. F. F., Schaberle, F. A., Abreu, A. R., Rocha, L. B., Barsan, M. M., Urbańska, K., Stochel, G., & Brett, C. M. A. (2014). Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. In *Chemistry - A European Journal* (Vol. 20, Issue 18, pp. 5346–5357). Wiley.
- [23] Dąbrowski, J. M., Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Urbańska, K., Simões, S., Stochel, G., & Cortes, L. (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. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 52, Issue 7, pp. 1188–1200). Elsevier BV.
- [24] Aroso, R. T., Schaberle, F. A., Arnaut, L. G., & Pereira, M. M. (2021). Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases. In *Photochemical & Photobiological Sciences* (Vol. 20, Issue 11, pp. 1497–1545). Springer Science and Business Media LLC.