

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ADJACI UCHOA-FERNANDES

Síntese, Caracterização e Fotoatividade de
Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina
IX e de Clorofilina.

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

16/10/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADJACI UCHOA-FERNANDES

Síntese, Caracterização e Fotoatividade de
Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de
Clorofilina.

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química Orgânica)

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo

2007

Adjaci Uchoa-Fernandes

Síntese, Caracterização e Fotoatividade de Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina.

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Mauricio Baptista, por ter me orientado.

Aos professores:

Alicia Juliana Kowaltowski

Erick Leite Bastos

Josef Wilhelm Baader

Liane Marcia Rossi

Massuo Jorge Kato

Pelo apoio e orientações.

Aos Técnicos Alessandra, Camile, Décio, Edson, Luis e Silvia pelo apoio.

Aos colegas:

De laboratório Carla Oliveira, Carla Pedriali, Christiane, Dayane, Dino, Divino, Elisa, Helena, Mandela, Milton, Moises, Nasser, Patrícia, Rodrigo, Tathyana, Thatiane, Vinicius e Viviane.

Do laboratório de produtos naturais, Ana Paula, Elvis, Ingrid, Sabina, Sérgio e Valéria.

Do laboratório de Bioinorgânica e Nanomateriais, Fernando, Lucas, Paulo e Raul.

Pela amizade e colaboração.

Capes, CNPq e FAPESP

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	21
1.1 - Terapia Fotodinâmica (TFD)	21
1.2 - Aspectos Históricos	21
1.3 - Mecanismos de Ação	27
1.4 - Fotossensibilizadores	33
1.5 – Porfirinas	37
1.6 - Agregação	41
1.7 - Interações de Fotossensibilizadores com os Tecidos e Células	45
2 - OBJETIVOS	49
2.1 - Gerais	49
2.2 - Específicos	49
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 - Materiais (Solventes e Reagentes)	50
3.1.1 - Cloreto de Tionila	50
3.1.2 - Cloreto de Oxalila	50
3.1.3 - Dimetilformamida (DMF)	50
3.1.4 - THF	50
3.1.5 - HBr 33% em HAc	50
3.1.6 - Aminas	50
3.1.7 - Porfirinas	50
3.1.8 - Solventes Deuterados	50
3.1.9 - Surfactantes	51
3.1.10 - Cultivo de células	51
3.2 - Métodos	51
3.2.1 - HCl:MeOH	51
3.2.2 - Purificação dos produtos	52
3.2.3 - Derivatização de hematoporfirina IX (Rota I)	52
3.2.4 - Caracterização estrutural	53
3.2.4.1- Hematoporfirina IX	53
3.2.4.2 - Dimetil-8,13-bis(dietilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida)	53
3.2.5 - Derivatização de protoporfirina IX (Rota II)	54
3.2.5.1 - Funcionalização protoporfirinas IX em 3 ¹ e 8 ¹ por bromação dos grupos vinílicos	54
3.2.5.2 - Substituição dos compostos bromados por amina	55
3.2.5.3 - Esterificação dos compostos	55
3.2.5.4 - Caracterização estrutural (Rota II)	56
3.2.5.4.1 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster	56
3.2.5.4.2 - Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster	56
3.2.5.4.3 - Dimetil-8,13-Bis(1-dipropilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster	57
3.2.6 - Derivados amida de protoporfirina IX (Rota III)	57
3.2.6.1 - Funcionalização dos grupos carboxilatos em 13 ³ e 17 ³	57

3.2.6.2 - Metilação das aminas terciárias	58
3.2.6.3 - Purificação e caracterização estrutural	58
3.2.6.3.1 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida]	58
3.2.6.3.2 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2-(propanoilamino)etanoamônio]	59
3.2.6.3.3 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina)propil]butanamida]	60
3.2.6.3.4 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio]	60
3.2.6.3.5 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2- (propanoilamino)etil]fosfônico ácido]	61
3.2.6.3.6 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N(-3-(triethoxysilano)propil]butanamida]	62
3.2.6.3.7 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis-(dipropil-L- alfa-fofatidiletanolamina)	63
3.2.7 - Derivatização de Cu^{2+} - clorofilina	63
3.2.7.1 - Desmetalização de Cu^{2+} - clorofilina	63
3.2.7.2 – Hidrólise de trimetil éster - clorofilina	64
3.2.7.3 – Obtenção de derivados amidas de clorofilina	64
3.2.7.4 - Purificação e caracterização estrutural.	64
3.2.8 - Determinações dos coeficientes de extinção molar	66
3.2.9 - Eficiência de emissão de fluorescência	67
3.2.10 - Fotólise de relâmpago a laser	68
3.2.11 - Determinação da eficiência de emissão de oxigênio singlete	68
3.2.12 - Determinação do estado de agregação	69
3.2.13 - Partição 1-octanol/água	70
3.2.14 - Incorporação em vesículas	70
3.2.15 - Cultura de células HeLa	71
3.2.16 - Determinação das taxas de incorporação, toxicidade e fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores em células tipo HeLa.	72
3.2.17 - Extração das mitocôndrias	73
3.2.18 - Incorporação dos fotossensibilizadores em mitocôndrias	74
3.2.19 - Citolocalização	74
3.3 - Equipamentos e dispositivos.	75
3.3.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	75
3.3.2 - Espectrofotômetro (UV-visível)	75
3.3.3 - Espectrofluorímetro	75
3.3.4 - Equipamento de fotólise por relâmpago de laser	76
3.3.5 - Equipamento detecção de oxigênio singlete por emissão no infravermelho próximo	77
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	78
4.1 - Obtenção de novos fotossensibilizadores.	78
4.1.1 - Funcionalização de hematoporfirina IX	78
4.1.2 - Funcionalização de protoporfirina IX nas posições 3 ¹ e 8 ¹	83
4.1.2.1 - Bromação das protoporfirinas IX.	83
4.1.2.2 - Substituição dos compostos bromados por amina	84
4.1.2.3 - Esterificação dos compostos porfirínicos	86

4.1.2.4 - Caracterização estrutural	86
4.1.3 - Funcionalização de protoporfirina IX nas carboxilas em 13 ³ e 17 ³	90
4.1.3.1 - Caracterização estrutural	93
4.1.4 – Derivatização do sal de sódio cupro clorofilina (Cu ²⁺ - clorofilina)	102
4.1.4.1 - Desmetalação de Cu ²⁺ - clorofilina	102
4.1.4.2 - Obtenção de derivados amino-amida de clorofilina	107
4.2 - Propriedades físicas e fotofísicas	112
4.2.1 - Derivados de protoporfirina IX.	112
4.2.1.1 - Espectros UV-visível e coeficientes de absorção Molar (ϵ)	113
4.2.1.2 - Espectro de fluorescência e rendimento quântico	117
4.2.1.3 - Estudo fotólise de relâmpago a laser	119
4.2.1.4 - Emissão de oxigênio singlete	121
4.2.1.5 - Determinação dos agregados dos derivados de protoporfirina IX obtidos pela Rota III.	128
4.2.1.6 - Coeficiente de partição 1-octanol/água	142
4.2.1.7 - Incorporação em lipossomo em função do <i>pH</i>	145
4.2.2 - Propriedades físicas e fotofísicas dos derivados de clorofilina	147
4.2.2.1 - Espectros no visível e coeficientes de extinção molar (ϵ)	147
4.2.2.2 - Espectro de fluorescência e rendimento quântico	150
4.2.2.3 - Geração e rendimento quântico de oxigênio singlete	151
4.2.2.4 - Determinação da formação de estados agregados para os derivados de clorofilina	155
4.2.2.5 - Coeficiente de partição 1-octanol/água	158
4.3 - Determinação da atividade fotodinâmica	160
4.3.1 - Derivados de protoporfirina IX	161
4.3.1.1- Taxa de incorporação	161
4.3.1.2 - Toxicidade e fotocitotoxicidade	162
4.3.2 - Derivados de clorofilina.	166
4.3.2.1 – Taxa de incorporação (lipossomo, célula e mitocôndria)	167
4.3.2.2 - Toxicidade e fotocitotoxicidade	168
4.4 - Citolocalização em células Hela	171
5 - CONCLUSÕES	176
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
7 - APÊNDICES	188

Lista de Figuras

1	Paciente com câncer de pele tratado por Tappeiner, H. e Jesionek, H., com solução de eosina 1% em 1905: A) antes do tratamento; B) depois do tratamento. Figuras extraídas de http://www.magicray.ru/RU/lecture/2.html	22
2	Fórmula estrutural dos corantes Acridina e Eosina Y	23
3	A) Friedrich Betz Meyer antes da aplicação de Hematoporfirina IX; B) Meyer três dias depois da aplicação de Hp IX, com um dia de exposição à luz solar. Figuras extraídas de http://www.magicray.ru/RU/lecture/2.html	24
4	Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda	27
5	Estrutura oligomérica de componente do Photofrin®.	36
6	Espectro UV-vis de porfirina (Pp IX) clorina (clorofila) bacterioclorina (bacterioclorofila)	39
7	Porfirinas assimétricas mono-meso substituídas	39
8	Fórmula estrutural Cu^{2+} - clorofilina	41
9	Espectros na região visível para Cu^{2+} -clorofilina (Cu^{2+} - Chl), clorofilina tri esterificada (Chl tri éster) e o Cu^{2+} - clorofilina tri esterificada (Cu^{2+} - Chl tri éster), todas em solução metanólica	106
10	Espectros de absorção de protoporfirina IX, hematoporfirina IX e demais porfirinas derivadas da protoporfirina em solução metanólica: A) obtidos através da Rota II; B) obtidos através das Rotas I e III.	114
11	Espectros de fluorescência dos derivados de Pp IX, obtido por excitação em 532 nm, com fendas de 8 mm, em solução metanólica com absorbância de 0,04 em 532nm: A) composto das Rotas I e II; B) composto Rota III	118
12	Rendimento quântico de fluorescência dos novos fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX, obtido por excitação em 532 nm, com fendas de 8 mm em solução metanólica com absorbância de 0,04 em 532 nm	119
13	Espectro de absorção do triplete-triplete resolvido no tempo para os compostos sintetizados: A)Ppma; B)Pppa; Transiente do decaimento triplete C) Ppma D)Pppa, solução metanólica saturada com ar. Excitado em 532 nm, 5mJ/pulso.	120
14	Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ obtido por excitação de solução metanólica de PppA excitado com laser em 532 nm, 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo.	122
15	Transientes de decaimento da emissão $^1\text{O}_2$ a 1270 nm: A) janela temporal de 0,25µs; B) janela temporal de 0,05µs. Obtidos por excitação em 532 nm em solução metanólica com 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo	123

16	Transiente de emissão a 1270nm para os fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX, obtidos pela Rota III, por excitação em 532 nm, em solução metanólica, com 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo A) janela temporal de 0,25µs; B) janela temporal de 0,05 µs.	125
17	Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) excitados em 532 nm e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H ₂ O, CTAB e SDS para os compostos aniônicos PpNetPO ₃ (A,C e E) e Hp IX (B, D e F) .	130
18	Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H ₂ O, CTAB e SDS para os compostos catiônicos PpNetNI (A, C e E) e PpNetNI (B, D e F) .	134
19	Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F). Todos obtidos em H ₂ O, CTAB e SDS para os compostos Neutros PpNetNA (A, C e E) e PpNetNA (B, D e F) .	137
20	Espectros de UV-vis em solução aquosa e em meio de cultivo celular (DMEM) para os compostos derivados de Pp IX obtidos pela Rota III.	141
21	$\log P_{o/a}$ para os novos fotossensibilizadores porfirínicos derivados de Pp IX em função do pH: A)compostos obtidos pelas Rotas I e II B)Compostos obtidos pela Rota III.	143
22	Taxa de incorporação dos novos fotossensibilizadores (20 µM), em lipossomos aniônicos de fosfatidil glicerol (1mg/mL).	146
23	Espectros de absorção em metanol de Cu ²⁺ - clorofilina, ChlnpnA e ChlnpnI	148
24	Espectros de fluorescência em metanol para ChlnpnA e ChlnpnI, excitados em 532 nm, com fendas de 8 mm, com Abs de 0,04 em 532nm.	150
25	Rendimento quântico de fluorescência para o azul de metileno (AM) e para os dois novos fotossensibilizadores derivados de clorofila, ChlnpnA e ChlnpnI.	151
26	Espectro de emissão de ¹ O ₂ obtido por excitação de solução metanólica de ChlnpnA, excitado com laser em 532 nm, com 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo e absorbância de 0,2 em 532 nm	152
27	Transientes de emissão de oxigênio singlete emitidos por Hp IX, ChlnpnA e ChlnpnI em metanol. A) janela temporal de 0,25µs; B) janela temporal de 0,05µs. Excitados em 532 nm.	154
28	Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H ₂ O, CTAB e SDS para os compostos ChlnpnA (A,C e E) e ChlnpnI (B, D e F)	156
29	Espectros de UV-vis: A) ChlnpnA; B) ChlnpnI. Ambos foram determinados em DMEM e em solução aquosa, em pH = 7,2.	158
30	$\log P_{o/a}$ para os novos fotossensibilizadores derivados de clorofilina: ChlnpnA e ChlnpnI em função do pH.	159

31	Comparação das taxas de incorporação para os derivados de protoporfirina IX. [Fs]= 20 μ M; em lipossomo aniônicas $\approx$ 1mg.mL ⁻¹ , células e em mitocôndrias 10 ⁶ células.mL ⁻¹ , mitocôndria 13 mg.mL ⁻¹ .	161
32	Fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores a 20 μ M em células tipo HeLa 10 ⁶ células.mL ⁻¹ , irradiado em 532 nm, com dose de 2,7 mJ.cm ⁻² : A) obtido por funcionalização de protoporfirina em 3 ¹ e 8 ¹ e hematoporfirina em 3 ¹ e 8 ¹ , e em 13 ³ e 17 ³ ; B) obtidos por funcionalização de protoporfirina em 13 ³ e 17 ³ . Lipossomos de fosfatidilglicerol 1mg.mL ⁻¹	164
33	Comparação das taxas de incorporação dos derivados de clorofilina a 20 μ M em 10 ⁶ células.mL ⁻¹ , lipossomo aniônico $\approx$ 1mg.mL ⁻¹ e mitocôndrias 13mg.mL ⁻¹ . Experimentos realizados em triplicata.	167
34	Fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores (ChlNpNA e ChlNpNI) e azul de Metileno (AM) a 20 μ M em células tipo HeLa, 10 ⁶ células.mL ⁻¹ , irradiadas em 650 nm, com dose de 2,4 mJ.cm ⁻² .	169
35	Micrografia de fluorescência de Hp IX (painel A), Rodamina 123 (painel B) e sobreposição de Hp IX e Rodamina 123 (painel C).	172
36	Micrografia de fluorescência de PpNetPO ₃ (painel A), Rodamina 123 (painel B) e sobreposição de PpNetPO ₃ e Rodamina 123 (painel C).	173
37	Micrografia transmitida (painel A), de fluorescência de PpNpNI (painel B), Rodamina 123 (painel C) e sobreposição de PpNpNI e Rodamina 123 (painel D)	174

Lista de Esquemas

1	Diagrama cronológico do desenvolvimento da TFD.	26
2	Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação em TFD. Mecanismos Tipo I e Tipo II de fotossensibilização, sendo: Fs o fotossensibilizador no estado fundamental, $^1\text{Fs}^*$ primeiro estado excito singleto e $^3\text{Fs}^*$ primeiro estado tripleto e CIS cruzamento intersistema.	29
3	Processos fotoinduzidos que podem ocorrer após excitação eletrônica do Fs.	31
4	Rota biossintética da protoporfirina IX a partir do ácido α -aminolevulínico.	36
5	Macroclícos aromático, porfirínico e seus derivados (clorínicos e bacterioclorínicos).	38
6	Representação das formas de agregação: (a) face a face; (b) entre laterais; (c) faces laterais; (d) entre faces paralelas deslocadas.	42
7	Fatores que afetam o equilíbrio entre agregado e monômero.	43
8	Excitação eletrônica para porfirinas monoméricas (a) e agregadas de forma linear (b) e paralelas (c).	43
9	Correlação angular entre o agregado tipo J e H.	44
10	A) célula humana; B) Mitocôndria; C) Membrana plasmática; D) espaço intermembrana mitocondrial. (figura montada a partir de imagens disponíveis na internet).	47
11	Aparato de obtenção de HCl:MeOH.	51
12	Representação esquemática do sistema de fotólise por pulso para detecção de variações de absorção de espécies transientes.	76
13	Representação esquemática do sistema de emissão no infravermelho para detecção de oxigênio singleto, por pulso de laser.	77
14	Diagrama de derivação de Hematoporfirina IX 1) Hp IX 2) intermediário tetra-clorado (novo) 3) Dimetil-8,13-Bis(dietilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida).	79
15	Diagrama de derivatização de Protoporfirina IX: (Pmet) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster (Pma) 8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato, (Pppma) Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster . (Ppa) 8,13-Bis(1-dipropliamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato e (Pppa) Dimetil-8,13-Bis(1-dipropliamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster.	85

16	Rota III para a obtenção de derivados de Protoporfirina IX. 4) Pp IX 12) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida] (PpNetNA) 13) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2(propanoilamino)etanoamônio] (PpNetNI) 14) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina)prpil]butanamida] (PpNpNA) 15) dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio (PpNpNI) 16) dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(propanoilamino)etil]fosfônico ácido] (PpNetPO ₃).	91
17	Rota III para a obtenção de derivados de protoporfirina IX: 4) Pp IX 17) dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-trietoxisilano)propil]butanamida] (PppSi(Oet) ₃) 18) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(-dipropil-L-alfa-fosfatidiletanolamina).	92
18	Equilíbrio entre a fração metalada e desmetalada de clorofilina.	103
19	Rota sintética de obtenção dos novos fotossensibilizadores porfirínicos derivados de Cu ²⁺ - clorofilina.	107

Lista de Tabelas

1	Propriedades físico-químicas dos três estados de oxigênio molecular	32
2	Tempo de vida de $^1\text{O}_2$ em vários solventes	33
3	Comparação dos métodos de eliminação do íon Cu^{2+} de Cu^{2+} -clorofilina	105
4	Comprimento de onda e ϵ relacionados para todas as bandas de cada porfirina	116
5	Propriedades fotofísicas de derivados de Pp IX (rotas I e II)	124
6	Propriedades fotofísicas de derivados de Pp IX (rotas III)	126
7	Comprimento de onda e ϵ para os novos fotossensibilizadores	149
8	Propriedades fotofísicas de derivados de Clorofilina	155
9	Área celular de fluorescência para Rd e Hp IX	172
10	Área celular de fluorescência para Rd e PpNetPO ₃	173
11	Área celular de fluorescência para Rd e PpNpNI	174

Lista de Símbolos

δ	Deslocamento químico
----------	----------------------

ε	Coeficientes de extinção molar
---------------	--------------------------------

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
----------------	-------------------

$^3\text{O}_2$	Oxigênio
----------------	----------

$\Delta\Psi$	Potencial eletroquímico negativo
--------------	----------------------------------

ϕ_{f}	Rendimento quântico de fluorescência
-------------------	--------------------------------------

ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete
-----------------	---

λ_{max}	Comprimento de onda de máxima absorção
------------------------	--

Lista de Abreviaturas

Abs	Absorbância
AM	Azul de Metileno
COSY	Espectro de correlação ^1H - ^1H
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufoxido
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
Fig.	Figura
Fs	Fotossensibilizador
HAc	Ácido Acético
HAA	Dimetil-8,13-bis(dietilamia)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida)
HETCOR	Espectro de correlação Heteronuclear ^1H - ^{13}C
HOMO	Orbital ligante de mais alta energia
Hp IX	Hematoporfirina IX
HpD	Derivado de Hematoporfirina
IV	Infravermelho
$\log P_{\text{O/A}}$	Logaritmo da partição 1-octanol/tampão
LUMO	Orbital antiligante de mais baixa energia
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de Metiltiazildifenil-tetrazolico
PBS	Tampão fosfato

PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
Pmet	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster
PMT	Fotomultiplicadora
Pp IX	Protoporfirina IX
Ppma	Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster
PpNetNA	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida]
PpNetNI	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2-(propanoilamino)etanoamônio]
PpNetPO ₃	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(propanoilamino)etil]fosfônico ácido]
PpNpNA	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina)propil]butanamida]
PpNpNI	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio]
PpNpSi(Oet) ₃	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-(Trietoxisilano)propil]butanamida]
Pppa	Dimetil-8,13-Bis(1-dipropliamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster
Pp-PE	Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis-(dipropil-L- alfa-fosfatidiletanolamina)
<i>rf</i>	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Espectro de ressonância magnética de carbono
RMN de ¹ H	Espectro de ressonância magnética de hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SDS Dodecil sufato de Sódio

TFD Terapia Fotodinâmica

THF Tetrahidrofurano

TLC Cromatografia em placa fina

UV-vis Ultravioleta – Visível

RESUMO

Uchoa-Fernandes, A. **Síntese, Caracterização e Fotoatividade de Fotosensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina**. 2007. 222 p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química (Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Processos que envolvem sensibilização são extremamente importantes para diversas áreas do conhecimento, incluindo a biologia, a química e a medicina. A aplicação de sensibilização em medicina tem se destacado, especialmente, em face de uma modalidade alternativa de tratamento de câncer denominada terapia fotodinâmica (TFD). Uma das linhas de pesquisas fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos fotosensibilizadores (Fs) com composição definida, que absorvam na janela terapêutica (600-800nm) e que apresentem maior eficiência na indução de apoptose. Os Fs que apresentam cargas positivas e que são relativamente lipofílicos, permeiam membranas e são atraídos pelo potencial negativo das mitocôndrias, que tem papel central no controle da vida e da morte celular. Neste trabalho foi realizado um estudo da influência dos grupos funcionais na atividade dos Fs, através da funcionalização da protoporfirina IX (Pp IX). Foram estudadas três diferentes rotas sintéticas. Na rota I (esquema 14), utilizou-se como composto de partida a Hematoporfina IX (Hp IX), a qual foi funcionalizada com grupos aminas e amidas, respectivamente, nas hidroxilas e nas carboxilas. Esta rota forneceu baixo rendimento global (20%), e compostos de difícil purificação, no entanto obteve-se 1 composto puro. Na rota II (esquema 15), utilizou-se como composto de partida a Pp IX, a qual foi funcionalizada nos grupos vinílicos com grupos aminas. Obteve-se 4 compostos, com rendimento global de reação superior a 50%, mas observou-se que ocorre uma reação de eliminação que impede a quaternarização das aminas localizadas nas posições α ao anel porfirínico. Na rota III (esquema 16), os grupos carboxílicos de Pp IX foram transformados em cloreto de ácido, que foram substituídos por compostos bifuncionais, amina primária e um segundo grupo. Esta rota possibilitou a obtenção de 7 compostos, inclusive compostos quaternários com rendimento global de reação superior a 70%. Dois derivados da clorofilina, que apresentam a banda Q_{IV} com um ϵ elevado em 650nm, foram também sintetizados. Todos os compostos, foram caracterizados estruturalmente de forma inequívoca através do espectro eletrônico (UV-vis e fluorescência), vibracional no infravermelho, RMN de 1H e ^{13}C (1D e 2D) e espectrometria de massa. A série de compostos obtidos permitiu um estudo da relação entre a estrutura química do Fs com a sua fotoatividade. As propriedades fotofísicas foram caracterizadas por espectro de absorção e de emissão, fotólise de relâmpago a laser, eficiência quântica de fluorescência e de geração de oxigênio singlete. Estas determinações indicaram que as propriedades fotofísicas dos Fs não foram consideravelmente alteradas no processo sintético. Foi determinada a formação de agregados em solução aquosa e o equilíbrio monômero agregado foi deslocado no sentido da formação do monômero na presença de micelas de CTAB e SDS e de soro fetal. Observou-se, que a contribuição para desagregação é mais eficiente quando a carga da micela é oposta à do Fs. Foi determinado o coeficiente de partição octanol/água

($\log Po/a$) em função do pH e constatou-se que os compostos que têm carga líquida apresentam valores de $\log Po/a$ entre -1 e 1 na faixa de pH entre 3 e 10. A incorporação destes compostos em lipossomos, seguiu perfil esperado considerando a carga, o $\log Po/a$ e a característica anfifílica dos compostos sintetizadas. Genericamente a eficiência de morte celular fotoinduzida seguiu o perfil de incorporação das drogas em células HeLa. Os estudos comparativos da citolocalização foram realizados por co-encubação das porfirinas sintetizadas com rodamina 123 (Rd), que se concentra em mitocôndrias. A localização em organelas citoplasmáticas foi determinada através de imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal. A sobreposição da emissão da Rd foi de 80% e 31% com o composto catiônico PpNpNI e aniônico PpNetPO₃, respectivamente, comprovando a localização mitocondrial do composto positivo.

Palavras-chave: PDT, Terapia Fotodinâmica, Porfirinas, Células HeLa, Mitocôndria, Membrana

ABSTRACT

Uchoa-Fernandes, A. **Synthesis, Characterization and Photoactivity of Photosensitizers Derivatived from Protoporphyrin IX and Chlorophyllin.** 2007. 222 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Processes that involve sensitization are extremely important for several areas of knowledge, including biology, chemistry and medicine. The application of sensitization in medicine is especially important, in face of an alternative modality of cancer treatment called Photodynamic Therapy (PDT). One of the lines of basic research important for the evolution of PDT is the development of new photosensitizers (PS) with defined composition, that absorb in the therapeutical window (600-800nm) and that present greater efficiency in the induction of apoptosis. Positively charged PS with the proper lipophilic/hidrophilic balance permeate membranes and are attracted by the negative potential of mitochondria, which is an organelle that has central roles in the control of cell life and death. In this work the influence of the functional groups in the activity of PS was carried out, through the functionalization of protoporphyrin IX (Pp IX). Three different synthetic routes were used. In route I (scheme 14), Hematoporphyrin IX (Hp IX), was used as departure compound and it was modified with amino and amide groups in hydroxyls and carboxyls, respectively. We found low yield in the synthetic (20%) and purification steps. However 1 pure PS was obtained. In route II (scheme 15), Pp IX was used as departure compound, which was modified in the vinilic groups with amino groups. We obtained 4 compounds, with global yield superior than 50%, but it was observed that an elimination reaction occurs that hinders the quarternization of the amino groups located in position α to the porphyrin ring. Into route III (scheme 16), the carboxilic groups of Pp IX had been transformed into chloride acid, which was substituted by bi-functional groups, primary amine in one side and another group in the other. This route made it possible to obtain 7 compounds, including quaternary ammonium compounds with global yield superior than 70%. Two derivatives of chlorophyllin, that present Q_{IV} band with large extinction coefficient in 650nm, also were synthesized. All compounds were characterized structurally through the electronic and vibrational spectra (UV-vis and fluorescence, IR), RMN of 1H and ^{13}C (1D and 2D) and mass spectrometry. This series of compounds allowed us to study the relation between the chemical structure of the Fs with its photoactivity. The photophysical properties were characterized by emission and absorption spectra, laser flash photolysis, fluorescence emission in the visible and NIR regions (generation of singlet oxygen). These determinations indicated that the photophysical properties of the PS were not modified in the synthetic process. The formation of aggregates were characterized in aqueous solution and the balance between aggregate and monomer species was dislocated in the direction of the formation of monomers in the presence of CTAB, SDS micelles and fetal serum. It was observed, that the disaggregating efficient is larger with micelles that have the opposite charges to that of the PS. The Octanol water partition coefficient ($\log Po/a$), was determined as a function of pH. $\log Po/a$ values between -1 and 1 were observed for charged PS in the pH range of 3-10. The incorporation of these compounds in liposomes, followed the

expected profile considering the charge, logPo/a and the amphifilic nature. Generically, the photoinduced cell death efficiency followed the profile of incorporation of the PS in HeLa cells. Comparative studies of cytolocalization were carried out by co-incubation of the cells with porphyrins and Rhodamine 123 (Rd), which localizes in mitochondria. The localization in cytoplasmic organelles was determined through fluorescence confocal microscopy images. The overlapping emission of the Rd was of 80% and 31% with the cationic PpNpNI and the anionic PpNetPO3 compounds, respectively, proving the mitochondrial localization of the positive PS.

Keywords: PDT, Porphyrin, HeLa Cells, Mitochondria, Membrane

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Terapia Fotodinâmica (TFD)

Ação fotodinâmica refere-se à destruição do tecido vivo por luz visível em presença de um fotossensibilizador (Fs) e de oxigênio. A energia luminosa é absorvida pelo Fs e transferida para o meio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos às biomoléculas.^{1,2} O uso deste efeito na medicina - Terapia Fotodinâmica (TFD) - é promissor para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo uma alternativa cada vez mais utilizada em detrimento dos tratamentos tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). Também outras doenças, tais como psoríase, artrite reumatóide sistêmica, degeneração macular da retina, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose e AIDS têm sido tratadas com TFD.^{3,4,5} A busca do conhecimento dos mecanismos de ação da TFD, o desenvolvimento dos Fs e das fontes de luz podem e devem trazer benefícios a muitas pessoas.

1.2 - Aspectos Históricos

A ação fotodinâmica é conhecida há séculos através de uma doença denominada porfiria. O conhecimento do mecanismo de ação desta doença levou ao desenvolvimento da TFD. Civilizações antigas (do Egito, China e Índia) usavam a ação fotodinâmica através da ingestão de plantas que continham psoralenos seguidas de exposição à luz solar para tratar o vitiligo.^{4,6} No entanto, a primeira publicação científica neste assunto data de 1900 e reporta o trabalho de Raab Oscar, da Universidade de Munique, que utilizou corante acridina para matar organismos unicelulares (*paramecium*)⁷. A primeira aplicação clínica ocorreu em 1903 quando Tappeiner e Jesionek usaram eosina na clínica dermatológica. Em 1904, eles chamaram a atenção para a necessidade do oxigênio no processo e usaram, pela primeira vez,

o termo TFD.^{4,8} Em 1909, Hasselbach mostrou o aumento da constante de fotoreação na presença de oxigênio. Tappeiner e Jesionek foram os primeiros a utilizar a eosina no tratamento de carcinomas em humanos^{4,9} (Figura 1).

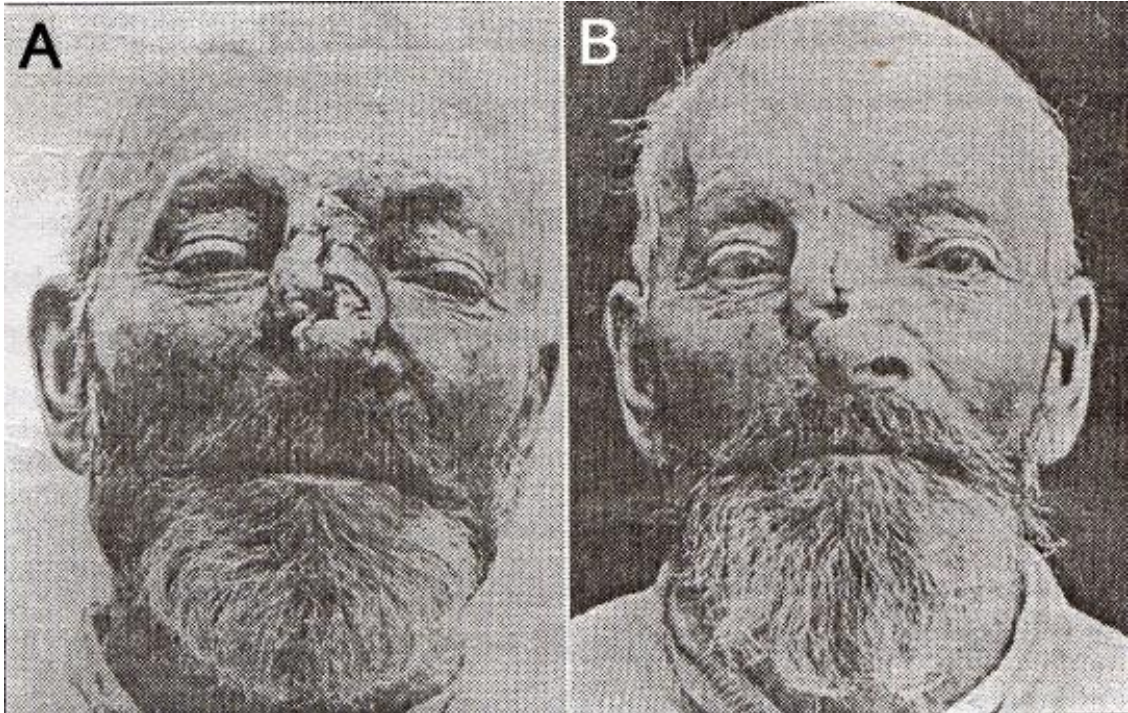


Figura 1: Paciente com câncer de pele tratado por Tappeiner, H. e Jesionek, H., com solução de eosina 1% em 1905. A) antes do tratamento B) depois do tratamento. Figuras extraídas de <http://www.magicray.ru/RU/lecture/2.html>

Em 1905, eles descreveram os resultados do primeiro tratamento em seis pacientes com câncer de pele facial. Este tratamento foi realizado usando uma solução de 1% de eosina e exposição à luz solar.⁶ Após um período de 12 meses de tratamento, quatro dos seis pacientes apresentaram remoção total dos tumores, enquanto os outros dois apresentaram remoção parcial.

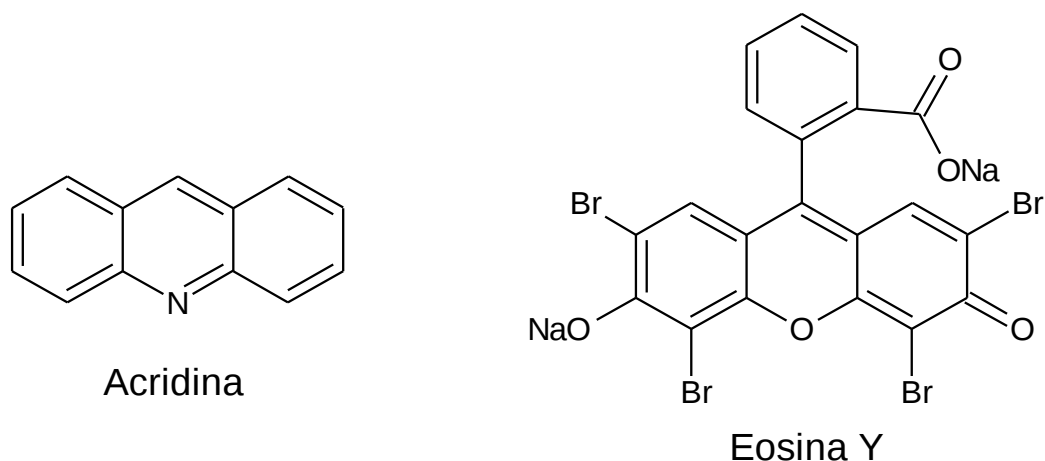


Figura 2: Fórmula estrutural dos corantes Acridina e Eosina Y

Em 1908, Hausmann W. H. começou os primeiros experimentos de fotocitotoxicidade com hematoporfirina IX (Hp IX), os quais foram realizados mediante administração da droga em camundongos que foram expostos à luz solar. Os efeitos foram associados à destruição da vascularidade tumoral.¹⁰ Em 1912, o efeito também foi demonstrado por Hans Fischer em Munique. A primeira demonstração de TFD por Hp IX em humanos ocorreu em 14 de outubro de 1912. Conhecendo a atividade fotodinâmica de Hp IX em cobaias, Friedrich Meyer-Betz autoinjetou 200 mg deste composto dissolvido em 10 ml de NaOH 0,1mol.l⁻¹ e diluído em 300 mL de soro fisiológico e manteve-se dois dias sob proteção da luz, sem apresentar nenhum efeito dermatológico. Dois dias depois, foi exposto ao sol, e sofreu os efeitos da TFD (Fig. 3). Em seguida, ele observou que protegendo o lado esquerdo da face os efeitos ficaram restritos ao lado direito. Além disto, Mayer apresentou fotossensibilidade prolongada aos efeitos da TFD, que se estenderam por vários meses.⁶

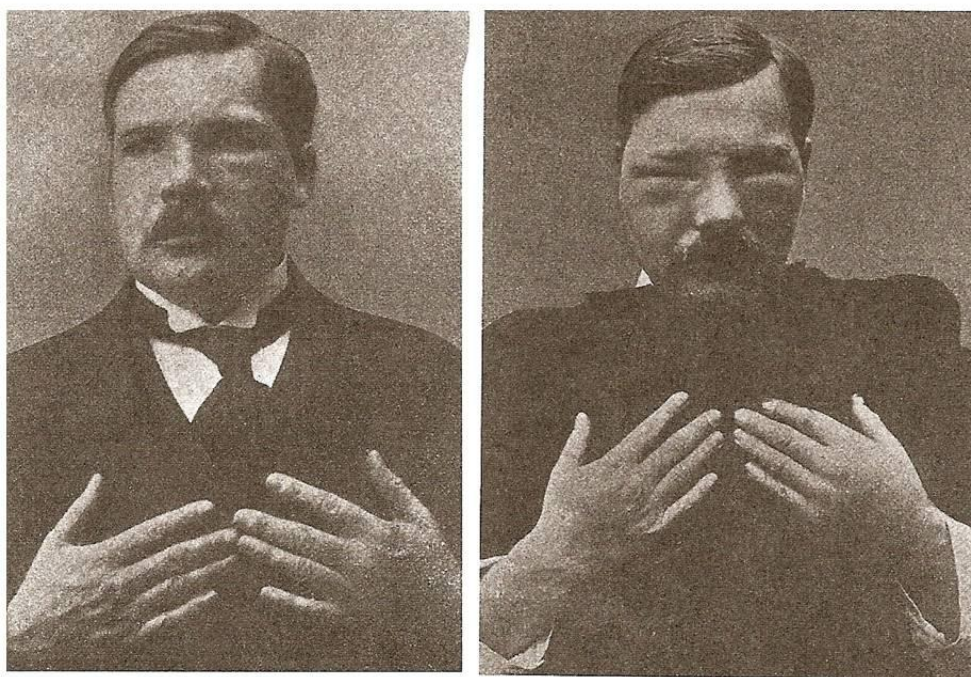
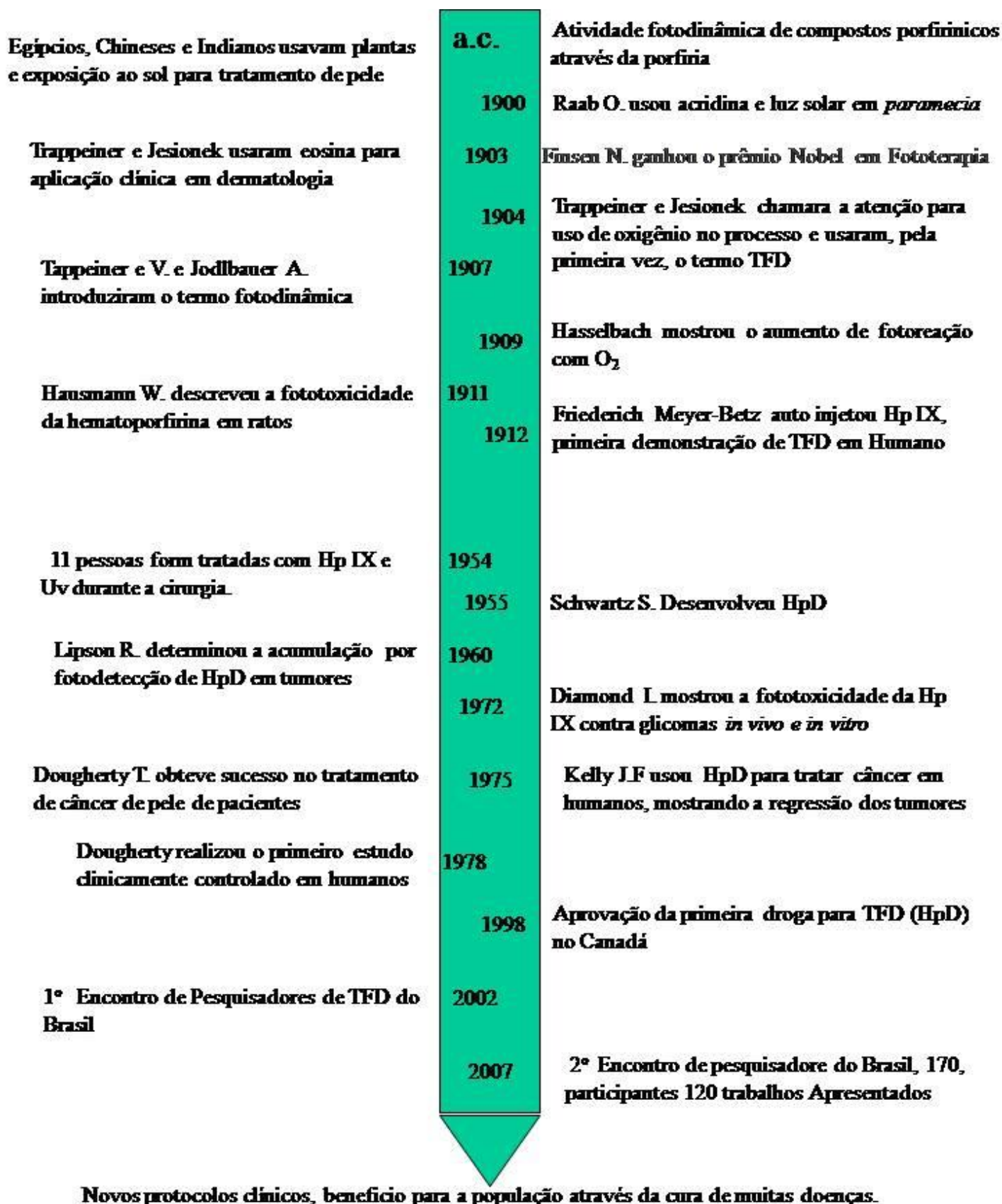


Figura 3: a) Friedrich Betz Meyer antes da aplicação de Hematoporfirina IX b) Meyer três dias depois da aplicação de Hp IX, com um dia de exposição à luz solar. Figuras extraídas de <http://www.magicray.ru/RU/lecture/2.html>

Em 1954 um grupo de 11 pessoas com câncer recebeu um tratamento pré-operatório com introdução intravenosa de Hp IX e irradiação com luz ultravioleta durante a cirurgia. Após a irradiação, foi observada fluorescência no vermelho dos tumores. Deste estudo, foi concluído que a droga poderia ser utilizada para o diagnóstico de tumores.¹¹ Posteriormente, foi demonstrado por Schwartz que o princípio ativo nos experimentos de Mayer não correspondia à Hp IX, visto que este composto é facilmente eliminado pelo organismo, mas sim a uma mistura de diversos oligômeros da Hp IX proveniente do método de preparação.¹² Esta mistura foi enriquecida e chamada de Derivado de Hematoporfirina (HpD).

Na década de 60, Lipson, um aluno de Schwartz, estudou o acúmulo preferencial da droga em tumores de cobaias e a regressão dos mesmos mediante irradiação. Como resultados positivos deste estudo, Lipson tratou com sucesso de uma mulher que possuía câncer de mama usando HpD e irradiação seletiva do tumor, marcando assim, o início da TFD como

terapia clínica para câncer.^{13,14} Na década de 70, surgiram várias preparações de derivados porfirínicos, levando ao desenvolvimento de novos Fs e ao melhoramento do HpD, denominado Photofrin II.¹⁵ Em 1975, a TFD ganhou um novo impulso com os trabalhos de Dougherty, T. e os de Kelly, J.F. Ambos utilizaram esta terapia para tratar câncer de pele. Na década de 80, o HpD foi otimizado, conseguindo sua aprovação em 1998 para tratamento do câncer por TFD pela FDA/EUA (Food and Drug Administration), sendo posteriormente aprovado em outros países: Canadá, Alemanha, França, Japão e Brasil. O Esquema 1 representa a evolução cronológica da TFD desde as civilizações mais antigas (Egito, China e Índia)⁹ até os dias atuais, quando a TFD passou a ganhar destaque, também no tratamento de outras doenças.



Esquema 1: Diagrama cronológico do desenvolvimento da TFD

O grande número de pesquisas realizadas nos últimos anos, tanto no desenvolvimento de fontes luminosas, quanto no de Fs e mecanismos de ação, tem possibilitado um maior e melhor número de tratamentos utilizando TFD a custos reduzidos. A TFD parece ter encontrado, definitivamente, seu espaço no Brasil, tanto no que se refere à pesquisa quanto ao tratamento. O primeiro encontro de pesquisadores da área foi realizado em 2002 e o segundo, em junho de 2007. Neste último encontro os participantes decidiram pela realização bienal do evento. Já no campo da aplicação, são inúmeras as instituições de saúde que utilizam esta metodologia no tratamento de várias doenças. Dada a ascendência do número de pesquisadores envolvidos, espera-se o surgimento de Fs e técnicas de aplicação mais eficazes e de menor custo, contribuindo para popularização desta terapia (Esquema 1).

1.3 - Mecanismos de Ação

O passo inicial no processo de fotossensibilização é a excitação eletrônica. Uma característica importante de Fs utilizado em TFD é que ele possa ser excitado em comprimentos de onda de maior penetração no tecido biológico. A figura 4 ilustra um diagrama de penetração da luz no tecido em função do comprimento de onda, onde se pode observar que a penetração é maior na região do vermelho e do infravermelho próximo.

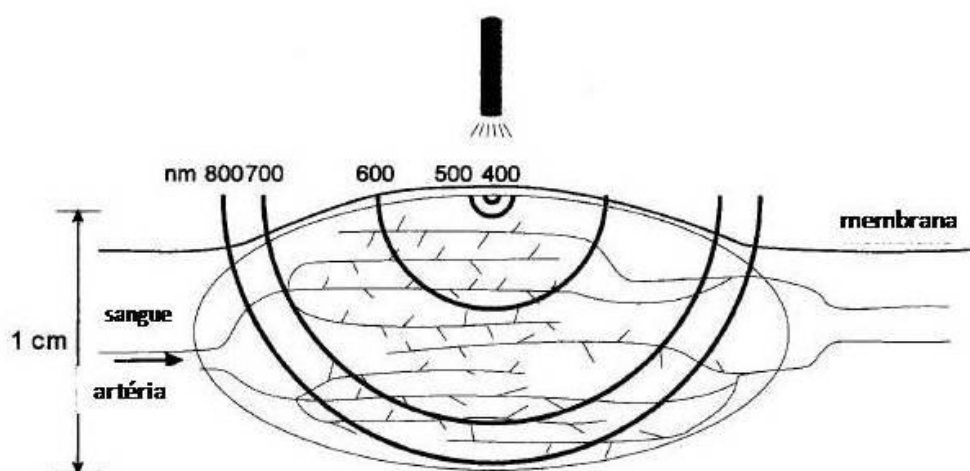
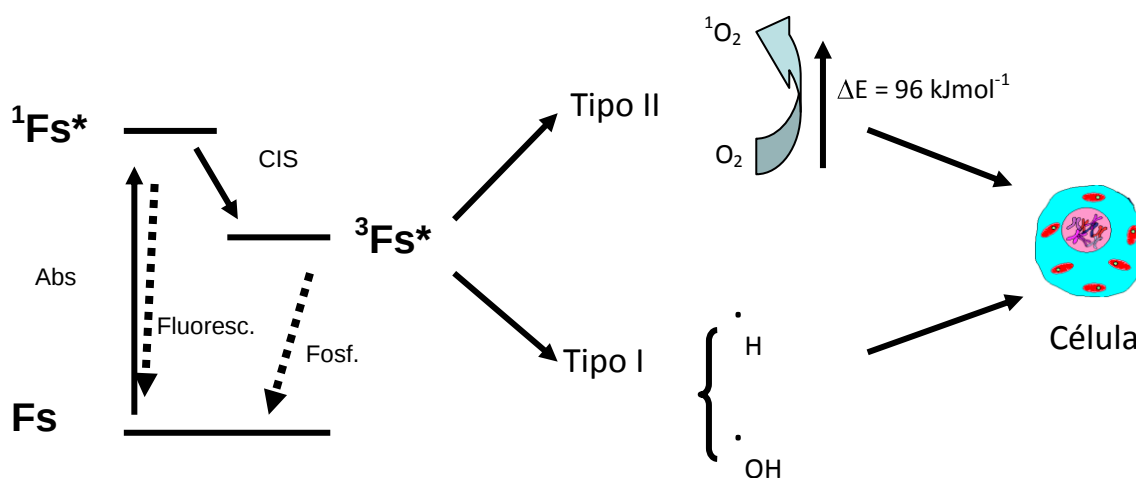


Figura 4: Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda.

Fotossensibilizadores que absorvem na região do infravermelho próximo permitem o tratamento em tecidos mais profundos (1 centímetro), possibilitando o tratamento de tumores maiores e mais internos. Entre os Fs com estas características destacam-se alguns grupos, tais como as clorinas, bacterioclorinas e seus derivados, e as ftalocianinas. Os derivados de clorofilas e bacterioclorofilas são de difícil obtenção, visto que estes compostos são instáveis e de difícil purificação.¹⁶

Processos que envolvem sensibilização são extremamente importantes para diversas áreas do conhecimento, incluindo a biologia, a química e a medicina.^{17,18,19,20} Diversos fenômenos fundamentais dos organismos vivos, como a fotossíntese, dependem da absorção luminosa e de processos fotofísicos e fotoquímicos subsequentes.²¹ A transferência de energia de moléculas excitadas diretamente para bases nitrogenadas de DNA (possível quando a energia da molécula excitada é maior do que a energia de absorção das bases nitrogenadas, $\lambda < \sim 320$ nm), pode causar efeitos genotóxicos e citotóxicos.²² A aplicação de sensibilização em medicina tem se tornado extremamente importante, especialmente devido ao desenvolvimento da TFD, que usa a geração *in situ* de espécies reativas, para induzir a diminuição/destruição de tumores.⁶ O Esquema 2 ilustra os processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos, que levam a um desequilíbrio redox e podem levar as células à morte.



Esquema 2: Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismos de ação em TFD. Mecanismos Tipo I e Tipo II de fotossensibilização, sendo: Fs o fotossensibilizador no estado fundamental, $^1\text{Fs}^*$ primeiro estado excitado singlete e $^3\text{Fs}^*$ primeiro estado tripleto e CIS cruzamento intersistema.

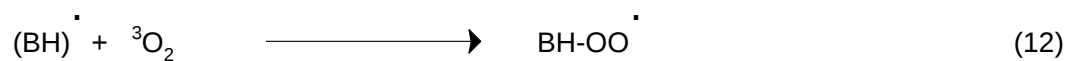
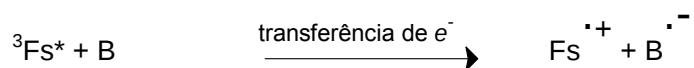
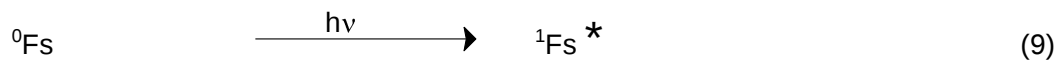
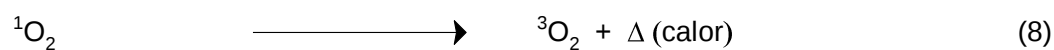
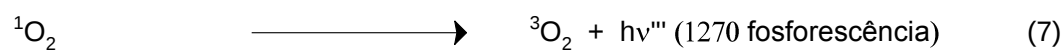
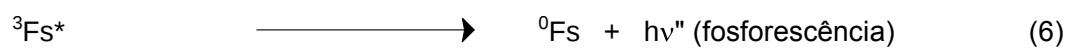
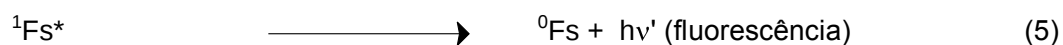
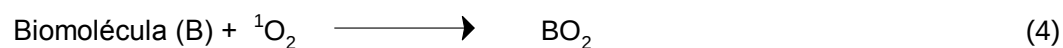
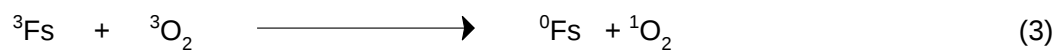
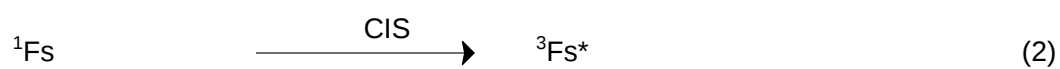
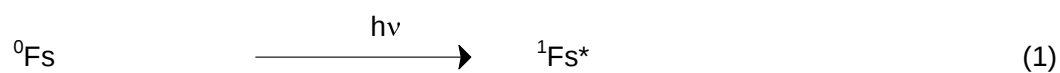
Como ilustra o diagrama de Jablonski (Esquema 2), os processos de desativação das moléculas são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar a contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada processo. Assim, espera-se que um bom Fs faça cruzamento intersistema, apresentando um alto rendimento quântico do estado tripleto e de geração de oxigênio singleto. Outros fatores são também importantes para a eficácia de um Fs. A incorporação em tumores, e a citolocalização celular são dois fatores fundamentais.^{3,6}

Os danos causados pelos Fs em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais. No primeiro (mecanismo TIPO I), a energia das moléculas excitadas é transferida para o oxigênio ou outras biomoléculas através da transferência de elétron (mecanismo radicalar) que culmina em danos diretos às biomoléculas através da formação de espécies ativas de oxigênio, por exemplo, radical superóxido.^{23,24} No mecanismo TIPO II, a energia de excitação é transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar danos em membranas,

proteínas e DNA, tanto por ação direta quanto por formação de radicais a partir de oxigênio singlete.^{25,26,27,28}

No tratamento por TFD, o Fs incorporado nas células é irradiado através de um laser ou de outra fonte luminosa que emite na região de absorção do corante, promovendo a excitação eletrônica. Atingido o estado excitado, diversos processos podem ocasionar a desativação de uma molécula: a energia pode ser devolvida ao ambiente na forma de calor, pode ser liberada na forma luminosa (fluorescência), ou fazer cruzamento intersistema, atingindo o estado triplete, que pode ser desativado por fosforescência. O tempo de vida do estado triplete é grande o suficiente para permitir a supressão por transferência de energia por colisão com o oxigênio ($^3\text{O}_2$), levando à formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Estes processos estão representados no Esquema 3. O oxigênio singlete pode ser detectado por emissão luminosa no infravermelho próximo (eq.7 Esquema 3) ou pelo calor liberado (eq. 8, Esquema 3).

O estado triplete também pode ser desativado por transferência eletrônica quando a molécula excitada capta ou doa elétrons de moléculas próximas, formando radicais. As equações 1-4 (Esquema 3) descrevem o processo de transferência de energia para a molécula de oxigênio, conduzindo à formação de oxigênio singlete. Já as equações 9-12 ilustram o processo de transferência de elétrons, que conduz a reações via radical.



Esquema 3: Processos fotoinduzidos que podem ocorrer ap\'os excita\~ao eletr\^onica do Fs.

Ambos os processos são de particular interesse para TFD, uma vez que conduzem à formação de moléculas muito reativas.^{17,18,19,29} São considerados estados singletes do oxigênio molecular os dois estados eletrônicos excitados imediatamente acima do estado fundamental, $^1\Sigma_g^+$ que apresenta elétrons com spins opostos em orbitais degenerados e tempo de vida da ordem de pico segundo, limitando sua detecção e sua reatividade e $^1\Delta_g$ onde os elétrons ocupam o mesmo orbital e se encontram com spins opostos. Esta espécie apresenta tempo de vida da ordem de microssegundos. As propriedades das espécies de oxigênio molecular estão listadas na tabela 1.¹⁶

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos três estados de oxigênio molecular

Estado	Energia		Tempo de vida na fase condensada	Configuração eletrônica do HOMO
	kJ mol^{-1}	$\nu \text{ cm}^{-1}$		
$^1\Sigma_g^+$	155	13120	$< 10^{-9} \text{ s}$	$\uparrow \quad \downarrow$
$^1\Delta_g (^1\text{O}_2)$	94	7882	$\sim 10^{-6} \text{ s}$	$\uparrow\downarrow$
$^1\Sigma_g^- (^3\text{O}_2)$	0	0	∞	$\uparrow \quad \uparrow$

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie eletrofílica altamente reativa. O tempo de vida (τ) do $^1\text{O}_2$ em soluções varia com o solvente, sendo mais longo em solventes deuterados. As interações entre os estados vibracionais das moléculas do solvente e os níveis eletrônicos/vibracionais do $^1\text{O}_2$ produzem a sua desativação. Esta desativação pode ser retardada por substituição do hidrogênio por deutério nos solventes. A tabela 2 mostra que o tempo de vida desta espécie é dependente do solvente sendo maior naqueles que não apresentam hidrogênio.

Tabela 2: Tempo de vida de $^1\text{O}_2$ em vários solventes

solvente	H₂O	D₂O	MeOH	C₆H₆	CS₂	CCl₄	C₆F₆
τ (μs)	2	20	7 a 10	24	200	700	3900

O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em água é de aproximadamente 2 μs . Em sistemas biológicos esse tempo pode ser reduzido em aproximadamente 100 vezes.³⁰ O $^1\text{O}_2$ pode efetuar várias reações com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, principalmente, com sítios de elevada densidade eletrônica (tais como colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados), levando ao dano em biomoléculas e induzindo à morte celular.^{6,27,28,31,32,33}

1.4 - Fotossensibilizadores

Uma das linhas de pesquisa fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos Fs. Buscam-se compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes, contribuindo para uma maior atividade, menor custo e maior popularização da TFD^{3,6,34}. Os estudos *in vitro* e *in vivo* destes compostos, tem apresentado grandes contribuições, não só na busca de fotossensibilizadores mais eficazes, mas também no entendimento dos mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade, contribuindo para o avanço e popularização da TFD.

Para que um composto venha a atuar como um bom Fs é importante que este apresente as seguintes características: 1) Absorção na janela foto-terapêutica (600-800 nm); 2) Características fotofísicas favoráveis: alto rendimento quântico de formação de tripletes, de

oxigênio singlete e pequena constante de supressão destes; 3) Baixa citotoxicidade no escuro; 4) Farmacocinética favorável e fácil eliminação pelo organismo, evitando fotossensibilidade prolongada; 5) Formulação definida, permitindo estabelecer a relação entre a estrutura e a atividade; 6) Solubilidade em meio fisiológico, facilitando a aplicação da droga; 7) Facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutibilidade e custos reduzidos; 8) Permeabilidade em tecido e seletividade; maior afinidade no tecido tumoral em relação ao tecido saudável.^{6,16}

Entre os compostos usados em TFD podemos destacar as porfirinas e seus derivados, clorinas e bacterioclorinas, as ftalocianinas e naftalocianinas, os compostos fenotiazínicos, triarilmetanos e as furanocumarinas.^{6,12,16,34,35}

O primeiro fotossensibilizador a ser aprovado pelas autoridades de saúde para tratamento de câncer através da TFD foi o Photofrin[®], que é uma formulação polimérica de hematoporfirina IX (Hp IX) de constituição indefinida. A Hp IX é um derivado da protoporfirina IX (Pp IX), uma porfirina de origem natural, constituinte da hemoglobina, citocromo c e de outras biomoléculas. Como já mencionado, a atividade fotodinâmica de Pp IX é conhecida há séculos. O acúmulo de compostos porfirínicos no tecido cutâneo gera reações indesejáveis de fotossensibilização, sendo considerado uma enfermidade congênita.

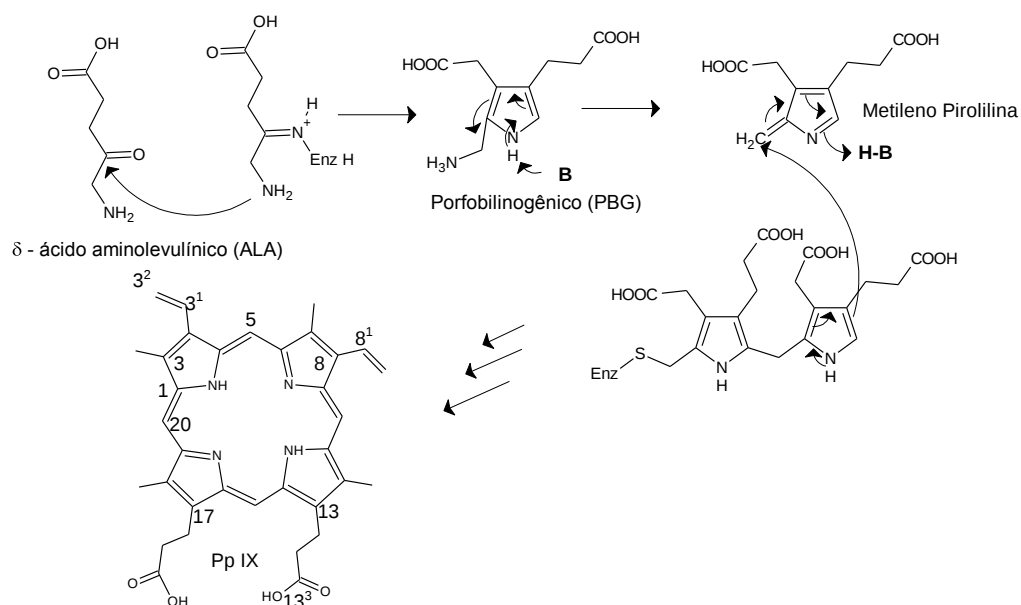
A Pp IX apresenta atividade fotodinâmica *in-vitro*. Porém, o uso prático desta droga é limitado. Por ser insolúvel em meio fisiológico, a aplicação da Pp IX foi viabilizada através do ácido δ -aminolevulínico dissolvido em solução de ácido clorídrico (ALA-HCl na forma de cloridrato), uma pró-droga que é o material de partida para todas as porfirinas *in vivo*, e que é ciclizado por biossíntese, gerando Pp IX no tecido (Esquema 4).^{36,37}

Outra estratégia para viabilização do uso da Pp IX é utilizar a reatividade dos grupos vinílicos, funcionalizando-os com grupos polares, para promover a sua solubilidade em meio

fisiológico. Esta estratégia foi utilizada para inserir hidroxilas nas posições vinílicas 3¹ e 8¹, produzindo a hematoporfirina IX. O método de aplicação da hematoporfirina IX (em meio ácido ou básico) levou à polimerização do cromóforo e, ao surgimento do Photofrin[®], que apresenta o dobro da atividade da hematoporfirina IX, mas também tem a toxicidade dobrada e apresenta composição indefinida.^{38,39}

O Photofrin[®] (figura 5) é uma mistura oligomérica, formada por ligações C-C e C-O (éter) das posições 3¹ e 8¹ e por ligações estes entre as carbonilas das posições 13³ e 17³ com as hidroxilas das posições 3¹ e 8¹. O Esquema 4 apresenta a estrutura da Pp IX com suas posições devidamente numeradas e a rota biossintética simplificada desta porfirina. Além do Photofrin[®] apresentar formulação indefinida, ele está propenso à formação de estados agregados, assim como a Hp IX e Pp IX, tornando a formulação mais complexa⁴⁰. Outro fato é que o Photofrin[®], ao contrário da porfirina de origem, apresenta uma farmacocinética, de certa forma, desfavorável. Embora se acumule em tumores, ele é de difícil eliminação, causando atividade prolongada no paciente.⁴¹

Outra estratégia utilizada foi a funcionalização dos grupos vinílicos através de uma reação Diels-Alder, transformando o anel porfirínico em clorina e inserindo grupos polares. Este processo levou à produção do BPDM (Visudyne)⁴², outro derivado da Pp IX que se encontra no mercado para uso em TFD. Também tem sido utilizada a funcionalização dos grupos carboxílicos para a obtenção de derivados.^{43,44} Além de apresentar baixa solubilidade, a Pp IX tem baixa absorvidade molar na janela terapêutica (600-800 nm). Por isso, as pesquisas para a obtenção de derivados buscam melhorias aumentando a absorvidade na janela terapêutica.



Esquema 4: Rota biosintética da protoporfirina IX a partir do ácido α -aminolevulínico.

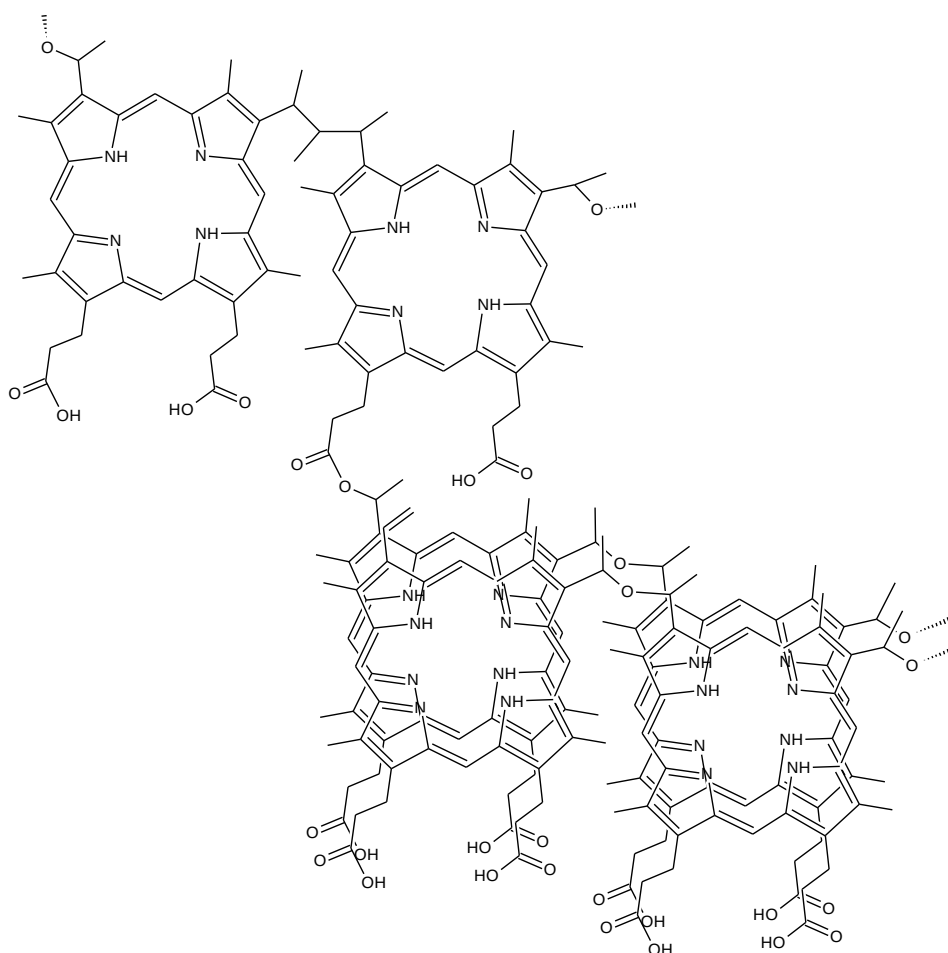


Figura 5: Estrutura oligomérica de componente do Photofrin®.

1.5 – Porfirinas

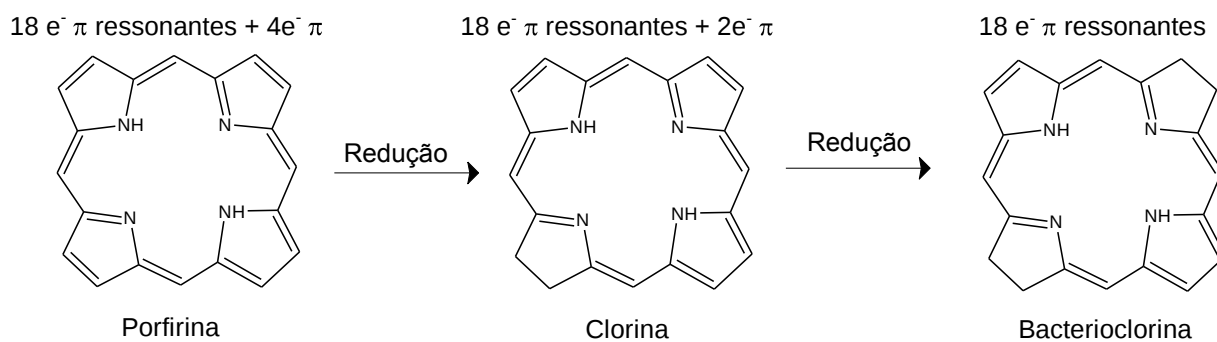
As porfirinas são compostos macro-cíclicos aromáticos que apresentam 18 elétrons π ressonantes mais 4 elétrons π conjugados. Os quatro anéis pirrólicos são planares, com aproximadamente 9Å de diâmetro externo e 4Å de diâmetro interno, apresentam baixa solubilidade em solventes orgânicos e em água. A insolubilidade relativa das porfirinas é atribuída à sua ampla nuvem π . A solubilidade em solventes orgânicos pode ser aumentada por inserção de grupos alquila. De maneira análoga, a solubilidade em água pode ser aumentada por inserção de grupos polares. A relação entre as forças de solvatação das porfirinas e a auto-interação entre as nuvens π pode levar à auto-agregação, descrita mais detalhadamente no item 1.6.

As porfirinas apresentam características óticas espectrais com fortes transições $\pi \rightarrow \pi^*$ na região dos 400 nm, conhecida com banda *soret* ou banda B, e usualmente quatro bandas Q na região do visível, que são numeradas por algarismos romanos, em ordem decrescente de energia. Já nas porfirinas coordenadas a metais divalentes, estas bandas são convertidas em duas, denominadas α e β .¹⁶

As bandas Q são menos intensas porque são resultantes de transições proibidas e são divididas em duas diferentes transições Q_x e Q_y e o seu comportamento é associado com a estrutura vibracional (0-1). Desta forma, as bandas Q_I e Q_{II} são referentes a Q_{y0-1} e Q_{y0-0} , já as bandas Q_{III} e Q_{IV} são referentes as a Q_{x0-1} e Q_{x0-0} .⁴⁵

No sistema porfirínico, duas das duplas ligações periféricas em anéis pirrólicos em posições opostas não participam da aromaticidade, podendo ser reduzidas sem afetar a aromaticidade do anel. A primeira redução conduz a um anel clorínico e a segunda conduz a um anel bacterioclorínico. Estas reduções são acompanhadas de um decréscimo da diferença de energia entre o orbital ligante de mais alta energia (HOMO) e o orbital antiligante de mais

baixa energia (LUMO), causando um deslocamento da última banda Q para o vermelho, e um aumento na probabilidade na transição proibida, evidenciado pelo aumento do coeficiente de extinção molar (ϵ) na banda Q_{IV} . Estes efeitos são evidenciados no anel clorínico, quando comparado com o porfirínico e em maior intensidade no anel bacterioclorínico, cujas estruturas estão apresentadas no Esquema 5. Também é apresentado um espectro exemplo de cada uma das classes na figura 6.



Esquema 5: Macrocíclicos aromático, porfirínico e seus derivados (clorínicos e bacterioclorínicos).

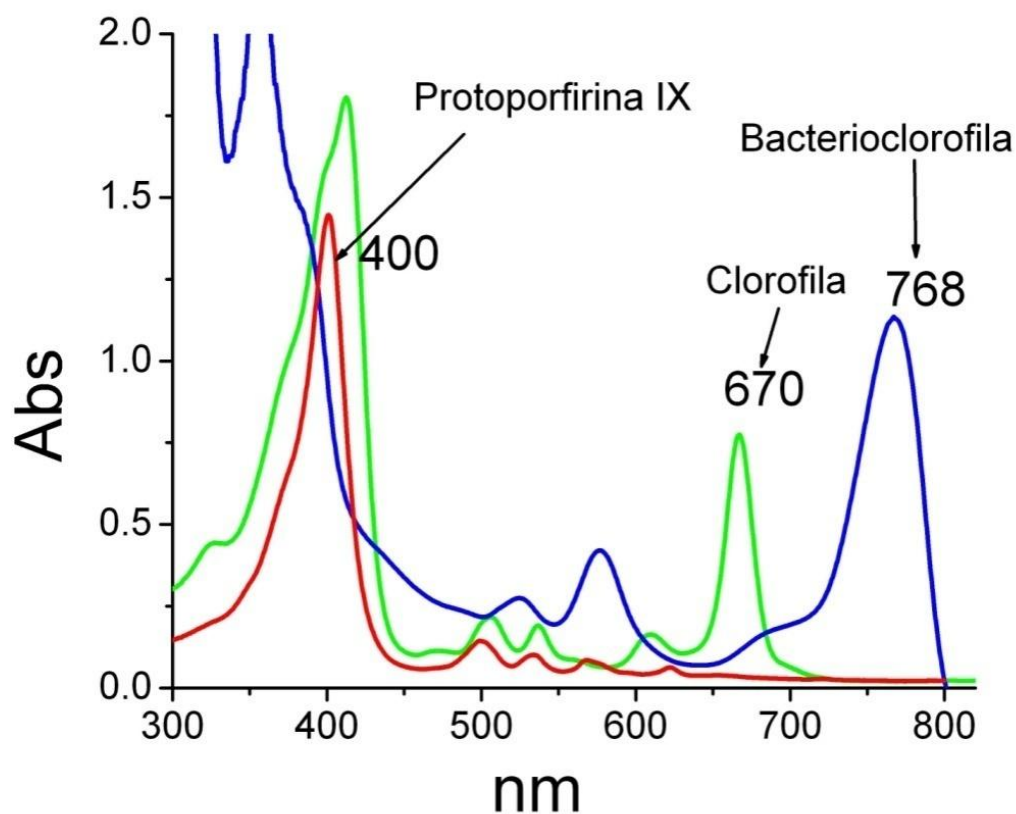


Figura 6: Espectro Uv-Vis de porfirina (Pp IX) clorina (clorofila) bacterioclorina (bacterioclorofila).

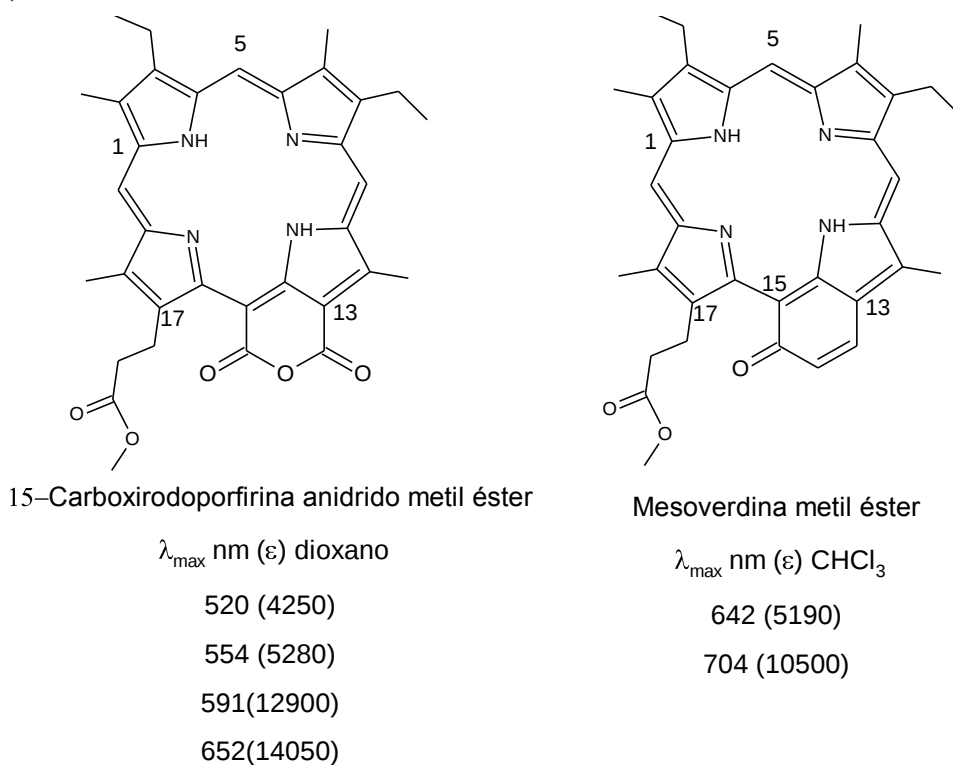


Figura 7: Porphirinas assimétricas mono-meso substituídas.

É importante notar que não só a redução do anel porfirínico causa deslocamento batocrômico. Algumas porfirinas assimétricas, mono-meso substituídas com grupos retiradores adjacentes à posição meso, tais como: 15-Carboxirodoporfirina anidrido metil éster e mesoverdina metil éster (Fig.7), apresentam espectro eletrônico similar à clorofila. Estas porfirinas apresentam um deslocamento batocrômico na última banda (Q_{IV}), a qual é deslocada para comprimentos de onda superiores a 650 nm, com ϵ elevado¹⁶, acima de 10.000. Estas porfirinas têm sido pouco exploradas como Fs para TFD.

A Cu^{2+} -Clorofilina (Fig. 8) é uma porfirina comercial de baixo custo, que é mono-meso substituída, tricarboxilada nas posições 13¹, 15² e 17³, apresenta uma banda Q intensa em 630nm. Cu^{2+} -Clorofilina é precursora da clorofila *a* na síntese de Woodward R. *et al* 1990⁴⁶, e apresenta características espectroscópicas (espectro eletrônico e no infravermelho) muito similares à clorofila *a*^{47,48}, que é matéria prima na síntese de vários compostos utilizados em TFD tais como: A clorina e_6 , MACE, também conhecida como NPe6, Photrochoror e vários derivados da clorina E_6 . A clorofilina diferencia-se estruturalmente dos exemplos citados por apresentar uma dupla entre os C_{17} e C_{18} , ou seja, por apresentar o anel porfirínico. No entanto, assim como a 15-Carboxirodoporfirina anidrido metil éster e mesoverdina metilester, apresenta o espectro com absorção intensa na janela terapêutica. Neste trabalho, aproveitamos estas características para sintetizar novos compostos com propriedades fotodinâmicas promissoras, a partir da Cu^{2+} -Clorofilina, cuja estrutura, devidamente numerada, está ilustrada na figura 8.

A cupro clorofilina apresenta várias aplicações, tais como: atividade inibitória de HIV-I⁴⁹, antibacteriana, antitumoral e foto-conversores em células solares.⁵⁰ No entanto, as metaloporfirinas de Cu^{2+} não formam triplete, o estado excitado S_1 apresenta tempo de vida curto devido a decaimentos não radiativos através dos níveis vibracionais dos orbitais *d* vazios do Cu^{2+} , que é paramagnético.⁵¹ Portanto, as Cu^{2+} -porfirinas não são bons Fs para TFD.

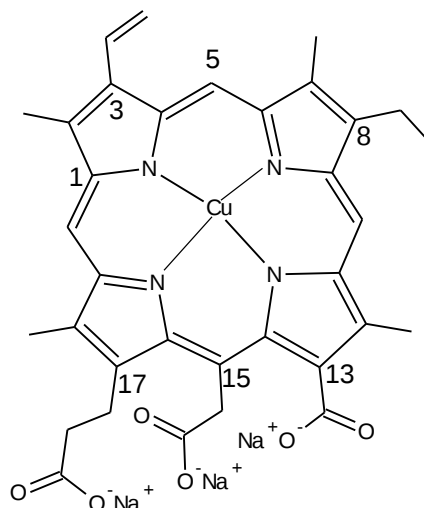


Figura 8: Fórmula estrutural Cu^{2+} - clorofilina

A interação entre Cu^{2+} e o anel porfirínico é relativamente estável, embora o Cu^{2+} possa ser eliminado por protonação com ácidos fortes, como está documentado na literatura.^{46,52,53} Além da possibilidade de obter Fs que absorvam na janela terapêutica, esta porfirina é tricarboxilada em um dos lados da molécula, oferecendo a possibilidade de modificações químicas para obter Fs assimétricos.

1.6 - Agregação

Agregação é um fenômeno intermolecular que ocorre em solução, envolvendo associação entre moléculas do soluto. Na agregação, as moléculas se associam em forma de dímeros, trímeros, e oligômeros e em combinações destes. Dependendo da extensão do fenômeno, pode ocorrer precipitação. Estados agregados são formados quando as interações soluto-soluto são energeticamente mais favoráveis que as interações soluto-solvente. A agregação pode ser de dois tipos: hetero-agregação (entre dois ou mais tipos de soluto) ou auto-agregação.⁵⁴

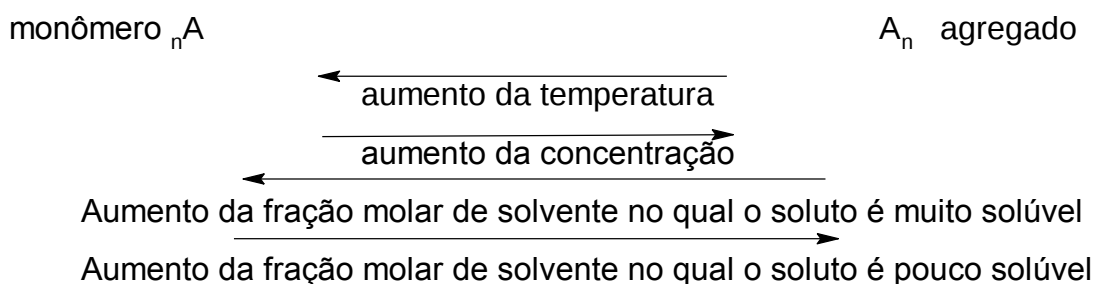
As forças intermoleculares envolvidas podem ser: ponte de hidrogênio, interações eletrostáticas, incluindo interações entre o sistema π , forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. O tipo de força depende da estrutura do composto. As interações do sistema π são as que apresentam maior contribuição para a auto-agregação das porfirinas e de outros compostos aromáticos. Hunter C. A. e Saders J M. K. 1990⁵⁴ publicaram um estudo detalhado a respeito das forças atuantes no sistema π , no qual concluíram que as interações: 1) π - π são predominante repulsivas para faces paralelas; 2) σ - π são predominantemente atrativas para interações laterais e face-lateral em forma de T; 3) σ - π são predominantemente atrativas para interações com faces paralelas deslocadas.



Esquema 6: Representação das formas de agregação: (a) face a face (b) entre laterais (c) faces lateral (d) entre faces paralelas deslocadas.

Nas porfirinas, a estrutura de auto-agregação mais comum é representada no Esquema 6d, faces paralelas deslocadas, onde os anéis estão paralelos e separados por uma distância de 3.4-4.0 Å. Esta forma é atribuída à interação entre os anéis pirrólicos, ricos em elétrons, com sítios de deficiências eletrônicas; os hidrogênios endocíclicos ou com o íon metálico, em metaloporfirinas.^{54,55}

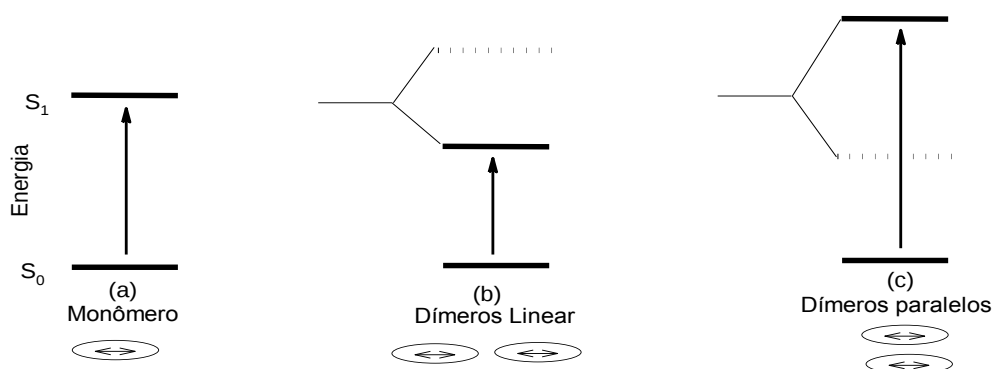
A formação de agregado é um processo reversível que geralmente encontra-se em equilíbrio. Este equilíbrio é afetado por alguns fatores físicos que podem favorecer a formação do produto de agregação ou do monômero (Esquema 7).



Esquema 7: Fatores que afetam o equilíbrio entre agregado e monômero

A formação de agregado pode alterar de forma complexa o espectro eletrônico, levando ao alargamento das bandas, redução do ϵ além de deslocar o $\lambda_{\max}$. Para agregados lineares, formados por interações dipolares, ocorre um deslocamento do $\lambda_{\max}$ para o vermelho (batocrômico) abaixando o nível de energia das transições proibidas por simetria, devido a um decréscimo de energia entre o estado fundamental e o excitado. Para agregados paralelos, ocorre um distanciamento entre os níveis de energia do estado fundamental e excitado, conduzindo a um deslocamento para o azul (hipsocrômico). A formação de agregado também leva a um decréscimo na fluorescência.^{56,57}

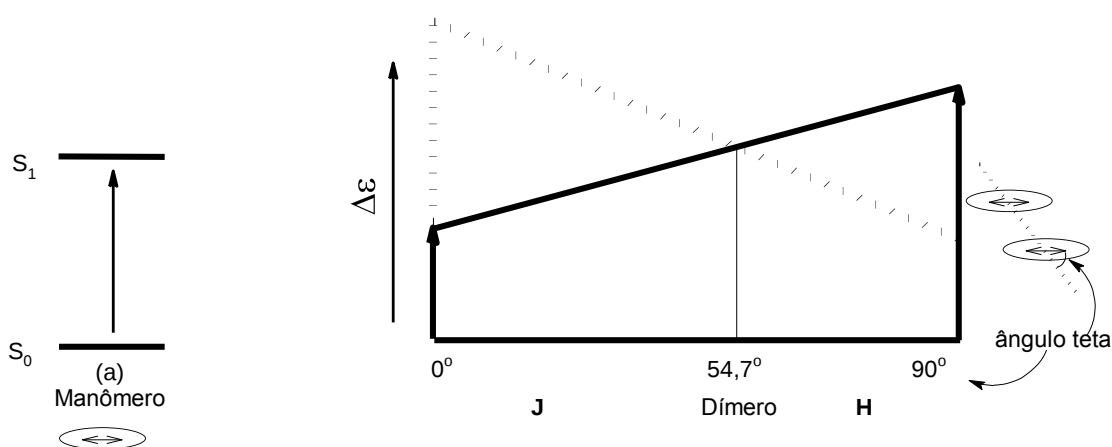
O Esquema 8 apresenta a relação comparativa entre as energias de transição do monômero (a) dímeros lineares (b) e dímeros paralelos (c). Ocorre um decréscimo no ΔE HOMO-LUMO para dímeros lineares (b) e um incremento para dímeros paralelos (c), o que conduz a um deslocamento batocrômico no primeiro e um hipsocrômico no segundo.^{54,55}



Esquema 8: Excitação eletrônica para porfirinas monoméricas (a) e agregadas de forma linear (b) e paralelas (c).

Entre os estados de agregação linear (b) e paralelos (c), representados nos Esquemas 6 e 8, podem existir estados intermediários, como exemplificados no Esquema 6 (d).

O Esquema 9 ilustra situações intermediárias entre os dímeros lineares, conhecidos como tipo J e os dímeros com faces paralelas, conhecidos como tipo H. Para a denominação do tipo de agregação, é tomado como referência o ângulo de $54,7^\circ$, onde não ocorre deslocamento do $\lambda_{\max}$.



Esquema 9: Correlação angular entre o agregado tipo J e H.

Para agregados com $0 < \theta < 54,7^\circ$ são designados agregados tipo J que apresentam um deslocamento batocrômico. Já os agregados com ângulos entre os monômeros $90^\circ > \theta > 54,7^\circ$ são chamados de agregados H e apresentam deslocamento hipsocrocômico.^{55,56}

A agregação é considerada um fator muito importante, visto que é comum entre as moléculas dos Fs em meio fisiológicos. Os agregados de porfirinas tipo H apresentam propriedades físicas e fotofísicas diferentes das propriedades dos monômeros de origem, dentre as quais podem ser destacadas: 1) Solubilidade; 2) Espectro eletrônico 3) Baixo rendimento quântico de fluorescência 4) Diminuição dos rendimentos de formação de tripletes e de geração de oxigênio singleto.

A formação de agregados pode ser detectada por: 1) Desvios da lei de Lambert-Beer; 2) Alargamento dos picos, decréscimo do ϵ e deslocamento do máximo de absorção. Em agregação tipo H, observa-se deslocamento para o azul, e em agregados do tipo J observa-se deslocamento para o vermelho; 3) Através do espectro de ^1H -RMN, por variações no δ em função da concentração e alargamento dos sinais com deformação da multiplicidade^{58,59,60} 4) Espalhamento de luz ressonante.^{61,62}

1.7 - Interações de Fotossensibilizadores com os Tecidos e Células

Um dos fatores importantes em um fotossensibilizador é a solubilidade, visto que as propriedades fotoquímicas e farmacocinéticas dependem desta. Por outro lado, o fotossensibilizador injetado visa atingir um alvo específico, que geralmente se encontra em grande atividade metabólica. É necessário que o composto permeie membranas celulares e possa aderir ao tecido, preferencialmente, o tecido tumoral. Uma estratégia que tem sido avaliada pelo grupo é a utilização de Fs anfifílicos.⁶³ Assim sendo, é importante que os Fs apresentem grupos polares ou iônicos que proporcionem hidrossolubilidade e cadeias carbônicas relativamente extensas para que possam ser lipossolúveis. A inserção de grupos polares no anel porfirínico é de grande importância para o quesito de hidrossolubilidade, para que as forças de interação entre os grupos polares e o dipolo da água superem as forças de interação entre a ampla nuvem π dificultando a auto-agregação.⁵⁴

In vivo, a eficiência de um fotossensibilizador depende de sua interação com componentes do plasma sanguíneo, especialmente albumina e lipoproteínas.^{64,65} É sabido que alguns derivados porfirínicos exibem alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDL)⁶⁶ do sangue, e que tecidos em metástase possuem alta concentração de receptores deste tipo de lipoproteína (em comparação com células normais).⁶⁷ Esta propriedade promove um

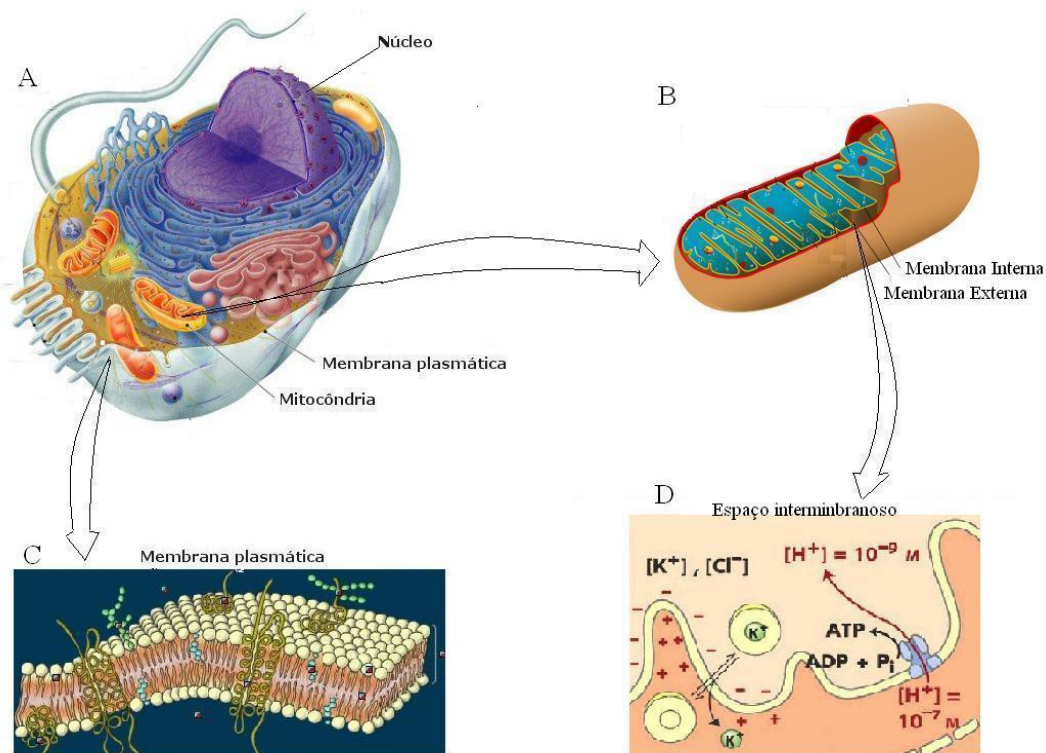
maior acúmulo de Fs porfirínicos em tecidos doentes.⁶⁸ Estes efeitos são conhecidos desde 1948 do trabalho de Figge F. H. J. *et al* 1948.⁶⁹ Os compostos porfirínicos, por sua vez, apresentam certa tendência a se acumular nas membranas e nas células,^{70,71} que é uma condição favorável à utilização destes na TFD.

A incorporação do fotossensibilizador no tecido doente é tão importante quanto a formação de oxigênio singlete, sendo que a incorporação é um fator dependente da interação do fotossensibilizador com sistemas biológicos, principalmente com membranas. Maximizar a interação com membranas é um fato importante no desenvolvimento de novos Fs mais efetivos. A partição em membranas pode ser estimada de várias maneiras, incluindo partição em solventes e em sistemas biomiméticos. A relação hidrofílica/lipofílica pode ser estimada através da partição entre água ou um sistema tamponado com um solvente orgânico lipossolúvel. Entre os solventes utilizados para estimar esta propriedade, 1-octanol é um dos mais adequados, visto que apresenta baixa solubilidade em água com uma boa divisão de fases. Está bem estabelecido que a interação água/1-octanol fornece uma boa informação a respeito da interação água/membrana.^{72,73,74} Estes dados são mais bem visualizados se expressos em relação logarítmica, $\log P_{O/A}$.

Já a incorporação de composto em vesícula de fosfolipídio estima a capacidade real de interação deste composto com membranas celulares, que são compostas de bicamadas lipídicas e por proteínas. Uma das estratégias utilizadas para a incorporação de compostos hidrofóbicos em células é através da incorporação destes em lipossomos, visto que os lipossomos apresentam alta afinidade por membranas celulares que também são constituídas de bicamadas lipídicas.⁷⁵

O $\log P_{O/A}$ e a incorporação em lipossomos são bons indicativos para a interação de um fármaco com sistemas biológicos. No entanto informações mais precisas podem ser obtidas através de estudos da interação dos compostos estudados com células em cultura.

A mitocôndria é uma organela intracelular presente na maioria das células eucarióticas, sendo composta de duas membranas: a externa e a interna, na qual está contida a matriz mitocondrial. A membrana externa possui poros não específicos para o soluto, sendo permeável a íons e moléculas com massa inferior a 10 KDa. Já a membrana interna é bastante seletiva, sendo impermeável a íons. Em mitocôndrias ativas o transporte de elétron é acoplado ao transporte de prótons trans-membrana que cria uma diferença de potencial entre a membrana interna e a matriz mitocondrial. Devido a esta diferença de potencial, a membrana interna da mitocôndria apresenta potencial eletroquímico negativo ($\Delta\Psi = -180\text{mV}$). O Esquema 10 apresenta uma célula humana (A) com ampliação para a membrana plasmática (C), a mitocôndria (B) e uma ampliação do espaço intermembrana onde está situado o $\Delta\Psi$.



Esquema 10: A) Célula humana B) Mitocôndria C) Membrana plasmática D) Espaço Intermembrana Mitocondrial. (figura montada a partir de imagens disponíveis na internet)

Este potencial negativo pode ser utilizado para atrair moléculas de Fs catiônicos para a mitocôndria, direcionando a atividade destes para a atuação nesta organela.⁷⁶ Além do transporte e acumulação, a citolocalização é um fator importante na ação fotodinâmica, podendo ser um fator regulador do tipo de morte celular (necrose ou apoptose).⁷⁶

A citolocalização está governada pelos fatores estruturais de um Fs. Aqueles que são lipofílicos e que apresentam cargas com distribuição assimétrica (anfifílicos), podem permear membranas e, difundir-se a outros compartimentos celulares, apresentando maior taxa de incorporação. Já, se o composto apresenta alta polaridade, fica impossibilitado de permear as membranas e se o composto for muito lipofílico liga-se na membrana citoplasmática. Os Fs com relação hidrofílico/lipofílico suficiente para cruzar membranas e que são catiônicos podem se localizar na mitocôndria, provavelmente, devido à influência do $\Delta\Psi$.⁷⁰ É conhecido que mitocôndrias de células de carcinoma acumulam e retém moléculas catiônicas em maior proporção que células normais^{77,78}. Os corantes positivos (principalmente das classes das fenotiazinas e dos triarilmetanos) permeiam membranas e são atraídos pelo potencial negativo das mitocôndrias, devendo atuar nesta organela.^{23,24}

As propriedades fotoquímicas destes agentes sensibilizadores na presença de sistemas biomiméticos e de proteínas estão bastante estudadas.^{62,79,80,81,82,83,84} Por exemplo, foi determinado que o caminho principal de sensibilização do Azul de Metileno (AM), o qual em solução isotrópica transfere energia para oxigênio formando 1O_2 , pode ser completamente alterado para a transferência de elétrons entre moléculas de AM formando espécies de AM semi-reduzidas e semi-oxidadas.^{61,81} Resultados semelhantes foram recentemente encontrados na presença de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.⁷⁶ Foi demonstrado que a ligação de AM nas mitocôndrias e o seu estado de agregação dependem da concentração relativa do sensibilizador e da mitocôndria, bem como, do potencial de membrana da mitocôndria.⁷⁶

2 – OBJETIVOS

2.1 – Gerais

Neste trabalho buscamos o desenvolvimento de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina, que apresentam cargas iônicas, sejam anfifílicos e que apresentam composição definida, possibilitando estabelecer um estudo comparativo das propriedades fotoquímicas, fotofísicas, ligação em membranas e da atividade de morte de células tumorais em cultura.

2.2 Específicos

- 1- Estudar e desenvolver rotas sintéticas adequadas para obtenção de derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina.
- 2- Sintetizar e purificar diversos derivados.
- 3- Avaliar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e de fototoxicidade.
- 4- Correlacionar estrutura, atividade e citolocalização dos fotossensibilizadores.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais (Solventes e Reagentes)

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza ou previamente purificados.

3.1.1 - Cloreto de Tionila: O cloreto de tionila foi purificado por destilação fracionada a 76° C.

3.1.2 - Cloreto de Oxalila: com pureza de 99,9, fornecido pela Sigma-Aldrich.

3.1.3 - Dimetilformamida (DMF): repousou por 12 horas com KOH, foi filtrada, e destilada a pressão reduzida.

3.1.4 - THF: Foi refluxado com sódio metálico, até que o sódio do refluxo se mantivesse com brilho metálico característico, foi adicionada benzofenona, e a coloração azul indicou a ausência de água. O THF foi destilado, para uso imediato.

3.1.5 - HBr 33% em HAC: foi fornecido pela Acros.

3.1.6 - Aminas: dipropilamina, N,N-dimetiletano-1,2-diamina, N,N-dimetilpropano-1,3-diamina foram refluxadas por 2 horas com KOH, filtradas e destiladas.⁸⁵ Dimetilamina, Ácido fosfônico-2-etilamina, 4-aminobenzotiol e 3-Trietoxisilano-1-propilamina foram fornecidos com pureza analítica da Sigma-Aldrich. A Fosfatidiletanolamina foi fornecida pela Avanti Polar Lipídios.

3.1.7 - Porfirinas: Hematoporfirina IX, Protoporfirina IX e Sal trisódio cuproclorofilina foram fornecidas pela Sigma-Aldrich.

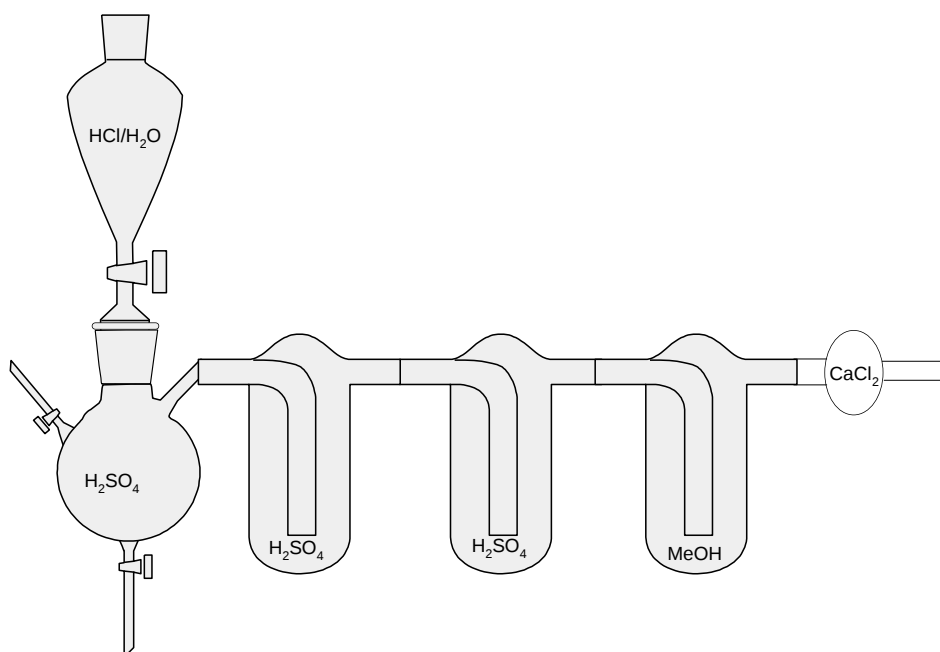
3.1.8 - Solventes Deuterados: D₂O, CDCl₃, DMSO-D₆, Acetona D₆ e Metanol D₄ foram fornecidos pela Acros, com pureza superior a 99,8%.

3.1.9 – Surfactantes: Brometo de cetil trimetil amônio e dodecil sulfato de sódio foram fornecidos pela Acros.

3.1.10 – Cultivo de células: Meio de cultivo celular (DMEM), Tripisina, Tampão fosfato, foram fornecidos pela Cultilab. Garrafas para cultura de células, placas petri e tubos foram fornecidos pela Corning Incorporated.

3.2 – Métodos

3.2.1 - HCl: MeOH: Foi preparado por gotejamento de HCl aquoso em ácido sulfúrico concentrado, formando HCl gasoso que foi borbulhado por duas vezes em ácido sulfúrico concentrado e coletado em um recipiente com metanol seco. O Esquema 11 ilustra o aparato de produção de HCl em metanol.



Esquema 11: Aparato de obtenção de HCl:MeOH

3.2.2 - Purificação dos produtos

A purificação dos produtos foi realizada utilizando as técnicas de separação por cromatografia radial, em coluna ou em placa preparativa. A fase estacionária utilizada foi gel de sílica GF₂₅₄ com gesso, quando utilizadas as técnicas de cromatografia radial ou placas preparativas. Na separação por coluna, a fase estacionária foi alumina básica. Na eluição, foi utilizado acetona na cromatografia radial. Quando utilizadas as técnicas de placa preparativa ou coluna, a fase móvel foi uma combinação de diclorometano e de metanol.

3.2.3 - Derivatização de hematoporfirina IX (Rota I)

Foram adicionados 330 µL de cloreto de tionila e 20 µL de DMF a 300mg de hematoporfirina IX, em um balão de 3 bocas, sob atmosfera de argônio à 0°C. O sistema foi mantido sob agitação mecânica por uma hora e a fase líquida foi eliminada por sucção a pressão reduzida. Por duas vezes consecutivas, foram adicionados e succionados 2ml de tolueno (para eliminar possíveis resíduos de cloreto de tionila). Em seguida, o sólido foi resfriado a 0°C em atmosfera inerte de argônio e adicionado $\cong 10$ equivalentes de amina (1 mL) dissolvida em 5mL de THF recém destilado, através de um funil de adição. O precipitado foi mantido sob agitação por 12 horas, posteriormente concentrado por destilação rotacional a pressão reduzida e, em seguida, purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se cromatografia radial com disco de gel de sílica GF₂₅₄ com gesso de 2 mm de diâmetro e acetona como fase móvel.

3.2.4 - Caracterização Estrutural

Para a caracterização estrutural dos produtos foram tomados como referência os reagentes (Hp IX e Protoporfirina IX dimetil éster). Foi realizada uma caracterização prévia para que estes pudessem fornecer parâmetros fidedignos na determinação dos novos compostos.

3.2.4.1- Hematoporfirina IX

IV: Banda larga de estiramento referente aos grupos OH das oposições 3¹ e 8¹ sobrepostos aos OH de ácido carboxílico nas posições 13³ e 17³ em 3700 a 3100 cm⁻¹; deformação axial C=O em 1711 cm⁻¹; deformação angular no plano C-O-H em 1376 cm⁻¹. (Apêndice 1)

RMN de ¹H (500 MHz Acetona D₆): δ_H 10,68; 10,61; 10,10 e 10,00 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20), 6,58 (t, ³J=5.6 2H, CH; 3¹ e 8¹) 4,31 e 4,23 (2t, ³J=7,5, 4H; CH₂;13¹ e 17¹) 3,68; 3,66; 3,57 e 3,47 (4s,12H, CH₃: 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) 3,25 e 3,21 (2t, ³J=7.5, 4H, CH₂; 13² e 17²) 2,20-2,18 (m, 6H, CH₃; 3² e 8²) -4,04 (s, 2H, H-pirrol) (Apêndice 2).

RMN de ¹³C (500 MHz Acetona D₆): 174,93 (COOH); 99,95; 99,99 e 97,35 (CH; 5, 10, 15 e 20), 66,41 (CH; 3¹ e 8¹) 37,67 e 37,60 (CH₂; 13² e 17²) 27,78 e 27,74 (2C, CH₃; 3² e 8²) 22,63 e 22,50 (CH₂; 13¹ e 17¹) 12,21; 12,06 e 11,83 (CH₃; 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) (Apêndice 3).

3.2.4.2 - Dimetil-8,13-bis(dietilamia)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida) (HAA)

IV: Banda de deformação axial C=O 1731 cm⁻¹. (Apêndice 4)

RMN de ^1H (500 MHz Acetona D_6): δ_{H} 10,66; 10,61; 10,59 e 10,58 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20), 6,11 e 6,10 (2t, $^3J=6.75$ 2H, CH; 3^1 e 8^1) 4,34 (2t sobrepostos em forma de q, $^3J=7.5$, 4H; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,94 (q, $^3J=$, 8H, NCH_2) 3,66 (q, $^3J=$, 8H, OCNCH_2) 3,6 (4s, 12H, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,18 (2t, $^3J=7.5$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 2,07 (d, 6H, $^3J=6.75$ CH_3 ; 3^2 e 8^2) 1,22 (m, 12H, OCNCCH_3) 0,98 (m, 12H, NCCH_3) -3,80 (s, 2H, H-pirrol) (RMN de ^1H , Apêndice 5; COSY, Apêndice 6)

RMN de ^{13}C (500 MHz Acetona D_6): 173,31 (OCN); 99,95; 99,99 e 97,35 (CH; 5, 10, 15 e 20), 73,77 (CH; 3^1 e 8^1) 65,11 (OCNCH_2) 60,73 (NC) 37,62 (CH_2 ; 13^2 e 17^2) 25,76 (2C, CH_3 ; 3^2 e 8^2) 22,24 (2C, CH_2 ; 13^1 e 17^1) 16,04 (4C, OCNCCH_3) 14,41 (4C, NCCH_3) 11,70; 11,63; 11,54 e 11,49 (CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1). (RMN de ^{13}C , Apêndice 7; HETCOR, Apêndice 8, dpet, Apêndice 8)

3.2.5 - Derivatização de Protoporfirina IX (Rota II)

3.2.5.1 - Funcionalização protoporfirinas IX em 3^1 e 8^1 por Bromação dos grupos vinílicos.

Foram dissolvidos 300 mg de Protoporfirina IX em 50mL de HBr 33% em HAC (Acros). A mistura reacional foi mantida com agitação, sob temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio por 24 horas. O ácido excedente foi eliminado por sucção a pressão reduzida. Por motivos de segurança, a sucção foi realizada utilizando-se dois *traps* extras com pastilhas de hidróxido de sódio. Esta medida foi tomada com o intuito de impedir a liberação de vapores de HBr para a bomba de vácuo e para a atmosfera. Após 3 horas de sucção, os ácidos foram eliminados, obtendo-se um precipitado púrpuro.

3.2.5.2 - Substituição dos compostos bromados por amina

Adicionou-se a amina (dimetilamina $2,0\text{mol.L}^{-1}$ em THF (10mL) ou dipropilamina (5 mL) aos resíduos dibromados. A mistura reacional de coloração púrpura escura foi agitada por cinco dias a 50°C sob proteção da luz e atmosfera inerte de argônio. A mesma foi monitorada por TLC. Decorrido o período estabelecido, o excesso de amina foi eliminado por sucção a pressão reduzida, resultando em um precipitado de coloração roxa.^{44,86}

3.2.5.3 - Esterificação dos compostos.

Os produtos resultantes da substituição por amina foram dissolvidos em solução de 5% H_2SO_4 em metanol e mantidos por um período de 20 horas com agitação mecânica em atmosfera de argônio e proteção da luz para esterificação dos grupos carboxílicos. A esterificação foi confirmada por TLC. O H_2SO_4 foi neutralizado com bicarbonato de potássio, filtrado, e o metanol foi eliminado por destilação rotacional a pressão reduzida. O precipitado foi dissolvido em diclorometano e lavado com água para eliminação dos resíduos mais polares. Todo o pigmento permaneceu na fase orgânica, sendo esta concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida. O concentrado 5 mL foi separado em uma coluna cromatográfica com alumina básica 40 cm de altura por 2 cm de diâmetro, utilizando um gradiente de dediclorometano-Metanol de 100:1 a 4:1. Os produtos foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HETCOR.

3.2.5.4 - Caracterização estrutural (Rota II).

3.2.5.4.1-Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster (Pmet).

RMN de ^1H (300 MHz CDCl_3): δ_{H} 9,9-9,8 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20), 8,22-8,16 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 6,35-6,12 (2d, 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) 4,33 (2t, $^3J=7.5$, 4H; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,68 (2s, 6H, 2 CH_3 Éster) 3,58; 3,56; 3,54; 3,52 (4s, 12H, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,24 (t, $^3J=7.5$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) -3,72 (s, 2H, H-pirrol) (RMN de ^1H , Apêndice 10; COSY, Apêndice 11)

RMN de ^{13}C (300 MHz CDCl_3): 173,53 (COOMet) 130,16 (CH, 3^1 e 8^1) 120,61 (CH_2 , 3^2 e 8^2) 97,76; 97,19; 96,68 e 95,89 (CH; 5, 10, 15 e 20) 51,7 (2C, CH_3 Éster) 36,8 (2C, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 21,72 (2C, CH_2 ; 13^1 e 17^1) 12,57 e 11,58 (4C, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1). (RMN de ^{13}C , Apêndice 12; HETCOR, Apêndice 13)

3.2.5.4.2 - Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster (PpmA).

RMN de ^1H (300 MHz CDCl_3): δ_{H} 10,09-9,76 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20) 6,01-5,99 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 4,22 (2t, $^3J=7.5$, 4H; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,68 (2s, 6H, 2 CH_3 Éster) 3,6-3,4 (m, 12H, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,22 (t, $^3J=7.5$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 2,2 (2d, 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) -3,72 (s, 2H, H-pirrol) (RMN de ^1H , Apêndice 14; COSY, Apêndice 15)

RMN de ^{13}C (300 MHz CDCl_3): 173,42 (COOMet) 66 e 65 (CH, 3^1 e 8^1) 97-95 (CH; 5, 10, 15 e 20) 51,7 (2C, CH_3 Éster) 36,5 (2C, CH_3 ; 13^2 e 17^2) 29,6-29,2 (4C, CH_3 , NCH_3) 21,6 (CH_2 , 3^2 e 8^2) 21,61 (2C, CH_2 ; 13^1 e 17^1) 11,6-11,3 (4C, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1). (RMN de ^{13}C , Apêndice 16)

3.2.5.4.3 - Dimetil-8,13-Bis(1-dipropilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropionato dimetil éster (Pppa).

RMN de ^1H (300 MHz CDCl_3): δ_{H} 10,09-9,62 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20) 5,89 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 4,36 (2t, $^3J=7.5$, 4H; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,68 (2s, 6H, 2 CH_3 Éster) 3,5-3,6 (m, 12H, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,28 (t, $^3J=7.5$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 1,90 (2d, 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) 2,95 (m, 8H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 1,77-1,74 (m, 8H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 0,88 (m, 12H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) -3,73-4,34 (m, 2H, H-pirrol) (RMN de ^1H , Apêndice 17; COSY, Apêndice 18)

RMN de ^{13}C (300 MHz CDCl_3): 173,77 (COOMet) 148-129 (C, quaternários do anel) 97-95 (CH; 5, 10, 15 e 20) 65,71 (CH, 3^1 e 8^1) 54,12 e 53,60 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 51,92 (2C, CH_3 Éster) 36,99 (2C, CH_3 ; 13^2 e 17^2) 26,29 (CH_2 , 3^2 e 8^2) 20,58; 20,50; 20,32 e 20,30 (4C, CH_2 , $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 21,85 e 21,77 (2C, CH_2 ; 13^1 e 17^1) 12,23 e 12,21 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) 11,93; 11,69; 11,60 e 11,41 (4C, CH_3 ; 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1). (RMN de ^{13}C , Apêndices 19 e 20; HETCOR, Apêndice 21)

3.2.6 - Derivados Amida de Protoporfirina IX (Rota III)

3.2.6.1 - Funcionalização dos grupos carboxilatos em 13^3 e 17^3

Foram adicionados 2 mL de cloreto de oxalila a 300mg de protoporfirina IX em um balão de 3 bocas, sob atmosfera de argônio a 0°C dissolvido em 5 mL de diclorometano previamente seco. O sistema foi refluxado por 30 minutos e o solvente foi eliminado juntamente com o excesso de cloreto de oxalila por sucção a pressão reduzida. Em seguida, o sólido foi resfriado a 0°C e foi adicionada a amina desejada (2-dimetilamina-1-etilamina, 3-dimetilamino-1-propilamina, Ácido fosfônico-2-etilamina, 3-Trietoxisilano-1-propilamina, 4-

aminobenzotiol e Fosfatidiletanolamina), previamente purificada. Estes reagentes foram adicionados através de um funil de adição. Os reagentes sólidos foram dissolvidos em reagentes inertes. A Fosfatidiletanolamina foi dissolvida em clorofórmio. O 4-aminobenzotiol e o Ácido fosfônico-2-etilamina foram dissolvidos em DMSO seco. O sistema foi mantido sob agitação por 2 horas e a fase líquida eliminada por sucção a pressão reduzida.

3.2.6.2 - Metilação das aminas terciárias.

Foram dissolvidos 100mg dos compostos porfirínicos, resultantes da substituição do dicloreto de ácido por 2-dimetilamina-1-etilamina, 3-dimetilamino-1-propilamina, (PpNetNA e PpNpNA), que apresentam como funcionalidades aminas terciárias, em 10 mL de diclorometano e foi adicionado, sob agitação, 1,0 mL de iodeto de metila (excesso). O meio reacional foi mantido com agitação magnética por cerca de 10h. Quando interrompida, a agitação foi observada a formação de estruturas cristalinas nas paredes e no fundo do balão.⁸⁷

3.2.6.3 – Purificação e caracterização estrutural

3.2.6.3.1 – Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida] (PpNetNA)

Purificação: A purificação foi efetuada por partição CH_2Cl_2 /Tampão fosfato $\text{pH}=9$. A fase orgânica foi concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica, utilizado alumina básica como fase estacionária e eluída com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1.

IV: C=O 1638, Deformação axial.

Massa: 703,5 pico base para $M + H^+$; 660 pico secundário para $M - N(CH_3)_2$ (Apêndice 22)

RMN de 1H (300 MHz $CDCl_3$): δ_H 9,90-9,75 (4s, 4H, mesos), 8,2-8,0 (m, CH; 3^1 e 8^1) 6,35-6,26 e 6,17-6,11 (m, 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) 4,30-4,29 (2t, $^3J=7,5; 4H$; $CH_2; 13^1$ e 17^1) 3,57; 3,56; 3,51; 3,50 (4s, 12H, CH_3 : 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,33 e 3,32 (2t, $^3J=7,5$; 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 3,04 e 3,06 (2t, $^3J=6,0$; 4H, $OCN\text{CH}_2$) 2,21(12H, 2[-N(CH₃)₂]) 1,81 e 1,80 (2t, $^3J=6,0$; 4H, - $\text{CH}_2\text{N(CH}_3)_2$ -3.72 (s, 2H, H-pirrol). (RMN de 1H , Apêndice 23; COSY, Apêndice 24)

3.2.6.3.2 – Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2-(propanoilamino)etanoamônio] (PpNetNI)

Purificação: foi dissolvido em metanol e purificados por recristalização com diclometano.

IV: C=O 1651, Deformação axial.

Massa: 703,5 pico base para $M + H^+$; 660 pico secundário para $M - N(CH_3)_2$ (Apêndice 25)

RMN de 1H (500 MHz DMSO D_6): δ_H 10,32; 10,26 e 10,23 (4s, 4H, mesos), 8,50 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 6,47 e 6,21 (4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) 4,37 (4H; $CH_2; 13^1$ e 17^1) 3,57; 3,56; 3,51; 3,50 (4s, 12H, CH_3 : 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,37 (18H; 2[-N⁺(CH₃)₃]) 3,34-3,11(4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) -3.72 (s, 2H, H-pirrol). (RMN de 1H , Apêndice 26; COSY, Apêndice 27)

RMN de ^{13}C (500 MHz DMSO): 172,31 (CON) 130,02 (2CH, 3^1 e 8^1) 121,29 (2CH₂, 3^2 e 8^2) 63,61 e 63,59 (2C, $OCNCH_2\text{CH}_2N^+(CH_3)_3$) 52,58; 52,55; 52,52; 52,05; 52,03 e 52,01(6C; 2[-N⁺(CH₃)₃]) 32,85 e 31,63 (2C, $OCN\text{CH}_2\text{CH}_2N(CH_3)_3$) 31,61 e 30,71 (2C, CH_3 ; 13^2 e 17^2) 21,87 e 21,85 (2C, CH_2 ; 13^1 e 17^1) 12,72; 12,71 e 11,4 (4C, CH_3 : 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) (RMN de ^{13}C , Apêndice 28, HETCOR, Apêndices 29 e 30)

3.2.6.3.3 – Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina)propil]butanamida] (PpNpNA)

Purificação: idem a PpNetNA

IV: Deformação axial.C=O 1635.

Massa: pico base em 674,41 referente à $M - N(CH_3)_3$ e $M + 1H$ em 731,47 (Apêndice 31)

RMN de 1H (300 MHz $CDCl_3$): δ_H 10,06; 10,00; 9,96 e 9,90(4s, 4H, mesos), 8,28-8,12 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 6,36(dd_{trans} $J=1,5$; $J=18$; 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) e 6,19 (dd_{cis} $J=1,00$; $J=11,4$; 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2), 4,34 (2t, $J=5,4,4H$; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,66; 3,65; 3,58 e 3,57 (4s, 12H, CH_3 : 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,38 (2t, $^3J=5,4$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 2,88 (2t, $J=6,6$; 4H; $OCN\text{CH}_2$) 2,42 (2t, $J=6,3$; 4H; $OCNCC\text{CH}_2N(CH_3)_2$) 2,23 (s, 12H, $2[-N(CH_3)_2]$) 1,70 (m, $J=6,3$; 4H; $OCNCC\text{CH}_2CN(CH_3)_2$) -4,54 (s, 2H, H-pirrol). (RMN de 1H , Apêndice 32; COSY, Apêndice 33)

3.2.6.3.4 – Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio] (PpNpNI)

Purificação: Idem a PpNetNI

IV: C=O 1637, Deformação axial.

Massa: O pico base foi registrado em 380,24 m/z, pico em 887,95 m/z para $M^+ - I^-$; outro em 660,40 m/z, para $M - I^- - (N,N,N\text{-trimetilpropil-1-amônio})$ (Apêndice 34)

RMN de 1H (500 MHz $DMSO\ D_6$): δ_H 10,19; 10,17 e 10,13 (4s, 4H, mesos), 8,11 (2H, CH; 3^1 e 8^1) 6,30(d_{trans} $J=17,7$; 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2) e 6,22 (d_{cis} $J=11,4$; 4H, CH_2 , 3^2 e 8^2), 4,35 (2t, $J=6,0$; 4H; CH_2 ; 13^1 e 17^1) 3,70; 3,68; 3,61 e 3,60 (4s, 12H, CH_3 : 2^1 , 7^1 , 12^1 e 18^1) 3,45 e 3,43 (2t, $^3J=6,0$, 4H, CH_2 ; 13^2 e 17^2) 3,34 (s, 18H, $2[-N^+(CH_3)_3]$) 2,93 (m; 4H; $OCN\text{CH}_2$) 2,62 (m;

4H;OCNCH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) 1,26 (m, 4H;OCNCH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) -4,2 (s, 2H, H-pirrol). (RMN de ¹H, Apêndice 35; COSY, Apêndice 36)

RMN de ¹³C (500 MHz DMSO D₆): 175,51 (CON) 131,40 (CH, 3¹ e 8¹) 121,23 (CH₂, 3² e 8²) 97,57; 97,54; 96,92 e 96,89 (CH; 5, 10, 15 e 20) 64,31 (2C;OCNCH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) 54,22; 54,20; 54,17; 53,91; 53,88 e 53,85 (6C, 2[-N⁺(CH₃)₃]) 40,59 (2C;OCNCH₂CH₂CN⁺(CH₃)₃) 39,71 (m; 4H; OCNCH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) 36,71 (2C, CH₂; 13² e 17²) 23,29 e 23,24; (2C, CH₂; 13¹ e 17¹) 13,07 e 11,9 (4C, CH₃: 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) (RMN de ¹³C, Apêndice 37 e 38; HETCOR, Apêndices 39)

3.2.6.3.5 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2- (propanoilamino)etil]fosfônico ácido] (PpNetPO₃)

Purificação: foi purificado por partição CH₂Cl₂/tampão acetato pH=3. A fase orgânica foi concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida e os resíduos foram purificados por recristalização.

IV: C=O 1626 cm⁻¹, Deformação axial

RMN de ¹H:) : δ_H 10,2-10,0(m, 4H, mesos), 8,4-8,3 (2H, CH; 3¹ e 8¹) 6,82 e 6,63 (4H, CH₂, 3² e 8²) 4,34 (m,4H; CH₂;13¹ e 17¹) 3.66-3,57 (4s, 12H, CH₃: 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) 3,01 (4H;OCNCH₂CH₂PO₃) 3,2-3,1 (m, 4H, CH₂; 13² e 17²) 1,70 (4H;OCNCH₂CH₂PO₃) (RMN de ¹H, Apêndice 40; COSY, Apêndice 41)

3.2.6.3.6 - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N(-3-(Trietoxissilano)propil]butanamida] (PpNpSi(Oet)₃)

Purificação: Devido às dificuldades de purificação do composto, visto que este polimeriza com a umidade, o excesso de 3-Trietoxissilano-1-propilamina foi eliminado por sucção a pressão reduzida e os resíduos foram utilizados para a determinação estrutural.

IV: C=O 1632, Deformação axial

RMN de ¹H (500 MHz CDCl₃): δ_H 9,44; 9,25; 9,00 e 8,76 (4s, 4H, CH; 5, 10, 15 e 20), 7,71 e 7,59 (2m, 2H, CH; 3¹ e 8¹) 5,96-5,86 e 5,73-5,60 (2m, 4H, CH₂, 3² e 8²) 3,67-3,66 (m, 12H, SiOCH₂CH₃) 3,49 (4s, 12H, CH₃: 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) 4,17-4,12 (4H; CH₂; 13¹ e 17¹) 2,76 (NCH₂CH₂CH₂SI) 1,65 (NCH₂CH₂CH₂SI) 1,06 (m, 18H, SiOCH₂CH₃) 3,36-3,31 (4H, CH₂; 13² e 17²) 0,56 (NCH₂CH₂CH₂SI) -5,53 (s, 2H, H-pirrol) (RMN de ¹H, Apêndice 42; COSY, Apêndices 43 e 44)

RMN de ¹³C (500 MHz CDCl₃): 173,02 (CON); 130,17 e 129,97 (CH, 3¹ e 8¹) 120,40 e 120,05 (CH₂, 3² e 8²) 96,71; 96,54; 96,34 e 96,30 (CH; 5, 10, 15 e 20) 58,39 (6C, SiOCH₂CH₃) 43,91 e 42,93 (NCH₂CH₂CH₂SI) 35,30 e 35,13 (CH₂; 13² e 17²) 25,18 e 25,14 (NCH₂CH₂CH₂SI) 22,46 e 22,05 (2C, CH₂; 13¹ e 17¹) 18,26 (6C, SiOCH₂CH₃) 12,32; 12,16; 11,09 e 9,49 (CH₃: 2¹, 7¹, 12¹ e 18¹) 8,65 e 7,55 (NCH₂CH₂CH₂SI) (RMN de ¹³C, Apêndices 45 e 46; HETCOR, Apêndice 47)

3.2.6.3.7 – Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis-(dipropil-L- alfa-fosfatidiletanolamina) (Pp-PE)

Purificação: O excesso de solvente foi eliminado por sucção a pressão reduzida e a Lip-protoporfirina IX foi purificada em coluna cromatográfica, utilizando gel de sílica 230/70 como fase estacionária. Em seguida, a mesma foi eluída com CH₂Cl₂/MeOH 20:1 em uma coluna com 2 cm de diâmetro por 30 cm de altura.

IV: C=O 1729, Deformação axial (Apêndice 48)

Massa: pico base em 569,3 para ruptura (N/CO) de uma das amida e ruptura β a segunda amida (PpNCH₂CH₂/OPO₃R); e pico em par 1115,7 (C₅₅H₇₉N₆O₁₀P) resultante de Pp-lip - (PO₃R₁) - (OCR). (Apêndice 49)

3.2.7 - Derivatização de Cu²⁺-clorofilina

3.2.7.1 - Desmetalação de Cu²⁺-clorofilina

Para a eliminação do Cu²⁺, 500mg de cupro clorofilina foram refluxados por 4 horas com HCl saturado em metanol, sendo posteriormente particionado em HCl(aq)/Diclorometano por três vezes consecutivas. A fase orgânica foi concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida e os resíduos foram purificados por cromatografia em coluna, com gel de sílica 230/70 como fase estacionária e eluídos com CH₂Cl₂/MeOH 50:1 em uma coluna com 5 cm de diâmetro por 25 cm de altura. A determinação do fator de eliminação foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O instrumento foi calibrado pelo método de adição de analito.

3.2.7.2 – Hidrólise de trimetil éster-Clorofilina

No processo de hidrólise, o composto tri esterificado foi dissolvido em 2 mL de clorofórmio/etanol 1:1 e adicionado a 20 mL de HCl(aq). Decorridas 12 horas, a fase líquida foi eliminada por destilação rotacional a 70°C e pressão reduzida, e o sólido foi convertido em cloreto de ácido por cloreto de oxalila.

3.2.7.3 – Obtenção de derivados amidas de clorofilina

Para a obtenção de derivados através da formação de amidas nas carboxilas da clorofilina (tricarboxilada) foi adotado um processo análogo àquele já descrito pra a rota 3 da protoporfirina IX. As carboxilas foram transformadas em cloreto de ácido com cloreto de oxalila, e o cloro foi substituído por 3-Dimetilamino-1-propilamina para obtenção de ChlnpnA, que em seguida foi metilada com CH₃I para formação do quaternário ChlnpnI.

3.2.7.4 - Purificação e caracterização estrutural.

Purificação: A purificação também foi efetuada de forma análoga aos derivados de Protoporfirina IX. Após a formação das funcionalidades amidas, foi efetuada uma partição em tampão fosfato (pH = 9)/diclorometano para uma purificação prévia. A fase orgânica foi concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida, e o sólido foi purificado em coluna cromatográfica com alumina básica com fase estacionária e diclorometano/metanol 20:1 como eluente.

Caracterização: A caracterização foi realizada por espectroscopia eletrônica (UV-vis); vibracional no infravermelho FTIR; espectrométrica de massas usando a técnica de elétron-

spray, e RMN 500MHz - utilizadas as técnicas unidimensional(^1H e ^{13}C) e bidimensional (COSY e HETCOR).

Para a RMN, os espectros foram inspecionados pelo *software* Mestre-C (versão 5.0).

ChlNpNA

IV: C=O, 1661 cm^{-1} (Apêndice 51)

Massa: Pico base 648,7, para ($\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{O}_3$) (Apêndice 52)

RMN de ^1H (500 MHz CDCl_3): δ_{H} 10,09 (s,1H, CH; 10) 9.67 (s,1H, CH; 20) 8.77 (s, H, CH; 5) 7.99 (m, 1H, 3^1) 6.46-6.36 (m,2H, 3^2) 4,09 (2H, CH_2 , 15^1) 4,07 (2H, CH_2 , 17^1) 3,58(2H, CH_2 , 17^2) 3.37-3.27 (3s, 12H, CH_3 , $2^1, 7^1$ e 12^1) 2,99-2,86 (m, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 2,40($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 2.131 e 2.132 (6s, 6 CH_3 , $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) 1,64; 1,63 e 1,62($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 1,56 (t, 3H, CH_3 , 8^2) -2.3(s, 2H, H-pirrol) (RMN de ^1H , Apêndices 54-57; COSY, Apêndice 58)

RMN de ^{13}C (500 MHz CDCl_3): 191,65; 185.04 e 173.35 (OCN) 58,45; 58,32 e 58,13($\text{CNCCCCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) 45,45; 45,32; 45,23; 45,21 e 44,98 (6C, 6 CH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) 31,08 (3C, $\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) 38,01(1C, $\text{CH}_2, 15^1$) 32,1(1C, CH_2 , 17^2) 29,89 ($\text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$) 25,96(C, CH_2 , 8^1) 22,87 (1C, CH_2 , 17^1) 19,94; 14,46; 14,29; 12,20 (4C, CH_3 , 2^1 , 8^2 , 12^1 e 18^1) (RMN de ^{13}C , Apêndice 59; HETCOR, Apêndices 60)

ChlNpNI

IV C=O 1657 cm^{-1} (Apêndice 61)

Massa: 1021 m/z para M- (3I^-) + 2H (Apêndice 62)

RMN de ^1H (500 MHz $\text{DMSO } \text{D}_6$):

δ_H 9.35 (s, 1H, CH; 10) 9.02 (s, 1H, CH; 5) 8.48, 1H, CH; 20) 8,14-8,08(m, 1H, CH; 3¹) 6,12-6,08(m, 2H, 3²) 4,21 (2H, CH₂, 15¹) 4,02 (2H, CH₂, 17¹) 3,43(2H, CH₂, 8¹) 3,31(2H, CH₂, 17²) 3.39 (9s, 9CH₃, N⁺(CH₃)₃) 3,14; 3,12 e 3,10 (4s, 12H, CH₃, 2¹, 7¹ e 12¹) 3,09-3,07 (m, OCNCH₂) 2,90-2,77 (OCNCH₂CH₂CH₂N) 2,06-1,78 (OCNCH₂CH₂CH₂N) 1,83 (t, 3H, CH₃, 8²) -2.38(s, 2H, H-pirrol) (RMN de ¹H, Apêndice 63; COSY, Apêndice 64)

RMN de ¹³C (500 MHz DMSO D₆): 172,49 e 161,48(OCN) 63,55; 63,41 e 62,41(CNCCCCH₂N(CH₃)₂) 52,49; 52,46; 52,44; 52,35; 52,32 e 52,30 (9C, 9CH₃, N⁺(CH₃)₃) 36,25; 35,50 e 34,20 (3C, OCNCH₂CH₂CH₂N) 35,25(1C, CH₂, 15¹) 35,50(1C, CH₂, 17²) 22,97; 22,11 e 19,36 (OCNCH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃) 22,87(1C, CH₂, 17¹) 19,94(C, CH₂, 8¹) 17,27; 14,18; 13,98 e 13,91 (4C, CH₃, 2¹, 8², 12¹ e 18¹) (RMN de ¹³C, Apêndice 65 e 66; HETCOR, Apêndices 67)

3.2.8 - Determinações dos coeficientes de extinção molar (ϵ)

Os coeficientes de extinção molar (ϵ) foram determinados em solução metanólica. Esta determinação foi obtida a partir de uma quantidade de massa conhecida de cada composto, a qual foi realizada em balança analítica de 4 casas decimais. A massa estabelecida foi solubilizada em um volume preciso de solução (5 mL, em balão volumétrico). Desta solução, foram retiradas alíquotas de volumes conhecidos transferindo-as para balões volumétricos de 5 mL. Os balões foram completados com metanol de modo que fossem obtidas soluções de concentrações conhecidas com exatidão analítica. O espectro UV-vis para estes compostos foi determinado em cubeta de quartzo. Neste espectro, as bandas de interesse apresentam absorvância entre 0,04 e 1. A partir dos dados obtidos, foram estabelecidas as curvas

concentração x absorvância, no λ_{max} de cada banda e determinado o ϵ através da lei de Lambert-Beer (Eq. 1)

$$A = \epsilon bc \quad (\text{Eq.1})$$

Onde A é a absorção, ϵ é o coeficiente de absorção molar, b é o caminho óptico (cm) ($\text{Mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), e c é a concentração molar ($\text{Mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Os dados obtidos foram analisados utilizando Microcal *Origin 7.0*.

3.2.9 – Rendimento quântico de Emissão de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência foi calculado em comparação com o azul de metileno como padrão ($\phi_{\text{fp}} = 0,04$)⁸⁸, com absorvância das amostras ajustadas para 0,02 ou corrigidas pela absorvância no comprimento de onda de excitação (532nm). A emissão foi registrada desde 555 a 900nm e o rendimento foi determinado utilizando a equação que se segue:

$$\frac{A_a}{A_p} = \frac{\phi_a}{\phi_p} \quad \phi_{\text{fa}} = \left(\frac{A_a}{A_p} \right) \left(\frac{\text{Abs}_{532p}}{\text{Abs}_{532a}} \right) \phi_{\text{fp}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A_a – Área sob a curva do espectro de emissão da amostra

A_p – Área sob a curva do espectro de emissão do padrão

ϕ_{fa} – Rendimento quântico de fluorescência da amostra

ϕ_{fp} – Rendimento quântico de fluorescência do padrão

Abs_a – Absorvância da amostra a 532 nm

Abs_p – Absorvância do padrão 532 nm

3.2.10 - Fotólise de relâmpago a *laser*

As porfirinas foram dissolvidas em metanol. Sua absorbância foi determinada em uma cubeta de quartzo. Os transientes foram determinados em um equipamento da Applied Photophysics, constituído por um fluorímetro de absorção/emissão com resolução temporal (O equipamento esta ilustrado no Esquema 12). Os transientes obtidos foram analisados utilizando Microsoft *Origin 7.0*. O tempo de vida do triplete foi determinado através do decaimento exponencial de primeira ordem.

$$I = I_0 + A_1 e^{-\frac{x}{t}} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde I é a intensidade de emissão a 1270 nm, A_1 é um fator pré-exponencial do componente temporal do decaimento exponencial.

3.2.11 – Determinação da Eficiência de Emissão de Oxigênio Singlete

A quantificação de oxigênio singlete foi realizada a partir das intensidades de emissão a 1270 nm, obtidas alguns nanossegundos após o pulso do laser. A hematoporfina IX foi tomada como referência ($\phi_{\Delta=0,74}$)^{89,90}, sendo que os transientes de emissão de oxigênio singlete foram obtidos nas mesmas condições (solvente e absorção a 532 nm) para o padrão e para os compostos novos.

As porfirinas foram dissolvidas em metanol e a absorbância foi determinada por espectroscopia UV-vis, em uma cubeta de quartzo com um centímetro de caminho óptico. A amostra foi excitada com pulso de *laser* em 532 nm. O rendimento quântico foi determinado através de seguinte equação:

$$\frac{I_a}{I_p} = \frac{\phi_a}{\phi_p} \quad \phi_a = \phi_p \frac{A_p}{A_a} \frac{I_a}{I_p} \quad (\text{Eq.4})$$

$$\phi \Delta_a = (I_a \times A_p / I_p \times A_a) \times \phi \Delta_p$$

$\phi \Delta_a$ – Eficiência de formação de oxigênio singlete da amostra

$\phi \Delta_p$ – Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete do padrão

I_a - Intensidade de emissão de oxigênio singlete da amostra

I_p - Intensidade de emissão de oxigênio singlete do padrão

A_a – Absorbância da amostra a 532 nm

A_p – Absorbância do padrão a 532 nm

3.2.12 - Determinação do estado de agregação

Para a determinação do estado de agregação foi preparada uma solução aquosa estoque de cada porfirina, e desta solução retirou-se três alíquotas de 200 μL , transferindo-as para balões volumétricos de 5 mL. Cada balão foi completado, respectivamente, com água deionizada e solução dos surfactantes brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e dodecil sulfato de Sódio (SDS) $10^{-2} \text{ Mol.L}^{-1}$. Foram obtidos os espectros UV-vis (com absorbância da banda *soret* 0,1 e 1,0), o espectro de fluorescência e o espalhamento de luz ressonante. Para cada composto, foram comparados os deslocamentos e a intensidade das bandas, tanto dos espectros UV-vis como dos espectros de fluorescência e de ELR.

3.2.13 - Partição 1-octanol/água

Foram misturados volumes iguais de 1-octanol e tampão 10^{-2} mol.L⁻¹, nos pHs de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 14, agitados vigorosamente por 20 minutos e separados, para que ambas as fases apresentassem saturação mútua. Foram preparados, para cada porfirina, 5 mL de uma solução com absorbância $\cong 1$ na banda *soret* (400 nm) na fase de melhor solubilidade, tampão ou n-octanol. Foram retirados 5 mL da fase mais solúvel e dissolvida uma quantidade suficiente de porfirina para que atingisse a absorbância de 1 na banda *soret*. Em seguida, foram adicionados 5 mL da outra fase 1-octanol ou solução tampão. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa por 2 horas. Decorrido este período, esta foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e foi determinada a absorção de ambas as fases na banda *soret*. Foi obtido o logaritmo da partição 1-octanol/tampão ($\log P_{O/A}$) e estabelecida a curva $\log P_{O/A}$ em função do pH.⁷⁴

3.2.14 - Incorporação em Vesículas

Foram adicionados 46 mg de Fosfatidilglicerol (PG) em um tubo de ensaio. Esse lipídio foi dissolvido em 1 mL de CHCl₃, o qual foi evaporado por fluxo de argônio. Adicionou-se 2 mL de tampão fosfato e o sistema foi submetido à agitação mecânica vigorosa por 3 minutos. A dispersão foi centrifugada por 3 minutos a 14×10^3 rpm, descartada a fase líquida e adicionados mais 2 mL de tampão. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de tampão e submetido a agitação mecânica vigorosa por 3 minutos. Desta dispersão foram retirados 25 μ L e adicionados a 1 mL de solução de porfirina 20 μ M. A mistura foi submetida à agitação mecânica e repouso por 30 minutos. O sistema foi centrifugado por 3 minutos a 14×10^3 rpm. Foi determinada a concentração do sobrenadante por UV-vis e a incorporação das drogas nos lipossomos foi determinada por comparação com

uma amostra controle submetida, simultaneamente, ao mesmo processo em ausência do sistema lipossomal.⁷²

3.2.15 - Cultura de células HeLa

As células HeLa foram estocadas em *Eppendorf* com suspensão de meio de cultivo com 10% de DMSO. Estes foram mantidos em cilindros de nitrogênio líquido. As células foram cultivadas em meio de cultivo celular, DMEM, com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/streptomicina) em estufa Thermo Eletron Corporation, HEPA Class 100 (37°C, 5% CO₂). Para o cultivo, a suspensão contida em cada vial (0,5mL) foi descongelada por adição de 1 mL de meio de cultivo. Após o descongelamento, a suspensão foi centrifugada por 2 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante com DMSO foi descartado e as células foram ressuspensas com meio de cultura e transferidas para uma garrafa de cultura com face rugosa, onde as células se mantêm aderidas. As células HeLa se reproduzem rapidamente, sendo necessária uma repicagem a cada 3 dias. O processo de repicagem é efetuado mediante as seguintes etapas:

- 1-Retirar o meio de cultura de cada garrafa e descartá-lo.
- 2-Lavar as células com tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ esterilizado.
- 3- Adicionar 1,5 mL de tripsina e manter a garrafa na estufa (37°C) por 5 minutos para liberar as células aderidas.
- 4- Retirar a suspensão de células em tripsina e adicionar 3 mL de meio de cultura, centrifugar por 2 minutos a 3500 rpm, eliminar o sobrenadante e ressuspender as células em novo meio de cultivo.
- 5 - Determinar a concentração da suspensão por contagem em um hematocítômetro, por microscopia óptica, utilizando o corante azul de Tripan como revelador. Repetir o

procedimento de cultivo em garrafa. Para realizar os devidos ensaios foram utilizadas placas de Petri para a aderência das mesmas.

3.2.16 - Determinação das taxas de incorporação, toxicidade e fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores em células tipo HeLa.

As células foram cultivadas e transferidas para placas Petri com 1,8 cm de diâmetro na concentração de 10^6 células.mL⁻¹ e incubadas por 12 horas para aderência. Decorrido o período de incubação, o meio de cultivo antigo foi removido e adicionado outro, contendo a droga na concentração de 20 µM. As placas foram novamente incubadas por um período de 3 horas para a incorporação da droga. Decorrido o período, o meio com droga foi removido e a taxa de incorporação foi determinada pela diferença de absorbância com uma alíquota da solução adicionada às células. Estas foram lavadas com tampão fosfato e irradiadas por 7 períodos de 1 minuto intercalados por 1 minuto. A irradiação foi realizada com *laser* Morgotron de 532 nm e 20 mW ou 650 nm e 20 mW. O feixe foi aberto, com uso de lente e determinada a potência aplicada na placa de cultivo. Que foi de 4,0 mW para a irradiação em 532 e 3,6 mW para irradiação em 650 nm. A dose utilizada foi de 2,7 mJ/cm² quando irradiado em 532 nm e 2,4 mJ/cm² quando irradiado em 650 nm. Após irradiação foi adicionado novo meio de cultivo e as células foram incubadas por um período de 48 horas. Foi então determinada a fotocitotoxicidade por comparação da viabilidade celular entre as placas incubadas com o fotossensibilizador e amostra controle as quais foram submetidas ao mesmo procedimento, exceto pela presença do fotossensibilizador. A viabilidade celular foi determinada por incubação das células com solução de Brometo de Metiltiazildifenil-tetrazolico (MTT) a 2,0mg/mL em tampão fosfato (PBS) por 4h. Em seguida, a fase aquosa foi removida cuidadosamente, permanecendo os cristais de Formazan, formados pela atuação das enzimas mitocôndrias das células viáveis. A cada poço foi adicionado 1 mL de DMSO

para dissolução dos cristais formando uma solução de coloração rosada, a qual foi quantificada por absorção, em cuveta de quartzo com volume de 1mL e caminho ótico de 1cm. Esta técnica permitiu uma quantificação das células viáveis. Tal procedimento foi adotado tanto na determinação da fotocitotoxicidade, com como da toxicidade no escuro, por procedimento análogo, exceto a irradiação. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas determinando a média aritmética e o desvio padrão.

Na determinação da fotocitotoxicidade foram utilizadas duas estratégias de aplicação dos fotossensibilizadores: 1) aplicação direta em meio de cultivo celular em células aderidas. 2) dispersão do fotossensibilizador incorporado em lipossomos de lipídio zwitteriônico fosfatidilcolina e aplicação da dispersão Fs/lipossomo.^{91,92} Este último processo foi utilizado, visando aumentar a taxa de incorporação em células para os fotossensibilizadores hidrofóbicos. Para ambas as estratégias, as taxas de sobrevivência foram determinadas por comparação com um controle submetido ao mesmo processo na ausência do fotossensibilizador.⁹³

3.2.17 - Extração das Mitocôndrias

As mitocôndrias foram retiradas de fígados de ratos do biotério do IQ-USP. Para a extração, foi utilizado tampão com sacarose 250 mM, Hepes 5 mM e EGTA 1 mM. As mitocôndrias foram separadas após a homogeneização do tecido e centrifugação. Após a homogeneização, foi feita uma centrifugação a 2000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 10000 rpm, 4°C e o procedimento foi repetido. Para a determinação da concentração mitocondrial, foi utilizado o método do biureto, tendo as medidas de absorção sido feitas em um aparelho Ultrospec 1000 da Amersham Pharmacia Biotech. Logo, a concentração de mitocôndrias expressas no trabalho se refere à concentração de proteínas na

mitocôndria, e não à concentração da organela. Para os experimentos, foi utilizado tampão com sacarose 250 mM, Hepes 10 mM, EGTA 1 mM, succinato 2 mM e fosfato de sódio 1 μ M. Todos os ensaios foram realizados imediatamente após a extração e a todos eles adicionou-se rotenona e oligomicina (1 μ M).

3.2.18 - Incorporação dos Fotossensibilizadores em Mitocôndrias

Para a determinação da taxa de incorporação do fotossensibilizador em mitocôndria foi preparada uma suspensão de mitocôndria em tampão fosfato com 20 μ M do fotossensibilizador e $\approx$ 13 mg/mL de mitocôndrias. Decorrido o período de 10 minutos a suspensão foi centrifugada. Foi determinada a concentração do sobrenadante por UV-vis e a taxa de incorporação foi determinada por comparação com uma amostra controle submetida, simultaneamente, ao mesmo processo em ausência de mitocôndrias.⁷⁶

3.2.19 - Citolocalização

A localização intracelular de fotossensibilizadores em células HeLa foi determinada através de microscopia de fluorescência confocal. Para obtenção das imagens as células foram plaqueadas em placas petri contendo uma lamínula. A cada placa com 3,6 centímetros de diâmetro contendo uma lamínula foi adicionada 1 mL de suspensão de células da ordem de 10^4 células.mL⁻¹, que permaneceu na estufa a 37°C e atmosfera de CO₂ por um período de 20 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas utilizando tampão e incubadas em meio de cultura com o fotossensibilizador na concentração de 20 μ M por um período de três horas. Decorrido este período foi acrescido *rodamina* 123, que é um marcador de mitocôndrias que já está bem estabelecido na literatura.⁹⁴ Utilizou-se uma concentração de 50 nM de rodamina 123 para uma co-incubação em células por um período

de uma hora. Decorrido este período, a lamínula contendo células aderidas foi removida da placa e fixada sobre uma lâmina, de modo que, as células foram imobilizadas entre a lâmina e a lamínula. Por fim, obteve-se a fluorescência de corante numa região intracelular específica. A Rodamina foi excitada em 488 nm e a emissão foi registrada no intervalo de 500-530 nm e, a Hp IX e seus similares (derivados de Pp IX) foram excitadas em 532 nm e emissão foi registrada entre 610 e 650 nm. Para captura das imagens foi utilizada microscopia de Fluorescência Confocal LSM 510 da Zeiss com objetiva de 60 vezes.

3.3 - Equipamentos e dispositivos

3.3.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram determinados em um equipamento BRUKER 500 MHz e em um Varian 300 MHz e sendo inspecionados com a ajuda do *software* MestRe-C (versão 5.0).

3.3.2 - Espectrofotômetro (UV-vis)

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminhos óticos de 0,4 e 1,0 cm.

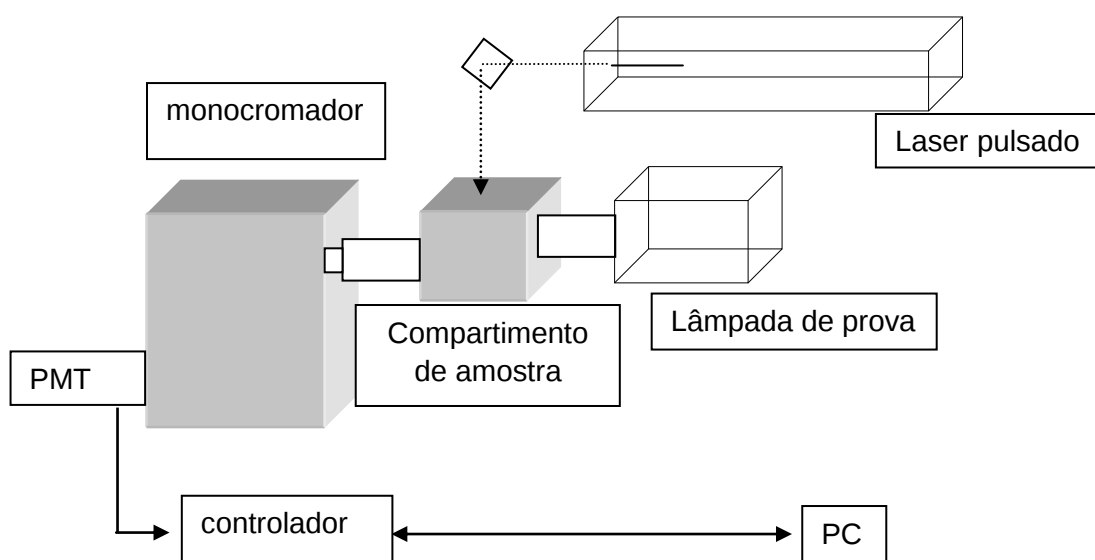
3.3.3 – Espectrofluorímetro

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex (Fluorolog 0.81m) em modo ângulo reto, com as 4 fendas (2 de excitação e 2 de emissão) ajustadas com aberturas em 8 mm. A excitação foi realizada em 532 nm, com absorção ajustada para valores menores que 0,1. O espalhamento de luz ressonante foi obtido em modo

síncrono em ângulo reto com $\Delta\lambda = 0$ nm entre os monocromadores de excitação e emissão com as fendas devidamente ajustadas para que a intensidade ficasse abaixo 1×10^6 contagens de fótons por segundo (cps).

3.3.4 – Equipamento de Fotólise por relâmpago de laser:

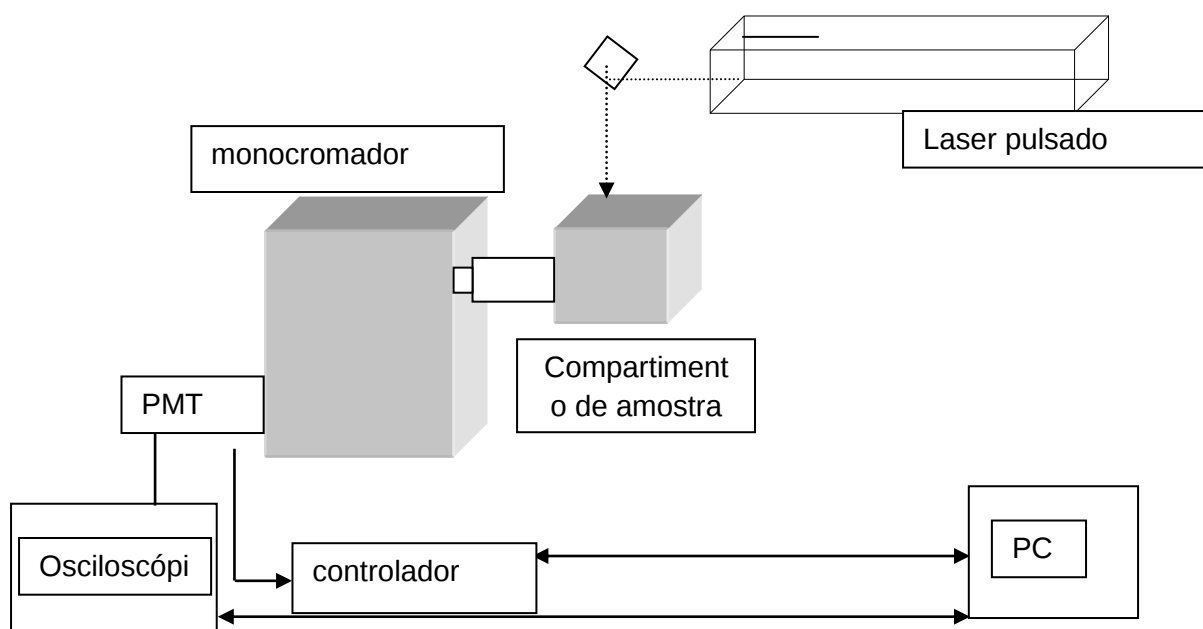
Os transientes tripletes foram detectados por fotólise de relâmpago a laser através de um sistema Applied Photophysics composto por um laser Nd:YAG Spectron Laser Systems, que possui um *laser* pulsado com 30 ns/ pulso e com ajuste de comprimento de onda de excitação para 266, 355 ou 532 nm a 90° de uma lâmpada de prova pulsada em sincronia com o feixe de laser. O analisador é constituído por uma lâmpada de xenônio de 500 W, com controles eletrônicos e um osciloscópio Hewlett Packard 54510B para captura de dados em um PC, como representado no Esquema 12.



Esquema 12: Representação esquemática do sistema de fotólise por pulso para detecção de variações de absorção de espécies transiente.

3.3.5 – Equipamento de Detecção de Oxigênio Singlete por Emissão no Infravermelho Próximo

O oxigênio singlete foi caracterizado através do seu decaimento no infravermelho próximo (a 1270 nm) e espectro de emissão registrado de 1200 a 1320 nm. A quantificação foi realizado através dos transientes de emissão em 1270 nm, em um equipamento composto por um laser Nd:YAG Continuum Surelite III pulsado em 532 nm, com tempo de duração de pulso de 5 ns e energia ≤ 5 mJ/pulso; um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu modelo R5509 resfriada a -80°C ; um sistema de detecção composto por uma placa de aquisição rápida modelo Becker & Hickl GmbH MSA – 300, ou um osciloscópio da Tektronix TDS 3012 – osciloscópio OPO, com softwares de aquisição LP900 (da *Edinburg*) e TRS da Logos Eletrônica. O sistema foi montado pela *Edinburg Analytical Instruments* e está representado no Esquema 13.



Esquema 13: Representação esquemática do sistema de emissão no infravermelho para detecção de oxigênio singlete, por pulso de laser.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para realização dos estudos comparativos entre estrutura e a atividade fotodinâmica, foi obtida uma série de 11 derivados de Pp IX por funcionalização nos grupos vinílicos e carbonílicos através de três diferentes rotas sintéticas. As rotas sintéticas estão representadas nos Esquemas 14, 15 e 16. Os compostos foram purificados por cromatografia radial, em coluna e em placa preparativa. A caracterização foi realizada por espectrometria de massa, espectroscopia eletrônica (UV-vis), vibracional (FTIR) e RMN de ^1H e ^{13}C (300 ou 500 MHz) usando técnicas unidimensionais e bidimensionais. As propriedades fotoquímicas, fotofísicas, ligação em membranas e a atividade de morte de células tumorais em cultura foram determinadas e correlacionadas.

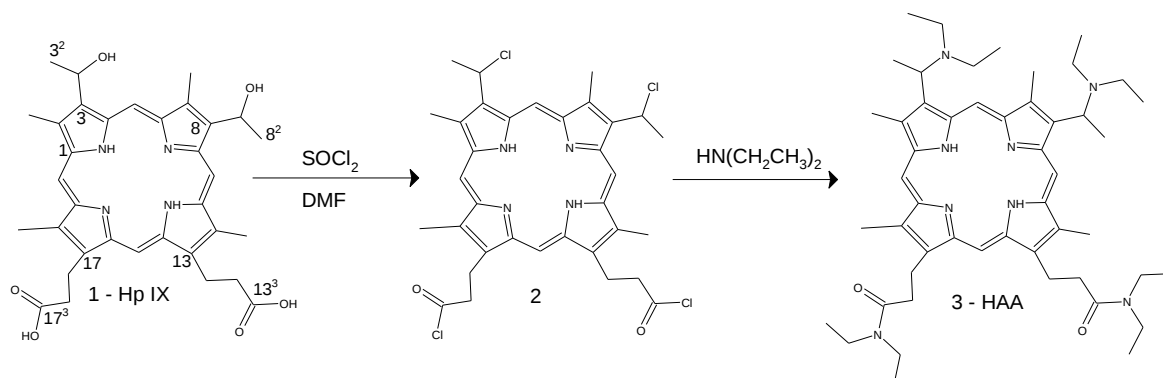
Também foram obtidos dois derivados do Cu^{2+} -Clorofilina. Estes derivados foram obtidos por rota análoga à desenvolvida para protoporfirina IX. A diferença é que os mesmos apresentam absorção maximizada na janela terapêutica e um potencial maior de uso prático na TFD. Estudos fotofísicos, fotoquímicos e de interação com células e membranas foram também realizados.

4.1 - Obtenção de Novos Fotossensibilizadores

4.1.1 – Funcionalização de Hematoporfirina IX (Rota I, Esquema 14)

Nesta rota foi utilizada como matéria prima a hematoporfirina IX (Hp IX), que é um derivado da Protoporfina IX (Pp IX). A Hp IX foi submetida à reação com cloreto de tionila e dimetilformamida (DMF) em quantidades catalíticas, levando à formação de intermediários reativos (cloreto de alila e cloreto de acila). Estes intermediários foram submetidos à reação

de substituição nucleofílica com dietilamina para a obtenção de um dos produtos desejados: Dimetil-8,13-Bis(dietilamia)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida) (HAA). O Esquema 14 ilustra os passos para a obtenção do produto.



Esquema 14: Diagrama de derivação de Hematoporfirina IX 1) Hp IX 2) intermediário tetra-clorado (novo) 3) Dimetil-8,13-Bis(dietilamia)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(N,N-dietil-propanamida) (HAA)

Após o término da reação de substituição, procedeu-se a purificação. Neste processo, os ensaios em TLC apresentaram várias manchas, evidenciando a formação de inúmeros compostos. Apesar do produto de reação apresentar uma resolução razoável em TLC, a cromatografia por coluna com gel de sílica mostrou-se ineficiente, apresentando um alto grau de retenção do pigmento na coluna e uma pequena resolução da fração eluída. Uma boa resolução foi obtida por cromatografia radial, utilizando gel de sílica GF_{254} . Esta técnica de separação possibilitou o isolamento de um composto puro com 20% de rendimento. Para a determinação do rendimento foi adotado que o composto de partida (Hp IX) apresentava apenas 60% de pureza.

A reação com cloreto de tionila conduz tanto à obtenção de cloretos de ácido nas posições 13^3 e 17^3 como à substituição das hidroxilas nas posições 3^1 e 8^1 por Cl. Sendo a reação não seletiva, esta conduz à formação de inúmeros produtos, mesmo que a reação seja conduzida ao composto tetra-clorado. Na primeira etapa desta rota pode ocorrer formação de

dímeros, trímeros e oligômeros, visto que, depois de formada a primeira molécula de cloreto de ácido, nas posições 13³ ou 17³, esta pode sofrer ataque da hidroxila de outra molécula, formando dímeros através de ligações ésteres. Também pode ocorrer a substituição das hidroxilas nas posições 3¹ e 8¹ que são α ao sistema aromático e, por conseguinte, de fácil eliminação. Nestas posições pode ocorrer a substituição do cloro por ataque do grupo hidroxila de outra molécula, levando à formação de dímeros por ligações tipo éter. A eliminação do cloro leva à formação de carbânio, o qual pode atacar outra molécula nas posições 3¹ e 8¹ formando dímeros por ligações carbono-carbono. Estas etapas podem se repetir ou combinarem-se, levando à formação de estruturas complexas. Esta formulação complexa já é conhecida como HpD e está registrada como Photofrin[®]. Outro fato, é que o composto de partida (Hp IX) apresenta baixo grau de pureza, sendo comercializado por Sigma-Aldrich com pureza máxima de 60%, o que dificulta a utilização deste composto como matéria prima para síntese.

Sendo levadas em conta todas às possibilidades de produtos, o rendimento de 20% foi considerado um êxito. Tal rendimento só foi obtido pelo fato da reação ser processada utilizando cloreto de tionila em excesso e na ausência de solvente e, na etapa subsequente, a substituição por dietilamina também ter sido processada com excesso da amina e ausência do solvente.

Além desta síntese conduzir a uma formulação complexa, os compostos apresentam outras características desfavoráveis tais como: equilíbrio de agregação e de protonação e fotodecomposição, dificultando a purificação dos compostos. A purificação foi efetuada através de cromatografia radial utilizando acetona como eluente e gel de sílica com gesso (carbonato) como a fase estacionária. Por proporcionar características básicas, o carbonato viabiliza a purificação, desprotonando a fração do pigmento que se encontrava em equilíbrio e impedindo a retenção do fotossensibilizador através da interação dos grupos amins com a

sílica. Este processo levou à purificação e caracterização de um composto HAA de forma inequívoca. Já o composto 2, que é um intermediário reativo, não foi isolado. Sua estrutura foi deduzida a partir da estrutura do seu derivado (HAA). A caracterização deste composto foi determinada através do espectro eletrônico (absorção e fluorescência), vibracional no infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C , usando técnica unidimensional e bidimensional (COSY e HETCOR).

Foi observado que, apesar do composto apresentar solubilidade diferente do precursor Hp IX, este não apresenta mudanças significativas no seu espectro eletrônico (absorção e emissão). O espectro UV-vis apresenta a banda *soret*, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em 395 nm, seguida das quatro bandas Qs em 497, 531, 567 e 521 nm, com intensidade proporcional à energia. O espectro de emissão (fluorescência) em metanol apresenta duas bandas, a primeira de 566 a 596, com máximo em 577 nm, e uma segunda banda de 608 a 639 com máximo em 621 nm. Tanto o perfil do espectro UV-vis como o de fluorescência são análogos ao da Hp IX. As propriedades eletrônicas são discutidas mais detalhadamente em 3.2.1.1 e 3.2.1.2 onde são apresentados os espectros UV-vis e de fluorescência nas figuras 10 e 11.

O espectro no infravermelho foi determinado por comparação com o precursor Hp IX, ambos em KBr. A comparação direta mostrou a ausência da banda de OH (que é muito intensa em Hp IX) e um deslocamento da banda de deformação axial da carbonila, que na Hp IX encontra-se 1715 cm^{-1} , sendo referente ao grupo COOH, e que é deslocada para 1733 cm^{-1} . Este deslocamento foi atribuído aos efeitos indutivo e de conjugação do par eletrônico livre do nitrogênio com a carbonila, aumentando a constante de força do modo vibracional, e deslocando a banda para frequências maiores - menor comprimento de onda (maior energia). A banda em 1733 cm^{-1} é atribuída à deformação axial do grupo CON, evidenciando a formação de amida. Os espectros de RMN confirmam a estrutura.

No espectro de RMN de ^1H : Os hidrogênios de 3^1 e 8^1 , quartetos sobrepostos para Hp IX, com δ de 6,58 ppm, apresentam-se afastados em HAA, e foram deslocados para δ de 6,11 e δ de 6,10 ppm, com $^3J=6,75$ Hz, apresentando multiplicidade bem definida (dois quartetos). Este deslocamento indica a substituição das hidroxilas de 3^1 e 8^1 por Cl e, posteriormente, por dietilamina. Esta funcionalidade também é evidenciada pelo aparecimento de novos sinais para CH_2 e CH_3 ; dois quartetos em 3,95 e 3,92 ppm, para 8H, referente aos CH_2 dos grupos amina nas posições 3^1 e 8^1 ; dois quartetos em 3,65 e 3,54 ppm para 4H cada um, referentes a CH_2 das funcionalidades amidas. Também ocorre o deslocamento do multiplete em 2,20 ppm referente aos Hs 3^2 e 8^2 que aparece como dublete em 2,08 ppm, e outros dois novos sinais: um sinal em 1,22 ppm multiplete para 12H atribuído a CH_3 das amidas, e outro multiplete em 0,95-0,90 ppm também para 12H atribuído a CH_3 dos grupos funcionais aminas. A correlação ^1H - ^1H (COSY), confirma o deslocamento dos Hs de 3^1 e 8^1 por acoplamento com 3^2 e 8^2 , e mostra que os Hs em 3,95 e 3,92 ppm estão acoplados com os de 0,92-3,92 ppm e que os de 3,65 e 3,54 ppm estão acoplados com os de 1,22 ppm, confirmando a atribuição do espectro de RMN de ^1H para esta molécula.

O RMN de ^{13}C mostra um deslocamento de 1,3 ppm para as carboxilas que passa de δ 174,61 para 173,35 ppm confirmando a formação de amida, a qual já tinha sido indicada no IV. O espectro ainda mostra um deslocamento de 7,7 ppm para os carbonos 3^1 e 8^1 , que se deslocaram de 66,08 ppm na Hp IX para 73,77 ppm. Estas atribuições foram realizadas de forma inequívoca através da correlação ^1H - ^{13}C (HETCOR), visto que estes Hs estão bem determinados por COSY. O espectro de RMN de ^{13}C também mostrou novos sinais em δ 65,11 ppm para CH_2 em 60,73 ppm também para CH_2 . Outros em 16,04 ppm para CH_3 e 14,41 ppm também para CH_3 . Todos determinados por DEPT. O HETCOR mostra que os Cs de 65,11 ppm correspondem aos Hs de 3,66 ppm e que os Cs 16,04 ppm correspondem aos Hs de 1,22 ppm. A combinação das técnicas define que este conjunto pertence à funcionalidade

amida. O HETCOR também correlaciona os *Cs* de 60,73 ppm com os *Hs* de 3,94 ppm os *Cs* de 14,41 ppm com os *Hs* de 0,98 ppm. A combinação das técnicas define que este último conjunto corresponde aos grupos aminos ligados nas posições 3¹ e 8¹. O conjunto das técnicas mostrou-se satisfatório e suficiente na determinação estrutural, confirmando a inserção da dietilamina nas posições 3¹ e 8¹ e nas 13³ e 17³, resultando na formação de amins terciárias e amidas nas respectivas posições. A atribuição de todos os sinais a para todos os grupos funcionais comprova a pureza da substância, uma vez que não houve sinais que dessem indícios de impureza.

4.1.2 – Funcionalização de Protoporfirina IX nas posições 3¹ e 8¹ (rota II, Esquema 15)

Esta rota consiste na funcionalização das posições 3¹ e 8¹ através da bromação dos grupos vinílicos da protoporfirina IX (Pp IX) ou substituição das hidroxilas em hematoporfirina IX (Hp IX), via reação com HBr/Hac. Esta estratégia foi utilizada para obtenção de ésteres em compostos porfirínicos e clorínicos.^{44,86} Neste trabalho, utilizou-se Pp IX (95% de pureza) como composto de partida, visto que, este apresenta pureza muito superior à hematoporfirina IX e maior estabilidade. Como já comentado, a Hp IX é comercializada com um grau de pureza de, no máximo, 60% e apresenta instabilidade devido ao processo de eliminação das OH α ao anel porfirínico.

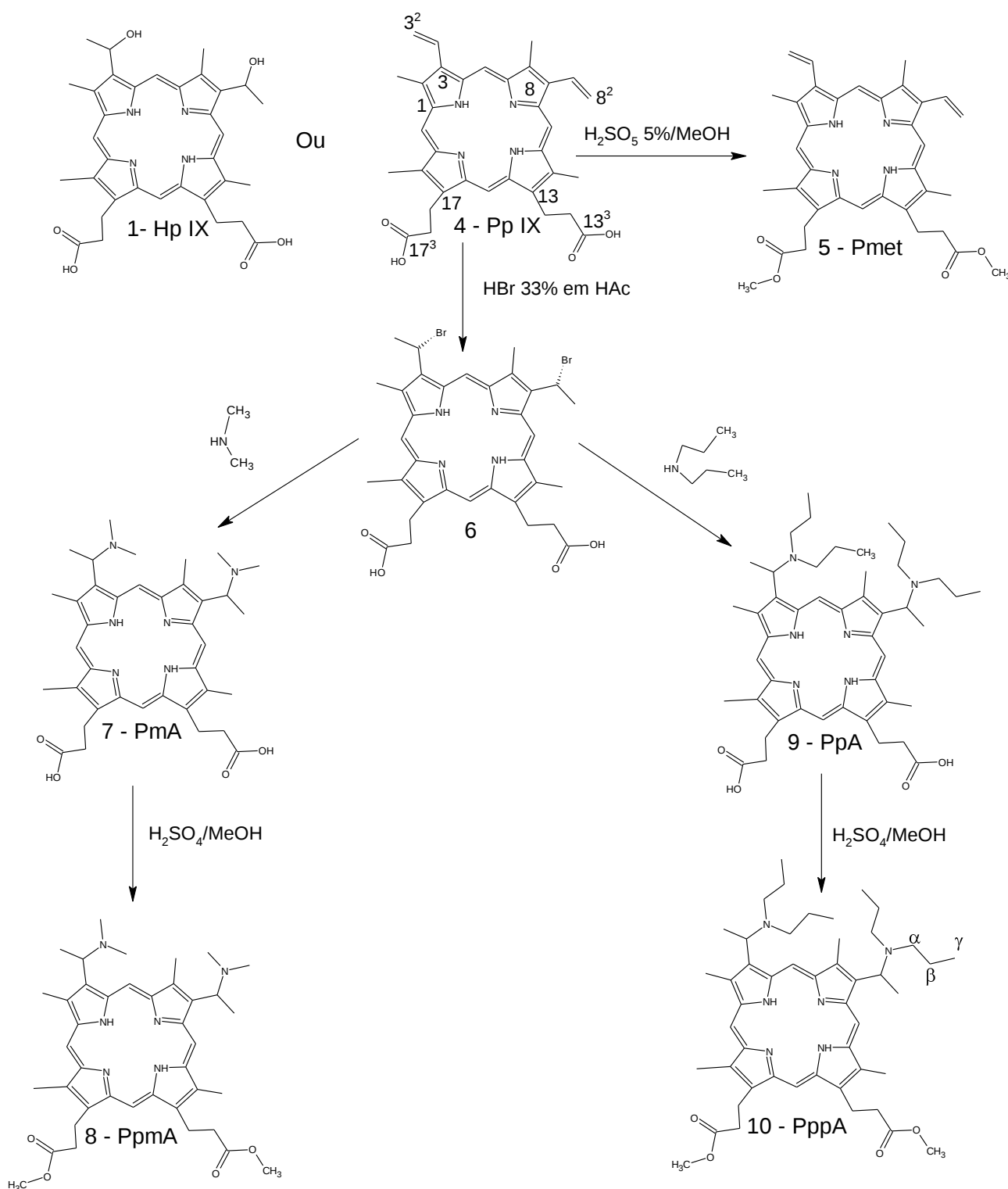
4.1.2.1 - Bromação da protoporfirinas IX.

A Pp IX foi bromada com HBr 33% em ácido acético. Decorridas 24 horas, os ácidos excedentes foram eliminados por sucção a pressão reduzida, obtendo-se um precipitado de cor púrpura, solúvel em clorofórmio, do qual se pode inferir que os vinílicos exocíclicos foram

convertidos em compostos bromados nas posições α ao anel porfirínico, visto que Pp IX é insolúvel neste solvente. No entanto, este composto não foi caracterizado devido às dificuldades experimentais em uma possível purificação por técnicas convencionais. As dificuldades são causadas, principalmente, pela reação de eliminação de Br que se encontra nas posições α ao anel porfirínico e pela presença de carboxilatos, que são grupos funcionais que dificultam a purificação com gel de sílica. Este intermediário foi determinado por caracterização dos seus derivados.

4.1.2.2 - Substituição dos compostos bromados por amina

Decorrido o período estabelecido (5 dias), nos testes em TLC foi observado um decréscimo no fator de retenção (rf) das manchas superiores, evidenciando mudanças na polaridade da molécula. No entanto, as placas não apresentaram resolução suficiente para uma possível purificação. Esta pequena resolução foi atribuída à forte interação das moléculas com a sílica, que ocorre tanto nos grupos carboxílicos quanto nos grupos amina. Outro fator, é que as moléculas apresentam quatro diferentes pKas (dois carboxilatos e duas aminas), assim, diferentes formas protonadas da mesma molécula que apresentam rf diferentes estão presentes nas misturas. Visto que estes compostos também não são purificáveis por partição água/solvente orgânico, as amostras foram submetidas a esterificação para purificação.



Esquema 15: Diagrama de derivatização de Protoporfirina IX:(Pmet) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster (Pma) 8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato, (Ppma) Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster .(Ppa)8,13-Bis(1-diproliamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato e (Pppa) Dimetil-8,13-Bis(1-diproliamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster.

4.1.2.3 - Esterificação dos compostos porfirínicos

Após a esterificação dos grupos carboxílicos nos compostos PmA e PpA, foi possível purificar o produto (PpmA e PppA) e confirmar as reações das moléculas por comparação do *rf* (em TLC) com o produto de esterificação da Pp IX, observando-se que estes são ligeiramente mais polares, ou seja, possuem menor *rf*.

Para a purificação, o precipitado resultante da esterificação foi dissolvido em diclorometano e particionado com água para a eliminação dos resíduos mais polares. Todo o pigmento permaneceu na fase orgânica. O concentrado foi purificado por cromatografia em coluna com alumina básica, utilizando um gradiente de diclorometano/metanol como eluente. Os produtos foram identificados por Infravermelho e RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HETCOR.

4.1.2.4 - Caracterização estrutural

(Pmet) - Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster.

A Protoporfirina IX foi esterificada e testada em TLC de gel de sílica e eluída com diclorometano/metanol 50:1, apresentando *rf* de 0,62. A esterificação ocorreu com rendimento de 95%. A determinação estrutural foi realizada por RMN unidimensional (^1H , ^{13}C) e bidimensional (COSY, e HETCOR) usando CDCl_3 como solvente.

O espectro de ^1H apresenta um multiplete com δ de 8,16-8,22 ppm para os ^1H de 3¹ e 8¹ dos grupos vinílicos e dois multiplas com δ de 6,12 e 6,16 ppm para os ^1H 3² e 8², dos mesmos grupos. Um multiplete com δ de 4,3 ppm para os ^1H de 13¹ e 17¹, um singleto com δ de 3,68 ppm característico dos grupos metóxi de ésteres e um outro multiplete com δ de 3,24 ppm para os ^1H de 13² e 17². O acoplamento entre os ^1H dos grupos vinílicos está destacado

no espectro de COSY, assim como o acoplamento entre os ^1H 13¹-13², 17¹-17². Para as demais posições, os δ são coincidentes com o espectro da hepatoporfirina IX.

O espectro de ^{13}C combinado com HETCOR permite a atribuição de todos os carbonos. A esterificação é evidenciada pelo deslocamento característico do metóxi com δ de 51,7 ppm. Os carbonos vinílicos 3¹ e 8¹ encontram-se com δ de 130,16 ppm e os 3² e 8² com δ de 120,61 ppm. A espectroscopia completa foi realizada não somente para a determinação estrutural, mas também como uma referência às demais moléculas sintetizadas. O produto de esterificação é uma ótima referência, visto que apresenta uma alta solubilidade em CHCl_3 , solvente utilizado para determinação dos demais compostos. Assim, as comparações espectrais podem ser realizadas sem interferência do efeito de deslocamento causado pelo solvente.

(Ppma) - Dimetil-8,13-Bis(1-dimetilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropinato dimetil éster.

Foi realizada a bromação nas posições 3¹ e 8¹ dos grupos vinílicos em 3¹-3² e 8¹-8² e a substituição por dimetilamina. Após a substituição, o produto foi esterificado, purificado em coluna cromatográfica com alumina básica, utilizando-se um gradiente de diclorometano/metanol como eluente. Após a purificação, foi determinado o $r_f=0,52$ em TLC de gel de sílica com diclorometano/metanol 20:1. O rendimento global da reação foi 46%. O produto foi identificado por RMN usando técnicas 1D e 2D. O espectro de ^1H não apresenta os sinais relativos aos grupos vinílicos em 3¹-3² e 8¹-8², sendo observados novos sinais em δ 1,95 ppm para os ^1H do CH_3 da dimetilamina inseridos nas posições 3¹ e 8¹. Também é observado o surgimento de novos sinais em δ 5,99, 3,68 e 2,2 ppm. O espectro 2D COSY mostra que os sinais em δ 5,99 e 2,2 ppm estão acoplados entre si. O sinal em δ 5,99 ppm

corresponde aos ^1H de 3^1 , 8^1 e o sinal em δ 2,2 ppm corresponde aos ^1H de 3^2 , 8^2 . Já o sinal em δ 3,68 ppm é característico do grupo metóxi.

O espectro de ^{13}C apresenta os sinais em δ 29,2 e 29,6 ppm. Esses sinais foram atribuídos aos ^{13}C de NCH_3 dos grupos inseridos na molécula. Os carbonos nas posições 3^1 e 8^1 foram deslocados para δ 66 e 65 ppm; já os carbonos 3^2 e 8^2 foram deslocados para δ 21,6 ppm e os carbonos dos grupos metóxi encontram-se em δ 51,7 ppm, deslocamento característico deste grupo funcional.

(Pppa) - Dimetil-8,13-Bis(1-dipropilamina)-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropionato dimetil éster.

Após a bromação dos grupos vinílicos e a substituição do bromo por dipropilamina, o produto foi esterificado e caracterizado por TLC de gel de sílica. Este produto foi purificado em coluna cromatográfica com alumina básica, utilizando um gradiente de diclorometano/metanol como eluente, e foi determinado o rf (0,6) em TLC de gel de sílica e diclorometano/metanol 20:1

Após a purificação, o rendimento foi determinado em 52%. O produto foi identificado por RMN usando técnicas 1D e 2D, as quais permitiram a atribuição dos espectros de ^1H e ^{13}C . Os espectros obtidos são de difícil atribuição. Os sinais relativos aos grupos inseridos dipropilamina apresentam-se como multipletes complexos devido à sobreposição de grupos semelhantes, mas não equivalentes. Os fatores que contribuem para a complexidade do espectro são: 1) As posições 3^1 e 8^1 , onde são inseridos os grupos dipropilamino, apresentam deslocamentos químicos semelhantes, mas não equivalentes. Em decorrência, os grupos inseridos nestas posições apresentam sinais sobrepostos. 2) O espectro evidencia a formação de agregado, o que leva à formação de sinais com multiplicidade indefinida e ligeiras variações nos deslocamentos, dependendo do estado de agregação. Isto foi observado não só

para sinais relativos aos grupos inseridos, mas também para os demais sinais, tanto nesta molécula, quanto nos demais compostos aqui relatados e moléculas correlatas.^{44,58} Assim, tornou-se imprescindível a utilização de técnicas 2D na determinação estrutural destas moléculas.

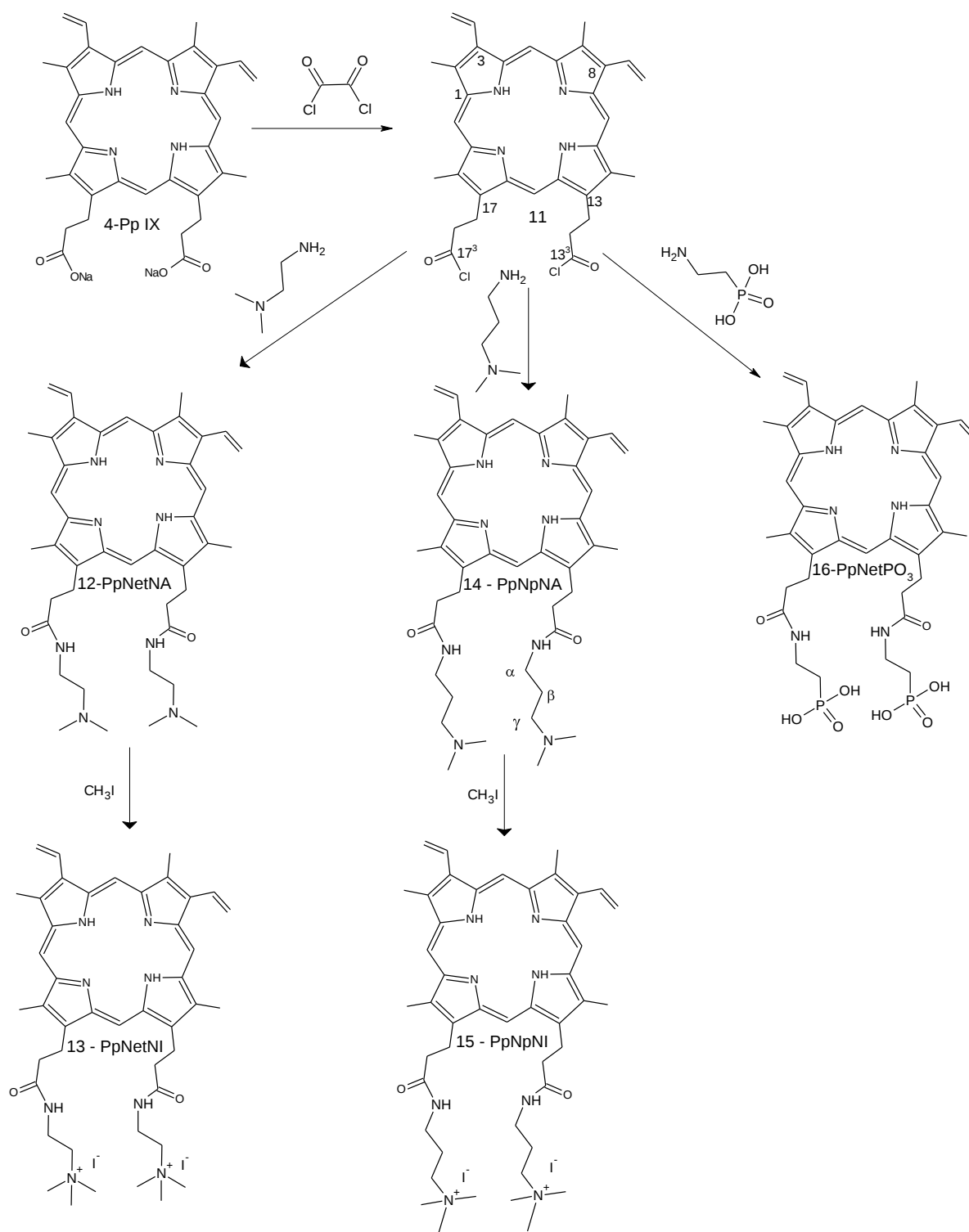
O espectro de ^1H apresenta-se bastante complexo devido às propriedades relatadas da molécula. Sua atribuição só foi possível através do espectro de COSY, no qual foram determinados todos acoplamentos ^1H - ^1H da molécula. Assim, foi observado que o sinal com centro em δ de δ 3,1 ppm encontra-se acoplado com o de δ 1,78 ppm; e este acopla-se com o sinal de 0,88 ppm. Esta seqüência foi atribuída aos grupos dipropilaminos inseridos nas posições 3^1 e 8^1 . Estes sinais são atribuídos respectivamente às posições α , β e γ em relação ao nitrogênio. A inserção do grupo funcional na molécula foi comprovada pela ausência dos sinais referentes aos grupos vinílicos de 3^1 - 3^2 e 8^1 - 8^2 . Os ^1H destas posições foram determinados por seus acoplamentos no espectro de COSY, sendo que os ^1H de 3^1 e 8^1 encontram-se em δ 5,8 ppm e os ^1H em 3^2 e 8^2 encontram-se em δ 1,88 ppm; estes estão acoplados entre si. A esterificação foi confirmada pelo sinal característico para metóxi em δ 3,68 ppm. Para as demais posições o δ é coincidente com o espectro de Pmet e hematoporfirina IX.

A atribuição do espectro de ^{13}C foi realizada com o auxílio do espectro 2D HETCOR. Os carbonos referentes aos grupos inseridos, dipropilamina, foram determinados por acoplamento com os ^1H , já determinados por COSY. Estes se encontram com deslocamento em δ 52,6; 20,58-20,30 ppm e 12,23-12,21 ppm. Os valores são coincidentes com os estimados para estas posições. Estes deslocamentos são relativos às posições α , β e γ em relação ao nitrogênio. A inserção da funcionalidade também é confirmada pela eliminação dos sinais referentes aos grupos vinílicos em 3^1 - 3^2 e 8^1 - 8^2 . Os carbonos nestas posições foram

deslocados para δ 65,7 ppm, para as posições 3¹ e 8¹, e em δ 26,2 ppm para as posições em 3² e 8². Estas atribuições foram determinadas por acoplamento com os ¹H destas posições no espectro HETCOR. Já a esterificação foi de fácil confirmação pelo seu deslocamento característico do carbono do grupo metóxi em δ 51,7 ppm, e comprovada pelo acoplamento com os ¹H desta posição.

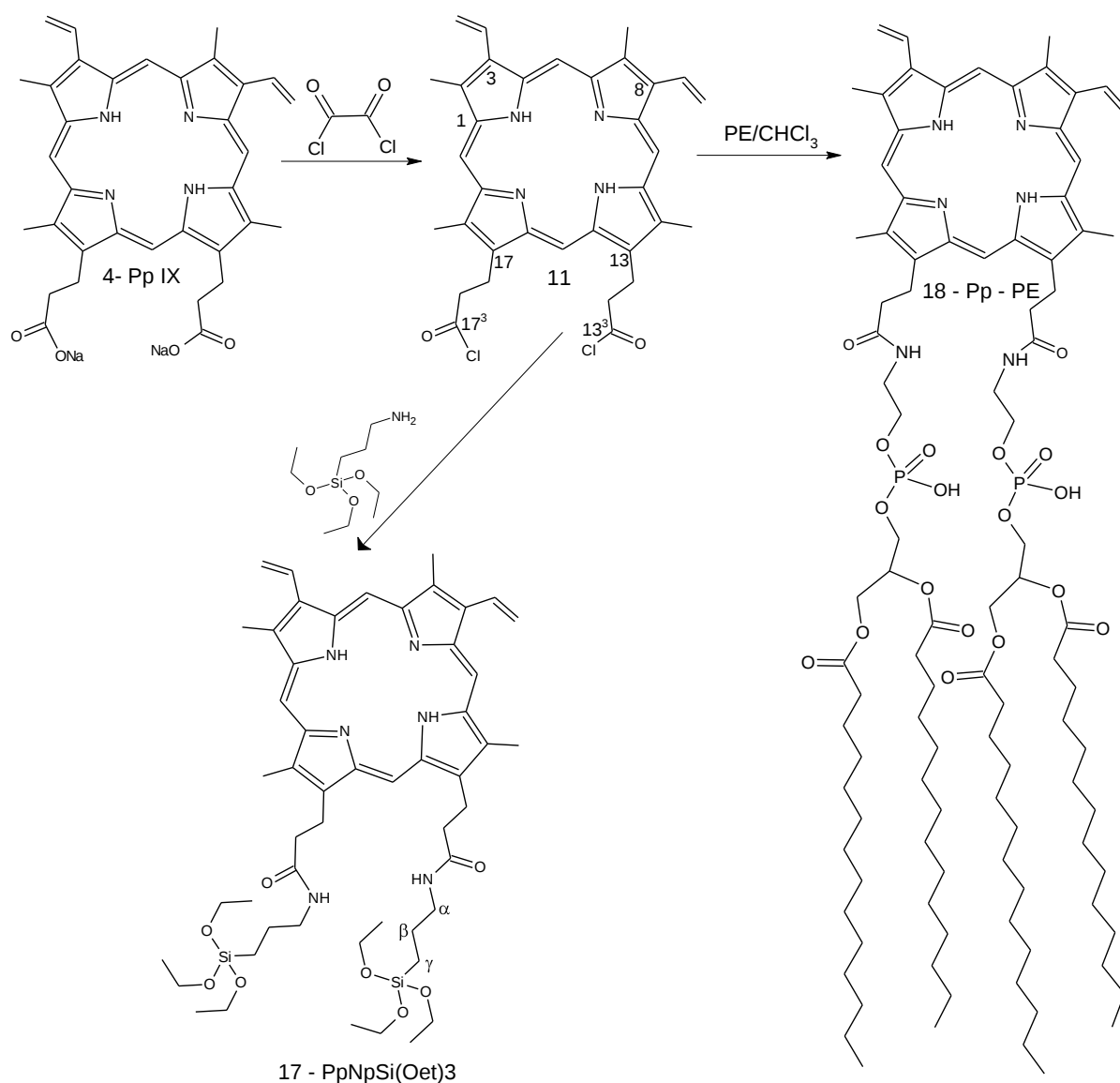
4.1.3 – Funcionalização de protoporfirina IX nas carboxilas em 13³ e 17³ (Rota III Esquemas 16 e 17)

Devido ao fato da funcionalização da protoporfirina IX com compostos unifuncionais em 3¹ e 8¹ e/ou 13³ e 17³ ter se mostrado ineficaz para a obtenção de compostos quaternários, foi estabelecida uma nova rota na qual foram utilizados compostos difuncionais como nucleofílicos e Pp IX com as carboxilas convertidas em cloreto de acila por reação com cloreto de oxalila, uma vez que este é um excelente reagente, fornecendo bons rendimentos e sendo de fácil aquisição. Ademais, o cloreto de oxalila é considerado um reagente limpo, não deixando resíduos. Por esta razão, ele tem substituído o cloreto de tionila (reagente tóxico, de comercialização restrita e não recomendado para fármacos devido à presença de resíduos de enxofre nas reações).^{96,97}



Esquema 16: Rota III para a obtenção de derivados de Protoporfirina IX. 4) Pp IX 12) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida] (PpNetNA) 13) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2(propanoilamino)etanoamônio] (PpNetNI) 14) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina]prpil]butanamida] (PpNpNA) 15) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio] (PpNpNI) 16) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(propanoilamino)etil]fosfônico ácido] (PpNetPO₃).

Utilizando-se cloretos de ácido como intermediários, foram obtidas amidas-aminas a partir compostos diamínicos (primária-terciária) com espaçamento de dois e três carbonos entre os grupos funcionais. Desta forma, as amidas foram formadas a partir das aminas primárias, deixando livres as aminas terciárias para serem quaternarizadas. Também foram efetuadas reações semelhantes com aminosilano, ácido aminofosfônico e fosfatidiletanolamina (PE) para a obtenção de novos compostos que viabilizam outras estratégias de aplicação e estudos do mecanismo de ação da droga em TFD.



Esquema 17: Rota III para a obtenção de derivados de Protoporfirina IX: 4) Pp IX 17) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-Trietoxisilano]prpil]butanamida] (PppSi(OEt)₃ 18) Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(-dipropil-L-alfa-fosfatidiletanolamina) (Pp- PE)

Neste trabalho foi realizado um estudo relacionando à estrutura com a atividade dos compostos sintetizados através das rotas I, II e os compostos do Esquema 16 da rota III; já os compostos obtidos pela rota III, apresentados no Esquema 17 estão sendo estudados em colaboração com outros grupos de pesquisa. Estamos estudando a ação fotoinduzida de Pp-PE em vesículas gigantes, e a ação fotodinâmica de PpNpSi(Oet)₃ encapsulado em nano partículas de sílica.

3.1.3.1 – Caracterização Estrutural

(PpNetNA): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2-(dimetilamina)etil]propanamida]

PpNetNA foi obtido com rendimento global de reação de 91%. O composto foi obtido a partir do cloreto de acila nos grupos propiônicos de Pp IX, seguido de uma substituição do cloro pela amina primária de N,N-dimetiletildiamina. A reação foi evidenciada pelo seu caráter exotérmico e pela mudança de solubilidade do produto o qual apresenta excelente solubilidade em diclorometano em meio básico e solubilidade em água em meio ácido. Foi efetuada uma partição entre diclorometano e tampão fosfato pH 9 para a eliminação dos resíduos mais polares. A fase orgânica foi concentrada e purificada em coluna cromatográfica usando alumina básica como fase estacionária e diclorometano/metanol 20:1 como eluente. A estrutura foi determinada por espectroscopia no Infravermelho, RMN de ¹H e ¹³C e espectrometria de massa.

No espectro IV em KBr, a banda em 1556 cm⁻¹ atribuída a COO⁻ da Pp IX, foi deslocada para 1638 cm⁻¹ em PpNetNA, a qual foi atribuída a OCN evidenciando a formação de amida. No mais, o espectro é relativamente complexo e similar ao espectro da Pp IX.

A estrutura foi confirmada por RMN de ^1H . O espectro de Hidrogênio apresenta sinais em δ 3,04 e 3,06 ppm para 4H α à carbonila da amida, δ 1,81 e 1,80 ppm para 4H β e o sinal em δ 2,21 ppm para 12H dos grupos metila das aminas. O espectro de ^1H foi determinado utilizando a técnica unidimensional (1D) ^1H e bidimensional (2D) COSY, onde foram observados os devidos acoplamentos da estrutura. A difuncionalização em ^{13}C e ^{17}O foi confirmada por espectrometria de massa por infusão direta, onde o pico base é referente ao íon molecular protonado em 703,5 m/z e um pico secundário em 660 m/z resultante fragmentação C- N(CH₃)₂ e eliminação de N(CH₃)₂.

(PpNetNI): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-2-(propanoilamino)etanoamônio]

PpNetNI foi obtido por metilação das aminas terciárias de PpNetNA com iodometano em diclorometano. No decorrer de 12 horas, a metilação ocorreu de forma quantitativa, levando à descoloração do diclorometano por precipitação dos quaternários que são insolúveis neste solvente. O composto foi solubilizado em metanol, recristalizado com diclorometano e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C e 1D e 2D (COSY e HETCOR) e espectrometria de massa.

No espectro IV, pode ser observada a banda de estiramento COO⁻ que na Pp IX se encontra 1556 cm⁻¹ e que em PpNetNA foi deslocada para em 1638 cm⁻¹ referente à carbonila de amida é deslocada para 1651 cm⁻¹ em PpNetNI. Este deslocamento indica a metilação das aminas terciárias, fato já evidenciado através da solubilidade.

O espectro de RMN de ^1H foi determinado em DMSO e apresenta um pequeno deslocamento para os 4Hs α à carbonila da amida de 3,04 para 3,10 ppm. Já os Hs β , que neste composto são α ao quaternário, apresentam um deslocamento significativo de δ de 2,38 para 2,49 ppm e os seis grupos metila do quaternário estão em δ de 3,36 ppm. Os

deslocamentos são confirmados através dos acoplamentos, usando a técnica bidimensional COSY, na qual foram evidenciados todos os acoplamentos devidos. O espectro de ^{13}C foi determinado por técnicas 1D e 2D (HETCOR) e foi feita a análise comparativa com o registrado para o dimetil éster de protoporfirina IX e hematoporfirina IX. Os ^{13}C das carbonilas se encontram em δ 172,31 ppm deslocado 2,6 ppm da carboxila da Hp IX e 1,3 ppm da carbonila do éster. Os ^{13}C de 13^2 e 17^2 foram registrados em δ de 31,61 e 30,71 ppm, sendo observado um deslocamento para campos baixos de 5 ppm. Este deslocamento foi atribuído aos efeitos eletrônicos do grupo amida. Também foram registrados novos sinais para o grupo funcional inserido: dois em δ 63,61 e 63,59 ppm atribuídos aos carbonos nas posições α ao nitrogênio da amida, dois em δ 32,85 e 31,63 ppm referentes aos carbonos β e seis sinais no intervalo de δ 52,58-52,01 ppm referentes aos grupos amônio quaternário, confirmando a diquaternarização da molécula. A confirmação estrutural também foi determinada por espectrometria de massa, onde o pico base em 858,4 m/z é referente à eliminação de um dos iodios dos pares iônicos $\text{M}^+ - \text{I}^-$.

(PpNpNA): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-3-dimetilamina)prpil]butanamida]

PpNpNA foi obtida de forma análoga à PpNetNA, utilizando como substituinte o 3-dimetilamino-1-propanoamina. Também foi purificada de forma análoga, obtendo-se rendimento global de 95%. A caracterização foi efetuada por espectroscopia no Infravermelho, RMN de ^1H 1D e 2D. No espectro IV, a banda em 1556 cm^{-1} atribuída a COO^- da Pp IX é deslocada para 1635 cm^{-1} em PpNpNA, a qual foi atribuída ao estiramento OCN de amida.

O espectro de RMN de ^1H confirma a estrutura, a qual apresenta sinais em δ 2,88 ppm para 4H α à carbonila da amida, δ de 1,70 ppm para 4H β , δ de 2,42-2,37 ppm para 4H γ à

carbonila. O sinal em δ de 2,23 ppm foi atribuído aos 12H dos grupos metila das aminas terciárias. A espectroscopia bidimensional COSY confirma os deslocamentos por acoplamento dos hidrogênios do grupo inserido e os demais acoplamentos característicos da estrutura. A difuncionalização da amostra foi determinada por espectrometria de massa por infusão direta. Na fragmentação é registrada a quebra da ligação C- N(CH₃)₃ fragmento de massa 674,41 m/z pico base, referente M - N(CH₃)₃ e um menos intenso em 731,47 m/z que corresponde a molécula protonada M + 1H⁺.

(PpNpNI): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N,N,N-trimetil-3-(propanoilamino)propano-1-amônio]

Este composto foi obtido por metilação das aminas terciárias de PpNpNA com iodometano em diclorometano e foi purificado por recristalização. A metilação ocorreu de forma quantitativa. A estrutura foi determinada por espectro eletrônico UV-vis e fluorescência, por espectroscopia no infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C, com a contribuição dos espectros 2D COSY e HETCOR. Também foi determinada a espectrometria de massa por infusão direta da amostra dissolvida em acetonitrila.

Os espectros eletrônicos UV-vis e de fluorescência não diferem dos emitidos para Ppmet, resultado coerente, visto que não houve mudanças no cromóforo da molécula. No espectro IV a banda em 1556 cm⁻¹ atribuída a COO⁻ da Pp IX, e que encontra-se em 1635 cm⁻¹ para OCN de PpNpNA apresenta um leve deslocamento para 1637 cm⁻¹ em PpNpNI.

O espectro de RMN de ¹H foi determinado em DMSO e apresenta um pequeno deslocamento para 4H α à carbonila da amida de 2,88 para 2,93 ppm. Os H β da amida, apresentam um deslocamento de 1,70 na amina para 1,26 ppm no amônio quaternário, já os H γ à carbonila, apresentam um deslocamento significativo de δ 2,37 para 2,62 ppm e os seis grupos metila dos grupos amônio estão em δ 3,34 ppm. Os deslocamentos foram confirmados

através da técnica bidimensional COSY, onde estão ilustrados todos os acoplamentos do composto. Para esta molécula também foi determinado o espectro de ^{13}C no qual se comprova a determinação estrutural. As carbonilas são registradas em δ de 175,51 ppm apresentando um deslocamento para compo baixo em relação às das demais estruturas. Este deslocamento é atribuído ao efeito do solvente e, possivelmente, da concentração (30 mg.mL^{-1}), visto que os ^{13}C das posições 3^1 , 3^2 , 8^1 e 8^2 que estão determinados com precisão através dos acoplamentos entre si no espectro de COSY e acoplamento ^1H - ^{13}C no espectro de HETCOR também apresentam deslocamentos no mesmo sentido e proporcionalidade, sendo registrados em δ 131,40 ppm para as posições 3^1 e 8^1 e em 121,23 ppm para as posições 3^2 e 8^2 . Estas posições também apresentam um deslocamento de $\approx 1,3$ ppm em relação ao deslocamento registrado para as demais moléculas. Os espectro de carbono ^{13}C também registra os sinais correspondentes aos grupos inseridos, sendo registrado em δ de 40,59 ppm para os ^{13}C α à carbonila em 64,31 ppm para β e em 39,71 ppm para os γ . Também foram registradas as seis metilas referentes aos quaternários; estes sinais foram registrados entre δ de 54,22-53,85 ppm. A determinação quantitativa das metilas, confirma a di-quaternarização da molécula, que foi reafirmada por espectrometria de massa, registrando um pico para o fragmento $\text{M}^+ - \text{I}$ em 887,95 m/z, outro pico secundário em 660,40 m/z, referente à eliminação dos dois contra íons (I^-) e o fragmento N,N,N-trimetilpropil-1-amônio de um dos grupos funcionais. O pico base foi registrado em 380,24 m/z é atribuído a fragmentos do anel porfirínico. O conjunto das técnicas confirma, de forma inequívoca, a estrutura da molécula.

(PpNetPO₃): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N[-2- (propanoilamino)etil]fosfônico ácido]

PpNetPO₃ é um composto novo, que foi obtido por adição de ácido fosfônico-2-etilamina em cloreto de acila de Protoporfirina IX, ambos em DMSO, com rendimento de

84%. O produto foi purificado por partição em CHCl_2 /tampão acetato pH 3 e recristalização. Os ensaios de solubilidade em função pH evidenciaram que o composto é solúvel em diclorometano em meio ácido e hidrossolúvel em meio básico, (demonstrando as características ácidas do composto) e que a funcionalização deu-se pelo ataque da amina à carbonila, levando à formação do grupo amida, como esperado. A caracterização foi realizada através do espectro eletrônico (UV-vis e fluorescência), espectroscopia no Infravermelho e RMN de ^1H , utilizando-se as técnicas 1D e 2D (COSY) e espectrométrica de massa.

Tanto os espectros de absorção quanto fluorescência, não apresentam variações significativas em relação aos espectros determinados para os demais derivados de Pp IX, resultado esperado, visto que a funcionalização não levou a alterações significativas no cromóforo. O espectro no infravermelho apresenta uma banda intensa na região de 3600 a 3000 cm^{-1} com centro em 3430 cm^{-1} referente à deformação axial das hidroxilas dos grupos fosfônicos. Já a banda característica da deformação axial das carbonilas foi registrada em 1626 cm^{-1} , deslocamento característico para as amidas. Para o carboxilato presente no precursor (Pp IX) esta banda encontra-se em 1550 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H foi determinado em DMSO D_6 com δ 10,2-10,0 ppm para os ^1H mesos. Os ^1H vinílicos das posições 3¹ e 8¹ foram registrados em δ 8,4-8,3 ppm sendo confirmados no espectro de COSY por acoplamento com as posições 3² e 8² que foram determinados em δ 6,82 e 6,63 ppm. Os ^1H das posições 13¹ e 17¹ também foram determinados usando as técnicas 1D e 2D em δ 4,34 ppm. A determinação precisa destas posições foi efetuada mediante inspeção do espectro de COSY por acoplamento com os ^1H referentes às posições 13² e 17² que foram determinados em δ 3,2-3,1 ppm. Também foram registrados dois novos sinais em 3,01 e 1,70 ppm, estes sinais estão acoplados entre si, o acoplamento foi determinado no espectro de COSY, sendo estes atribuídos, respectivamente, às posições α e β à carbonila da amida formada pelo grupo inserido. Esta determinação comprova a funcionalização da molécula. No entanto, a

determinação do espectro de RMN foi limitada devido à baixa solubilidade do composto em solventes deuterados convencionais, no entanto, o espectro de ^1H 1D e 2D em DMSO D_6 (COSY) foi obtido com resolução suficiente para a determinação estrutural precisa.

(PpNpSi(Oet) $_3$): Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis[-N(-3-(Trietoxisilano)propil]butanamida]

PpNPSi(Oet) $_3$ foi obtido por adição direta de 3-Trietoxisilano-1-propilamina em cloreto de acila de Protoporfirina IX. O excesso de 3-Trietoxisilano-1-propilamina foi eliminado por sucção a pressão reduzida e os resíduos foram utilizados para a determinação estrutural. A caracterização foi determinada por espectroscopia no infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D.

O cromóforo foi caracterizado através dos espectros UV-vis e de fluorescência. Os espectros obtidos apresentam o perfil característico dos demais derivados de Pp IX. O espectro no Infravermelho apresenta a banda de deformação axial C=O em 1632 cm^{-1} , característica das amidas derivadas de Pp IX. O espectro de RMN de ^1H apresenta os sinais característicos desta família de compostos, já relatados anteriormente, seguidos dos novos sinais característicos dos grupos inseridos. Os sinais em δ 2,76; 1,65 e 0,56 ppm estão acoplados entre si. O acoplamento foi determinado no espectro de COSY. Estes deslocamentos correspondem às posições α , β e γ dos grupos inseridos em relação ao grupo amida. Os sinais em δ 3,67-3,66 e 1,06 ppm correspondem, respectivamente, aos CH_2 e CH_3 dos seis grupos etóxi ligados ao Si. Já os ^1H endocíclicos do anel porfirínico, que para os demais compostos encontram com δ entre -3 e -4 ppm, foram determinados em -5,53 ppm para este composto. Também foram determinados novos sinais referentes aos ^{13}C dos grupos inseridos. Os sinais em δ 43,91 e 43,93 ppm foram atribuídos aos dois ^{13}C das posições α às carbonilas das amidas. Os sinais em δ 25,18 e 25,14 são referentes às posições β e os em 8,65 e 7,55 são correspondentes à posição γ . Os carbonos correspondentes aos grupos etoxi- são

determinados em δ 58,39 e 18,26 que correspondem, respectivamente, aos CH_2 e CH_3 . Nos demais, os espectros de ^1H e de ^{13}C não apresentam variações significativas dos demais derivados de Pp IX.

Pp-PE: Dimetil-8,13-divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-bis(-dipropil-L-alfa-fosfatidiletanolamina)

Pp-PE foi obtido por adição de fosfatidiletanolamiana (PE) a cloreto de acila de Protoporfirina IX, ambos em diclorometano previamente seco. A reação ocorreu com rendimento de 71%. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com gel de sílica, eluído com $\text{CHCl}_2/\text{MeOH}$ 20:1. A caracterização foi determinada em TLC com r_f de 0,65 em $\text{CHCl}_2/\text{MeOH}$ 20:1, e também por espectroscopia no UV-vis e fluorescência, onde foi observado que o espectro eletrônico não sofreu alterações significativas e que a reação ocorreu sem alterações no anel porfirínico, mantendo as propriedades fotofísicas do cromóforo. O espectro vibracional no infravermelho apresenta uma banda larga e intensa com centro em 3400 cm^{-1} atribuída à deformação axial de O-H, duas bandas em 2922 e 2852 cm^{-1} para deformação axial C-H de CH_2 e CH_3 atribuídas, majoritariamente, às cadeias alquílicas do fofolípídio e uma banda intensa em 1735 cm^{-1} , referente à deformação axial C=O, característica das amidas derivadas de protoporfirina IX.

No espectro de massa não foi determinado com precisão o pico referente ao íon molecular, visto que o sinal referente à sua massa, em 1799 m/z, está muito próximo do limite de detecção. No entanto, o padrão de fragmentação em massas elevadas é característico para uma cadeia alquílica, apresentando fragmentos a cada 14 unidades. Os sinais com massa elevada evidenciam a difuncionalização da molécula, o que é coerente com o obtido para os demais compostos sintetizados através desta rota. O pico em 1115,7 m/z é atribuído ao fragmento $\text{C}_{55}\text{H}_{79}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}$, resultante da quebra da ligação oxigênio-fósforo (PpIX-N $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}/\text{PO}_3\text{R}_1$) de PE em um dos grupos inseridos, e da hidrólise do grupo éster em uma

das caudas do segundo grupo PE. Os dados obtidos através do conjunto de técnicas utilizadas foram considerados suficientes para a caracterização da molécula. A caracterização por RMN foi considerada desnecessária, levando-se em conta que a utilização desta técnica possui limitações para a aquisição e interpretação e que a obtenção do espectro não mostraria maiores contribuições para a caracterização estrutural. Estas considerações são adotadas pelo fato de a molécula apresentar massa elevada e cadeias alquílicas longas, o que dificulta a obtenção de um bom espectro e a atribuição de todos os sinais. Para a obtenção de um bom espectro seria necessária uma elevada quantidade de massa e um longo tempo de análise. Além destes fatores, a interpretação do espectro também se torna complexa devido à sobreposição dos sinais estimados para esta molécula.

Nesta etapa do trabalho, foram sintetizados 13 derivados de Pp IX, sendo sete compostos novos (HAA, PmA, PpA, PpmA, PppA, PpNetPO₃ e Pp-PE). A síntese dos compostos: PpNetNA, PpNetNI, PpNpNA e PpNpNI, já havia sido descrita por Haylet A. K. et al⁹⁸, no entanto, não foi publicada a caracterização estrutural por RMN. Neste trabalho, foi efetuada a síntese e a molécula foi caracterizada de forma inequívoca. A obtenção destas moléculas tem como objetivo a determinação de um estudo comparativo entre estrutura e atividade em TFD de derivados de protoporfirina IX. A síntese de PpNpSi(oet)₃ também já foi descrita por Jean-Pierre, B. *et al* em 1997.⁹⁹ Já Pmet é comercial.

Quando comparadas as rotas sintéticas pode-se concluir que a rota III envolve reações simples com bom rendimento, fornecendo rendimentos globais entre 70 e 95%. Esta nova rota apresenta menos passos de reação, forma compostos estáveis, solucionando o problema de eliminação ocorrida nas posições α ao anel porfirínico (3¹ e 8¹) quando a molécula é funcionalizada nestas posições. A rota III viabilizou a obtenção de uma série de compostos que possibilitam a realização de um estudo comparativo entre as funcionalidades de um

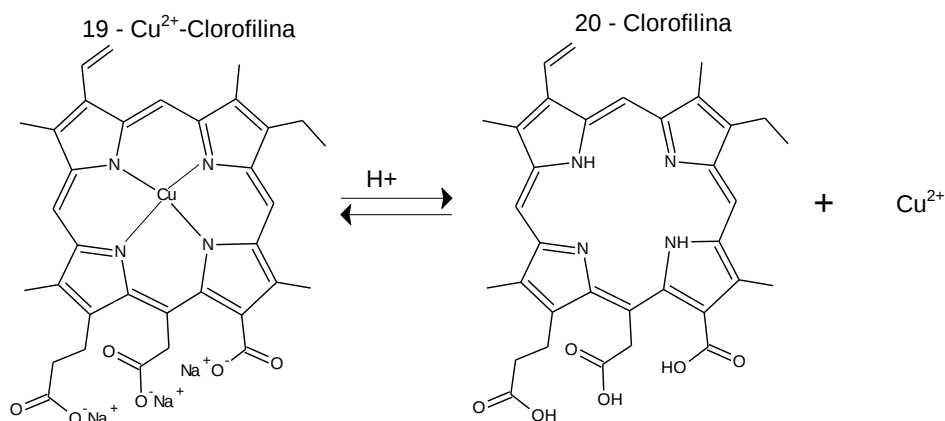
fotossensibilizador e a interação destes com sistemas biológicos (permeabilidade, incorporação e citolocalização).

4.1.4 – Derivatização do sal de sódio cupro clorofilina (Cu^{2+} -Clorofilina).

4.1.4.1 - Desmetalação de Cu^{2+} -Clorofilina.

Nesta etapa do trabalho, visa-se a eliminação do íon metálico desta molécula, visto que a molécula complexada com Cu^{2+} não é viável para o propósito de sua utilização como fotossensibilizador em TFD. É esperado que sendo eliminado o íon metálico (Cu^{2+}), esta porfirina venha a formar tripletes e, conseqüentemente, oxigênio singlete, como ocorre em outras porfirinas. Este trabalho também teve o propósito de funcionalizar a molécula com cargas positivas, visando aumentar a potencialidade em TFD, especialmente sua partição em membrana e citolocalização.

Dois métodos para a eliminação do Cu^{2+} estão descritos: eliminação com ácido sulfúrico concentrado e ácido sulfúrico 30% em ácido trifluoro acético.^{16,53} Estes métodos buscam a protonação do anel porfirínico com um ácido forte para a eliminação do íon metálico. No entanto, a purificação limita a eficiência no processo de desmetalação, visto que a porfirina está em equilíbrio com o composto metalado (Esquema 18).



Esquema 18: Equilíbrio entra a fração metalada e desmetalada da clorofilina.

Neste trabalho, a desmetalção foi realizada através de três diferentes métodos: os dois citados na literatura - ácido sulfúrico concentrado e ácido sulfúrico 30% em ácido trifluoroacético - e um terceiro método, que desenvolvemos, no qual a porfirina foi refluxada com HCl saturado em metanol previamente seco.

Método 1: Desmetalção com ácido sulfúrico concentrado

A eliminação do íon Cu^{2+} com ácido sulfúrico concentrado pode ser observada através UV-vis, onde foi observado um deslocamento da banda em 630 nm para 650 nm, quando usado metanol como solvente. O processo de purificação, no entanto, inviabilizou o método para a eliminação do íon, visto que quando neutralizado o equilíbrio é deslocado no sentido de formação do complexo Cu^{2+} -clorofilina, impossibilitando o isolamento da porfirina livre. Visando aperfeiçoar o método, a solução foi adicionada a metanol seco para esterificação dos carboxílicos e posterior separação por partição com água/diclorometano. A esterificação foi realizada com sucesso. No entanto, a purificação se apresentou complexa por partição devido à formação de três fases $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ na qual a fase de diclorometano impede a

transferência dos íons Cu^{2+} para a fase aquosa. Quando as fases são agitadas, ocorre formação de emulsão dificultando a obtenção do composto desejado.

Método 2: Desmetalação com ácido sulfúrico 30% em ácido trifluoroacético.

Neste segundo método, também foi observada a eliminação dos íons Cu^{2+} . A eliminação foi detectada pelo espectro UV-vis. No entanto, o processo de isolamento da fração desmetalada também foi inviabilizado como no processo anterior. De forma análoga, o processo foi contornado com a esterificação com metanol. Porém, os resultados foram similares, com formação de emulsão dificultando a separação das fases e o isolamento da clorofilina livre.

Método 3- Desmetalação com ácido clorídrico saturado em metanol

A eliminação do íon Cu^{2+} foi determinada através do espectro UV-vis, sendo observado um deslocamento de banda de 630nm na Cu^{2+} -Clorofilina para 650 nm da clorofilina na ausência de Cu^{2+} . Por este método, além da desmetalação também ocorre a esterificação do composto, o que possibilitou uma eliminação definitiva dos íons metálicos através de uma partição por HCl saturado em H_2O com diclorometano. Na partição, o composto livre do íon metálico e esterificado fica solubilizado em diclorometano e os íons Cu^{2+} foram transferidos para a fase aquosa. Por este método, ocorre a formação de sistema bifásico, possibilitando uma boa separação, sem agitação vigorosa, que causava a formação de emulsão.

Comparação dos métodos de desmetalação de Cu-clorofilina.

O resultado obtido dos três métodos de desmetalação utilizados com Cu^{2+} -clorofilina foram comparados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), tomando como referência uma fração de Cu^{2+} -Clorofilina para a determinação da porcentagem de eliminação de Cu^{2+} .

Tabela 3: Comparação dos métodos de eliminação do íon Cu^{2+} de Cu^{2+} -clorofilina		
Amostras	Concentração $\pm$ Desvio Padrão* (mg/3 mL)	% de eliminação de Cu^{2+}
Cu^{2+} -Clorofilina	$0,384 \pm 0,009$	Referência
Método 1	$0,063 \pm 0,001$	83.5
Método 2	$0,248 \pm 0,003$	35.4
Método 3	$0,051 \pm 0,003$	86.7

*Desvio padrão (n=3 medidas)

Os ensaios foram realizados com fração das amostras pré-purificadas por partição. Os resultados mostram uma maior taxa de eliminação no procedimento de desmetalação com HCl em MeOH, sendo este processo, ligeiramente superior à eliminação por ácido sulfúrico concentrado e esterificação com metanol e muito superior à desmetalação com 30% de ácido sulfúrico em ácido trifluoroacético. Outro fato é que, devido às propriedades oxidantes do ácido sulfúrico, boa parte da porfirina é degradada. Isto foi evidenciado por TLC. Já no procedimento que usa HCl em metanol, observou-se uma relação mais favorável entre o produto principal e as manchas secundárias. Assim, a desmetalação com HCl em metanol revelou-se como o melhor método de eliminação dos íons Cu^{2+} para esta porfirina. Para que o processo de desmetalação fosse mais efetivo, este foi repetido por três vezes consecutivas e a amostra foi purificada por cromatografia em coluna. O processo global mostrou um

rendimento de 52%, sendo observado que, mesmo usando condições mais favoráveis na eliminação dos íons Cu^{2+} , as perdas ainda são relativamente elevadas.

Após a purificação por coluna cromatográfica, o composto foi caracterizado por UV-vis, através do deslocamento da banda para o vermelho, de 630 nm para 650 nm. Este deslocamento poderia ser atribuído tanto à eliminação do íon Cu^{2+} , quanto aos efeitos eletrônicos causados pela esterificação, visto que a carbonila na posição 13¹ está conjugada ao anel aromático. Pode-se, ainda, atribuir a ocorrência deste efeito a uma combinação de ambos os fatores.

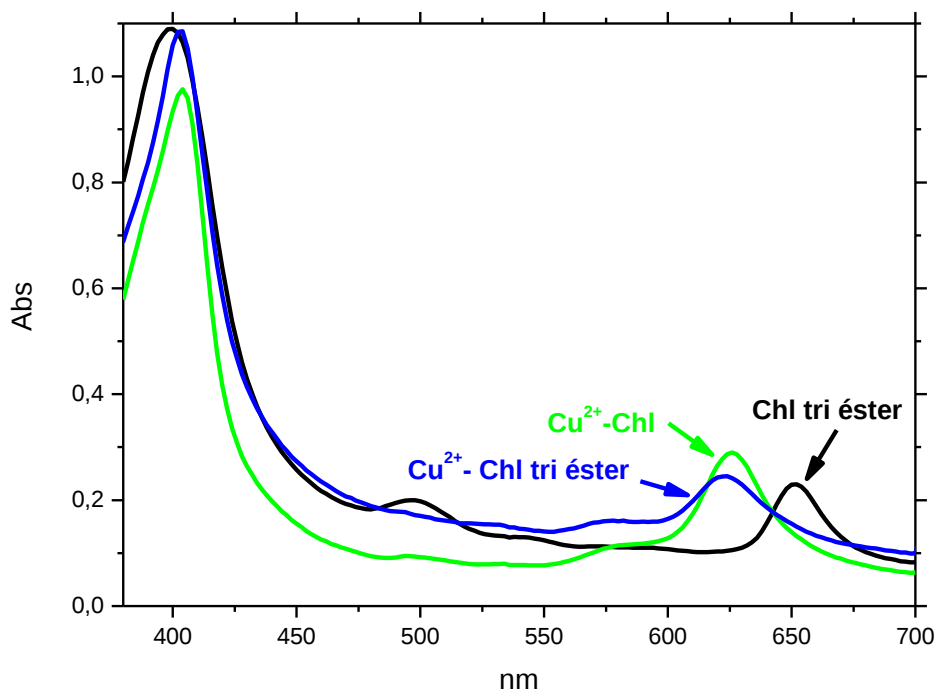


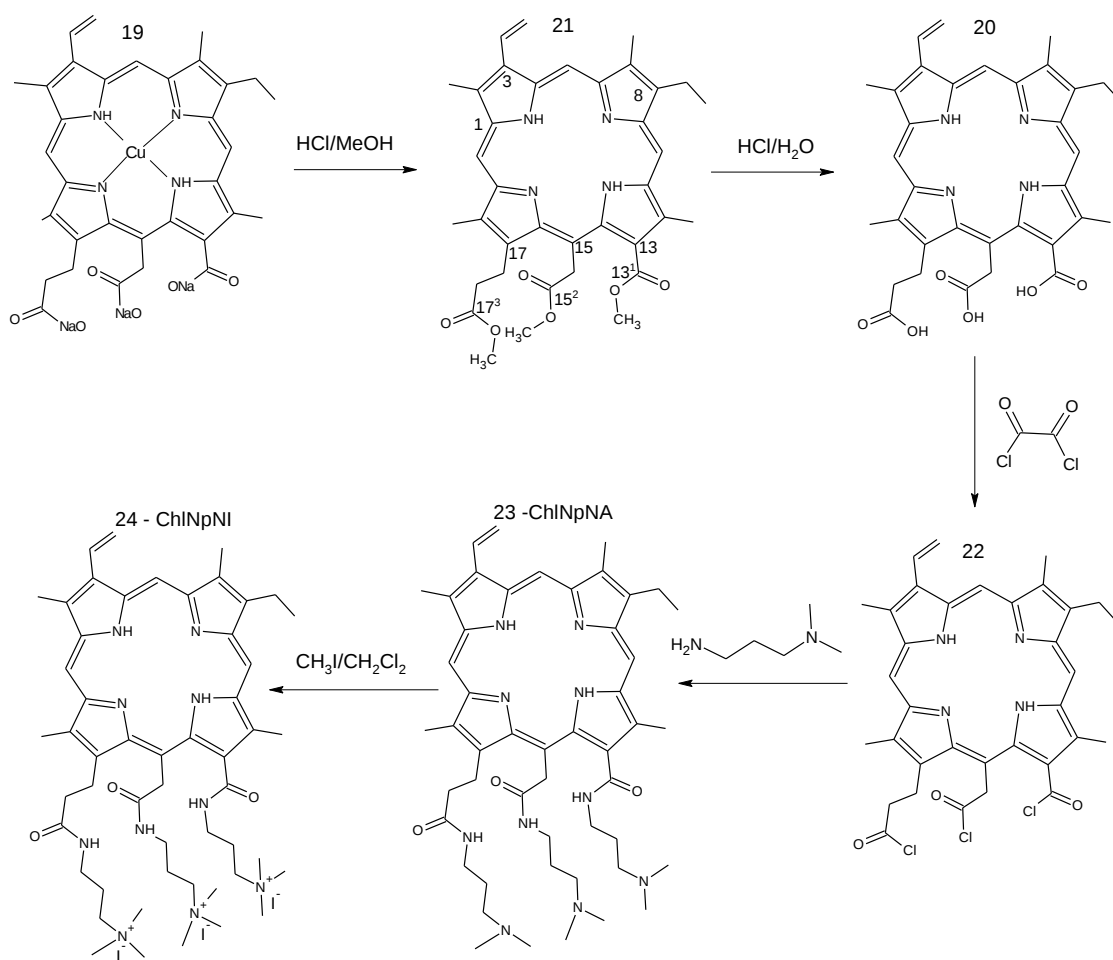
Figura 9: Espectros na região visível para Cu^{2+} -clorofilina (Cu^{2+} -Chl) clorofilina tri esterificada (Chl tri éster) e o Cu^{2+} -clorofilina tri esterificada (Cu^{2+} -Chl tri éster) todas em solução metanólica.

Para a determinação dos fatores que causaram o deslocamento foi inserido Cu^{2+} à molécula esterificada, sendo observado um retorno da banda para 630 nm, como pode ser observado na Figura 9. Também foi efetuada uma hidrólise da trimetóxi-clorofilina e, neste processo, não foi observado nenhum deslocamento de banda, mostrando que o deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ da molécula é exclusivamente devido à eliminação do íon metálico (Cu^{2+}). O processo

que permitiu a eliminação de Cu^{2+} também levou à esterificação dos carboxilatos, tornando necessária a hidrólise destes para a obtenção de cloreto de ácido via cloreto de oxalila.

3.1.4.2 - Obtenção de derivados amino-amida de clorofilina

A trimetóxiclorofilina foi hidrolisada com $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ para a obtenção dos carboxilato, sendo adotado um protocolo análogo àquele já descrito para a rota III com protoporfirina IX.



Esquema 19: Rota sintética de obtenção dos novos fotossensibilizadores porfirínicos derivado de Cu^{2+} -clorofilina

As carboxilas foram transformadas em cloreto de ácido com cloreto de oxalila. Em seguida, efetuou-se uma substituição do Cl por 3-Dimetilamino-1-propilamina para obtenção de ChlNpNA, que foi metilada com CH_3I para formação do quaternário ChlNpNI. Os

compostos foram purificados de forma análoga aos derivados de Protoporfirina IX. Após a formação das funcionalidades amidas, foi efetuada uma partição em tampão fosfato pH = 9/diclorometano para uma pré-purificação. A fase orgânica foi concentrada por destilação rotacional a pressão reduzida e o sólido foi purificado em coluna cromatográfica com alumina básica com fase estacionária e diclorometano/metanol 20:1 como eluente para a obtenção de ChlNpNA. Este composto foi caracterizado por espectroscopia eletrônica (UV-vis e fluorescência), vibracional infravermelho (FTIR), espectrométrica de massa, usando a técnica de *spray* de elétrons para a ionização e RMN a 500 MHz. Os espectros de ^1H e ^{13}C foram determinados usando as técnicas unidimensional e bidimensional (COSY e HETCOR) as quais foram inspecionadas pelos *softwares* MestRe-C (versão 5.0)

ChlNpNA

ChlNpNA é um composto novo, que foi sintetizado e purificado de forma análoga ao seu similar derivado de Pp IX (PpNpNA). A caracterização foi realizada mediante o espectro eletrônico (UV-vis e fluorescência) vibracional no infravermelho, RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY e HETCOR).

O composto apresenta a banda *soret* em 400 nm, posição característica das porfirinas. A última banda Q_{IV} é a segunda mais intensa e está centrada em 651 nm, o espectro de emissão fluorescente apresenta um máximo em 657 nm. Uma discussão mais detalhada do espectro eletrônico será apresentada nos tópicos 3.2.2.1 e 3.2.2.2.

No espectro de massa, o sinal correspondente ao íon molecular apresenta baixa intensidade sendo prejudicado pelo limite de detecção. Contudo, o sinal base em 649,7 m/z foi

atribuído a fragmentação na posição α de dois dos grupos inserido e à desmetilação das aminas do terceiro grupo.

O Espetro de IV de ChlNpNA apresenta banda de estiramento axial para as acarbonilas em 1661 cm^{-1} , caracterizando a formação de amidas, visto que o espectro IV referente ao precursor Cu^{2+} -Clorofilina, apresenta este estiramento para os carboxilatos em 1563 cm^{-1} .

No espectro de ^1H foram registrados três sinais na região de aromático com δ em 10,09; 9,67 e 8,77 ppm, os quais foram atribuídos aos ^1H mesos da clorofilina, respectivamente, às posições 10, 20 e 5 do anel porfirínico. O grupo vinílico exocíclico da posição 3^1 - 3^2 foi registrado em δ 7,99 ppm para o ^1H da posição 3^1 , e em δ 6,46-6,36 ppm para os dois ^1H da posição 3^2 . Estes deslocamentos foram confirmados através da correlação ^1H - ^1H (espectro 2D COSY). O sinal em δ 4,09 ppm foi atribuído aos hidrogênios da posição 15^1 . Os ^1H das posições 17^1 e 17^2 foram determinados em δ 4,07 e 3,58 ppm. Estes também foram comprovados através dos seus acoplamentos no espectro COSY. As metilas das posições 2^1 , 7^1 e 12^1 aparecem com sinais sobrepostos na região de δ 3,37-3,27 ppm. Também foram determinados os sinais referentes os ^1H dos grupos inseridos. Os sinais com δ de 2,99-2,86 ppm foram determinados para os ^1H α à carbonila. Os sinais centrados em δ 2,40 ppm foram atribuídos aos das posições γ em relação às carbonilas. Na região de δ 2,131-2,132 ppm foram determinados os sinais referentes às metilas dos três grupos funcionais aminas. Os sinais com δ de 1,64-1,62 ppm foram atribuídos aos ^1H das posições β em relação à carbonila. Determinou-se, ainda, um triplete em δ 1,56 ppm referente à metila da posição 8^2 . Os ^1H endocíclicos dos anéis pirrólicos se encontram em δ -2,3 ppm.

O espectro de ^{13}C apresenta três sinais em δ 191,65; 185,04 e 173,35 atribuídos, respectivamente, às carbonilas das posições 13, 15 e 17. Também foram determinados os

sinais referentes aos ^{13}C dos grupos inseridos, que estão distribuídos em três grupos com δ de 31,08 para a posição α à carbonila, 29,89 para a posição β e em 58,45; 58,32 e 58,13 para as posições γ à carbonila. Os sinais referentes às metilas das aminas terciárias foram determinados de forma quantitativa em δ de 45,45-44,98. Esta atribuição comprova que a molécula foi triplamente funcionalizada e apresenta um excelente grau de pureza. Ademais, também foram determinados com precisão outros sinais referentes ao composto de partida.

A estrutura apresenta espectros de RMN com alto grau de complexidade. As atribuições foram viabilizadas por inspeção com *software* Mestre-C (versão 5.0) e comparadas com os deslocamentos de estruturas similares apresentados na literatura⁴⁶. As atribuições foram determinadas utilizando-se as técnicas 1D ^1H e ^{13}C e 2D (COSY e HETCOR). Ambos os espectros são bastante complexos (^1H e ^{13}C). Uma determinação mais precisa do espectro de ^{13}C está limitada pela solubilidade, devido à dimensão da molécula, torna-se necessária a utilização de quantidades superiores de massa, as quais levam à saturação do solvente formando estados agregados e filmes nas paredes do tubo. O espectro de ^1H - que aparenta ser de mais fácil aquisição - também torna-se bastante complexo, principalmente na região de 4 a 2 ppm. Esta complexidade ocorre, principalmente, devido à tri funcionalização da molécula com 3-dimetilamino-1-propilamina nas carbonilas das posições 13¹, 15² e 17³. Esta funcionalização originou grupos funcionais similares, mas não equivalentes, que se sobrepõe, impossibilitando a inspeção da multiplicidade e determinação das curvas de integração. Outro fator que contribui para complexidade do espectro diz respeito à possível formação de auto-agregados, que causam deslocamentos e alargamentos dos sinais, deformando a multiplicidade. No entanto, as técnicas utilizadas se mostraram suficientes e precisas na caracterização.

ChlNpNI

O fotossensibilizador porfirínico catiônico ChlNpNI foi obtido por metilação das aminas terciárias de ChlNpNA com excesso de iodometano em diclorometano. Por tratar-se de um novo fotossensibilizador, sua estrutura foi devidamente caracterizada através do espectro eletrônico (UV-vis e fluorescência), de espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , usando técnicas 1D e 2D (COSY e HETCOR) e espectrometria de massa.

O espectro UV-vis apresenta curva espectral similar a seu precursor. Na emissão fluorescente foi observado um máximo em 652 nm. Uma discussão mais detalhada do espectro eletrônico será apresentada nos tópicos 3.2.2.1 e 3.2.2.2.

O espectro no infravermelho apresenta banda de estiramento axial para as carbonilas dos grupos funcionais amidas em 1657 cm^{-1} e uma banda larga muito intensa, que se estende de 3600 a 3000 cm^{-1} , que foi atribuída à água devido às propriedades higroscópicas do composto.

No espectro de massa o sinal referente ao íon molecular está dentro dos limites de detecção. No entanto foi registrado um sinal em 1021 m/z referente a perda dos três contra-íons (Γ).

O espectro de RMN de ^1H e ^{13}C a 500 MHz foi determinado em DMSO. Para o espectro de ^1H foram registrados os sinais em δ 9,35; 9,02 e 8,408 ppm, atribuídos aos ^1H mesos das posições 10, 5 e 20. Os vinílicos das posições 3^1 e 3^2 foram determinados em δ 8,14-8,08 e 6,12-6,08 ppm, respectivamente. Já os grupos inseridos na clorofilina foram determinados δ 3,09-3,07; 2,90-2,77 e 2,06-1,78 ppm respectivos às posições α , γ e β às carbonilas. As nove metilas dos quaternários foram determinadas em δ de 3,39. Uma atribuição completa do espectro de ^1H foi apresentada na parte experimental e coincide com os

deslocamentos esperados para esta estrutura. O espectro de ^{13}C possibilita uma análise quantitativa a respeito dos grupos funcionais inseridos na molécula. Através de inspeção do espectro com *software* Mestre-C (versão 5.0), foram determinado os nove sinais referentes às metilas dos quaternários, todas com δ entre 52,49 e 52,30. Os demais sinais referentes aos grupos inseridos foram determinados em δ 63,55; 63,41 e 62,41 ppm para os ^{13}C nas posições γ às carbonilas, em δ 36,25; 35,50 e 34,20 ppm para as posições α e em δ 22,97; 22,11 e 19,36 ppm para as posições β às carbonilas. O espectro do composto quaternário também apresenta grau elevado de complexidade devido à sobreposição dos sinais. No entanto, este espectro apresenta uma resolução superior à do precursor (ChlNpNA).

Esta melhor resolução permitiu separação de alguns sinais similares, como os referentes às diferentes posições α , β e γ às carbonilas das amidas nas posições 13¹, 15² e 17³ que constam em trípticas no espectro de ^{13}C , confirmando a tri funcionalização da molécula. A melhor resolução do espectro de ChlNpNI em relação ao espectro de ChlNpNa foi atribuída a uma maior solubilidade do composto em DMSO e uma possível repulsão entre as cargas, reduzindo a possível auto-agregação.

4.2 - Propriedades Físicas e Fotofísicas

4.2.1 – Derivados de Protoporfirina IX. (Esquemas 14, 15 e 16)

4.2.1.1 - Espectros UV-visível e Coeficientes de Extinção Molar (ϵ).

O espectro UV-vis dos compostos foi obtido em metanol, e o ϵ foi determinado pela curva de absorbância *versus* concentração. Considerando-se que o deslocamento da banda *soret* esta em 400nm, característica de monômero destas porfirinas, e que o espectro de absorção foi realizado a baixas concentrações e em metanol, que é um ótimo solvente para estas porfirinas (com exceção da Pp IX e de um novo derivado fosfônico), considera-se que estas se encontram na forma de monômero, permitindo a determinação do ϵ para estes compostos. A exceção é o caso da PpNetPO₃, que apresenta grupo fosfônico carregado. Para este composto, a banda *soret*, que pode ser observada no espectro de absorção (Figura 9), está alargada, como esperado para a absorção de agregados. O valor obtido da inclinação da curva de absorção *versus* concentração desta porfirina apresenta valores bem inferiores às demais porfirinas. Considerando que esta deve estar agregada, este valor não pode ser usado para o cálculo do ϵ . Outros parâmetros calculados para esta porfirina, como rendimento de emissão de fluorescência e de geração de oxigênio singlete, são compatíveis com a interpretação de agregação em metanol (vide itens 3.2.1.2 e 3.2.1.4)

A análise dos espectros UV-vis, mostra que a adição de substituinte às duplas conjugadas ao anel porfirínico provoca um pequeno deslocamento hipsocrômico nas bandas *soret*. Isto foi evidenciado para todas as bandas de todos os compostos, nos quais a dupla conjugada ao anel foi eliminada. Os deslocamentos das bandas *soret*, estão destacados na figura 10 e os deslocamentos de todas as bandas estão descrito na tabela 4. Deslocamentos mais expressivos foram registrados na banda Q_{II}. Esta banda para protoporfirina IX, encontra-se em 538 nm, e para o produto de esterificação é deslocada para 536 nm. Já para os demais compostos, esta banda encontra-se com máximo em 532 nm.

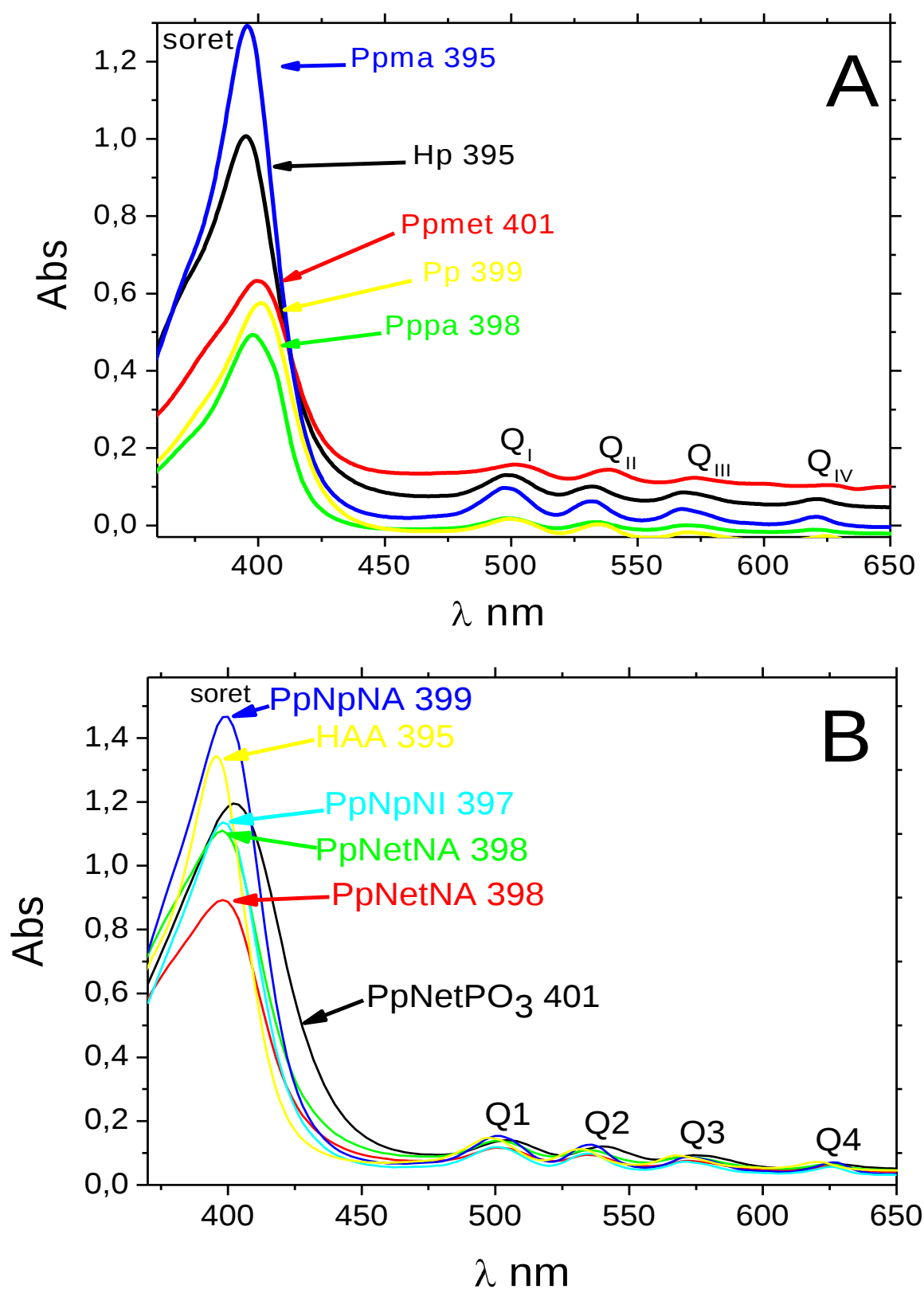


Figura 10: Espectros de absorção de Protoporfirina IX, Hematoporfirina IX e demais porfirinas derivadas da protoporfirina em solução metanólica. A) obtidos através da rota II B) obtidos através das rotas I e III.

Os espectros de absorção dos compostos com amina nas posições 3¹ e 8¹ (PpmA e PppA, Esquema 15) apresentam λ_{max} mais próximos ao espectro da hematoporfirina IX, visto que este também não apresentam insaturação conjugada com o anel porfirínico. A funcionalização nas posições 3¹ e 8¹ leva à alterações do ΔE entre o HOMO e o LUMO e deslocamentos das bandas no espectro eletrônico. Foi observado um deslocamento hipsocrômico sistemático e sutil (2 a 6 nm) para a banda *soret* de todos os compostos nos quais as duplas conjugadas foram eliminadas. Este deslocamento sistemático é mais significativo para a banda Q_{II}, que em Pp IX encontra-se em 538nm e em Ppmet em 536nm. Já nos demais compostos onde as duplas foram eliminadas, esta banda é encontrada em 532 mm. Estes dados indicam a ocorrência de alterações nos níveis de energia (HOMO e LUMO) causadas pela eliminação da conjugação do anel porfirínico com os grupos metilenos exocíclicos.

Os compostos obtidos por funcionalização das carbonilas (rota III), que estão funcionalizados com aminas terciárias ou amônio quaternário não apresentam variações do espectro de absorção determinado para Hp IX, como pode ser observado na figura 10 e na tabela 4. Este efeito foi observado tanto para a banda Soret, quanto para as bandas Qs. Já o composto fosfônico apresenta um pequeno deslocamento sistemático para o vermelho, sendo registrado em todas as bandas.

Tabela 4: Comprimento de onda e ϵ relacionados para todas as bandas de cada porfirina

Composto	Soret		Q1		Q2		Q3		Q4	
	λ	$\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ	$\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ	$\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ	$\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ	$\epsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Ppmet	401	$1,5 \times 10^5$	504	$1,0 \times 10^4$	540	$8,9 \times 10^3$	574	$6,3 \times 10^3$	630	$3,8 \times 10^3$
HAA	395	$1,2 \times 10^5$	497	$9,9 \times 10^3$	531	$8,8 \times 10^3$	567	$6,1 \times 10^3$	621	$3,5 \times 10^3$
Ppma	495	$1,4 \times 10^5$	498	$8,6 \times 10^3$	532	$5,3 \times 10^3$	567	$4,5 \times 10^3$	621	$2,2 \times 10^3$
Pppa	498	$9,7 \times 10^4$	499	$8,04 \times 10^3$	534	$4,9 \times 10^3$	568	$3,8 \times 10^3$	622	$2,0 \times 10^3$
PpNetNA	399	$9,7 \times 10^4$	500	$8,0 \times 10^3$	534	$4,9 \times 10^3$	572	$3,8 \times 10^3$	625	$2,0 \times 10^3$
PpNpNA	399	$1,0 \times 10^5$	500	$9,8 \times 10^3$	535	$9,5 \times 10^3$	572	$5,9 \times 10^3$	626	$3,0 \times 10^3$
PpNetNI	399	$1,3 \times 10^5$	500	$1,0 \times 10^4$	535	$9,6 \times 10^3$	570	$6,1 \times 10^3$	625	$3,2 \times 10^3$
PpNpNI	399	$9,9 \times 10^4$	500	$9,8 \times 10^3$	535	$9,4 \times 10^3$	571	$5,8 \times 10^3$	625	$3,0 \times 10^3$
*PpNetPO₃	401	$5,2 \times 10^4$	503	$4,3 \times 10^3$	540	$3,8 \times 10^3$	573	$2,7 \times 10^3$	627	$1,7 \times 10^3$

*Os Valores de ϵ para este composto não são considerados reais devido à agregação.

Para cada banda foi determinado o ϵ , o qual foi comparado com o ϵ correspondente do produto de esterificação da protoporfirina (Ppmet), determinado neste experimento e registrado na literatura¹⁶. Comparando-se os valores da tabela 4, observa-se que as variações estão dentro da mesma ordem de grandeza. Os compostos sintetizados apresentam ϵ semelhante para todas as bandas, observa-se apenas um decréscimo mais pronunciado para o composto fosfônico (PpNetPO₃), que também apresentou um deslocamento batocrômico e solubilidade reduzida. Todas as constantes determinadas estão apresentadas na tabela 4.

Estes resultados mostram que as alterações estruturais não levaram a mudanças significativas no cromóforo. Estes resultados são considerados positivos, visto que a funcionalização visava alterar a solubilidade, a partição em membranas e a citolocalização celular dos compostos sem alterar as propriedades fotofísicas.

4.2.1.2 - Espectro de Fluorescência e rendimento quântico

Os espectros de emissão de fluorescência (Fig. 10) foram determinados em solução metanólica. Foi observado que o HAA, assim como a Hp IX, apresentam algumas bandas de fluorescência, sendo duas mais intensas: a primeira de 565 a 590 nm com máximo em 557 nm e a segunda de 610 a 635 nm, com máximo em 621 nm. A presença da banda com máximo em 577nm deve estar relacionada com a perda da planaridade da estrutura do cromóforo devido à perda dos grupos vinílicos conjugados nas posições 3¹ e 8¹. Note que todos os compostos com grupo vinílico conjugado não apresentam esta banda.

Também foi realizado um estudo quantitativo da fluorescência de cada composto, dos quais foi calculado o rendimento quântico de fluorescência por comparação direta com a emissão de Hp IX, no mesmo solvente (metanol) e na mesma densidade óptica no λ de excitação (532 nm). Este composto foi tomado como referência por estar bem caracterizado e apresentar estrutura similar aos novos compostos.⁸⁹ Também foi tomado o azul de metileno como um segundo padrão de referência. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

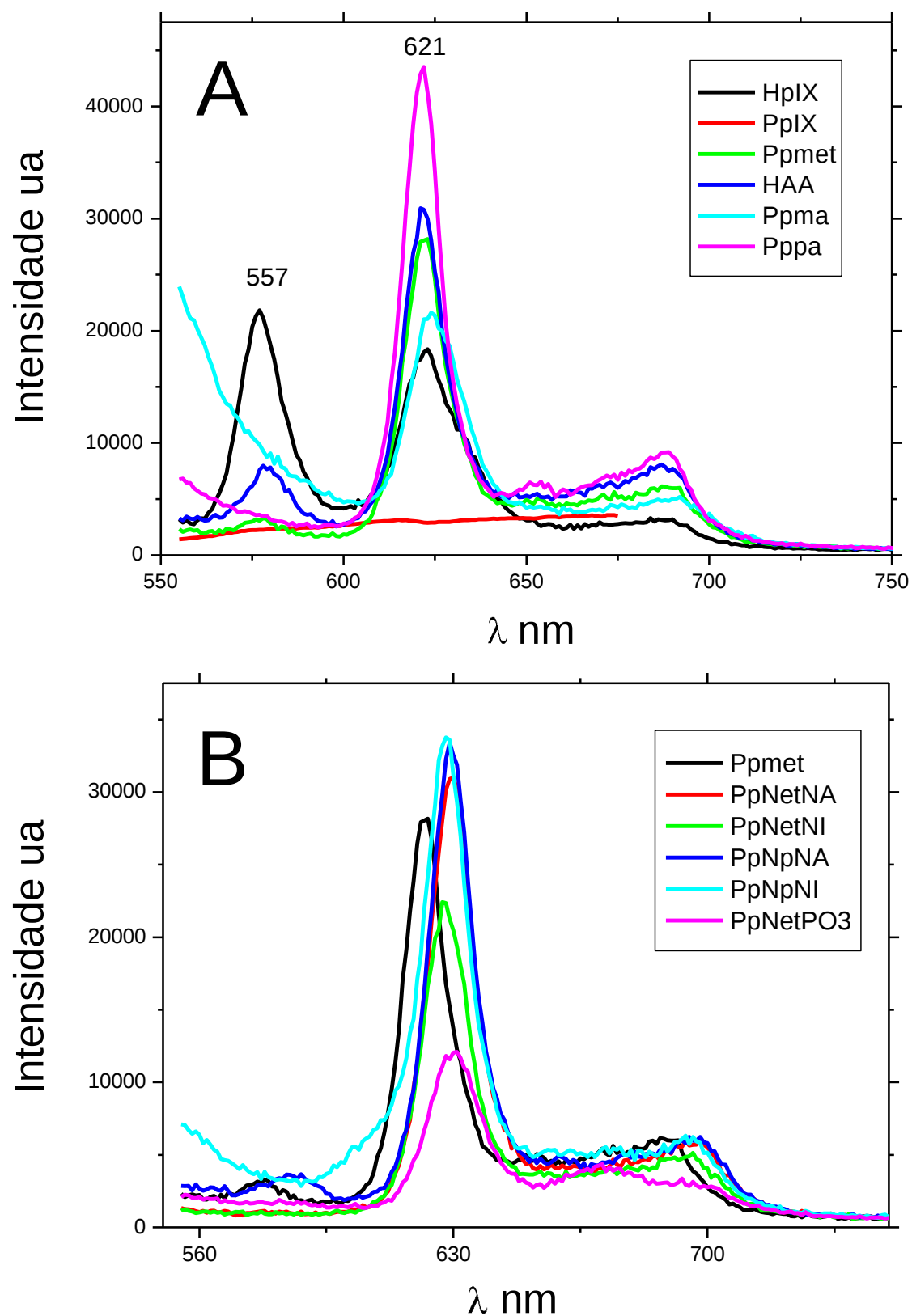


Figura 11: Espectros de fluorescência para o derivados de Pp IX, obtido por excitação em 532 nm, com fendas de 8 mm, em solução metanólica com absorbância de 0,04 em 532nm. A) composto das rotas I e II B) composto rota III

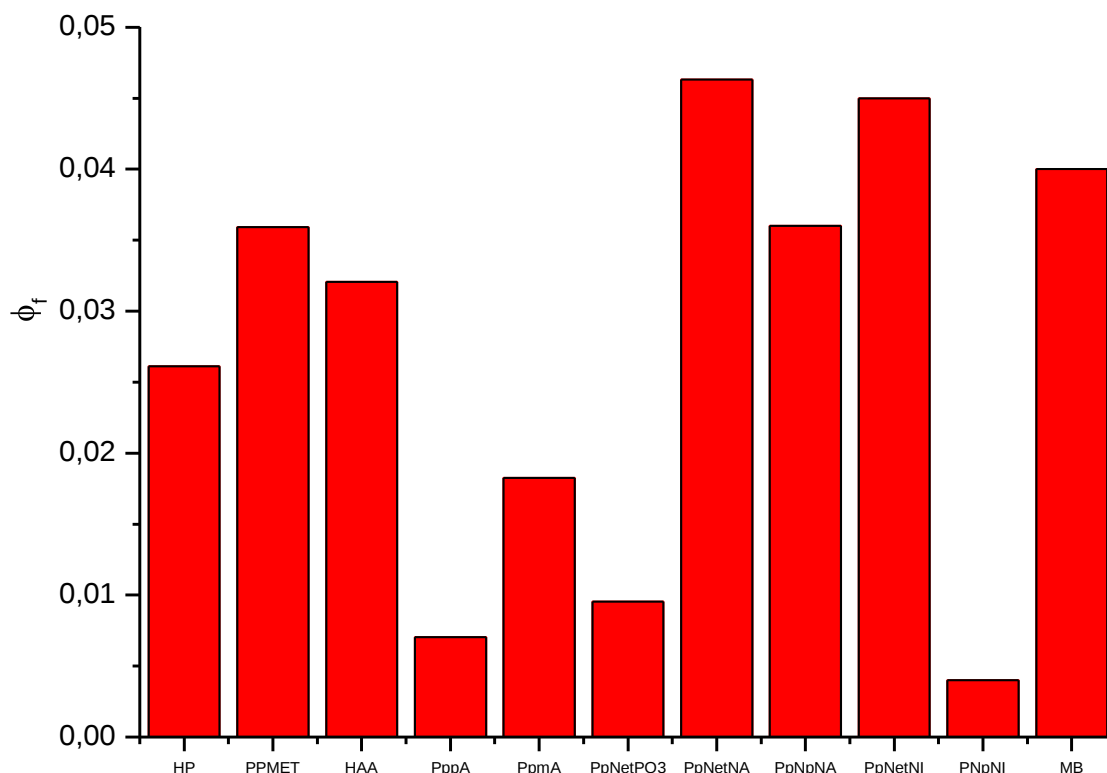


Figura 12: Rendimento quântico de fluorescência dos novos fotossensibilizadores derivados de Protoporfirina IX, obtido por excitação em 532 nm, com fendas de 8 mm, em solução metanólica com absorvância de 0,04 em 532 nm.

Pode-se observar que todos os compostos apresentam um baixo rendimento quântico de fluorescência (inferior a 5%). Este rendimento é similar ao da Hematoporfirina IX (Hp IX) e do azul de metileno (AM). No entanto, quando comparados entre si, os compostos com maior eficiência (PpNetNa e PpNetNI, que apresentam rendimentos de 0,046 e 0,044 respectivamente) são 10 vezes mais fluorescentes que o PpNetNI, que apresenta o menor eficiência entre os compostos ensaiados (0,004). A PpNetNI é diferenciada estruturalmente da anterior (PpNetNI) por apresentar um carbono a mais na cadeia do grupo funcional inserido.

4.2.1.3 - Estudo de Fotólise de Relâmpago a Laser

Para as porfirinas PpmA e PppA funcionalizadas em 3¹ e 8¹ foi realizado um estudo de caracterização do estado tripleto. A funcionalização poderia ter alterado, de forma significativa, as propriedades fotofísicas das moléculas, sendo importante a caracterização do

estado triplete. A caracterização do estado triplete foi determinada através do espectro de absorção do triplete-triplete resolvido no tempo (Fig. 13).

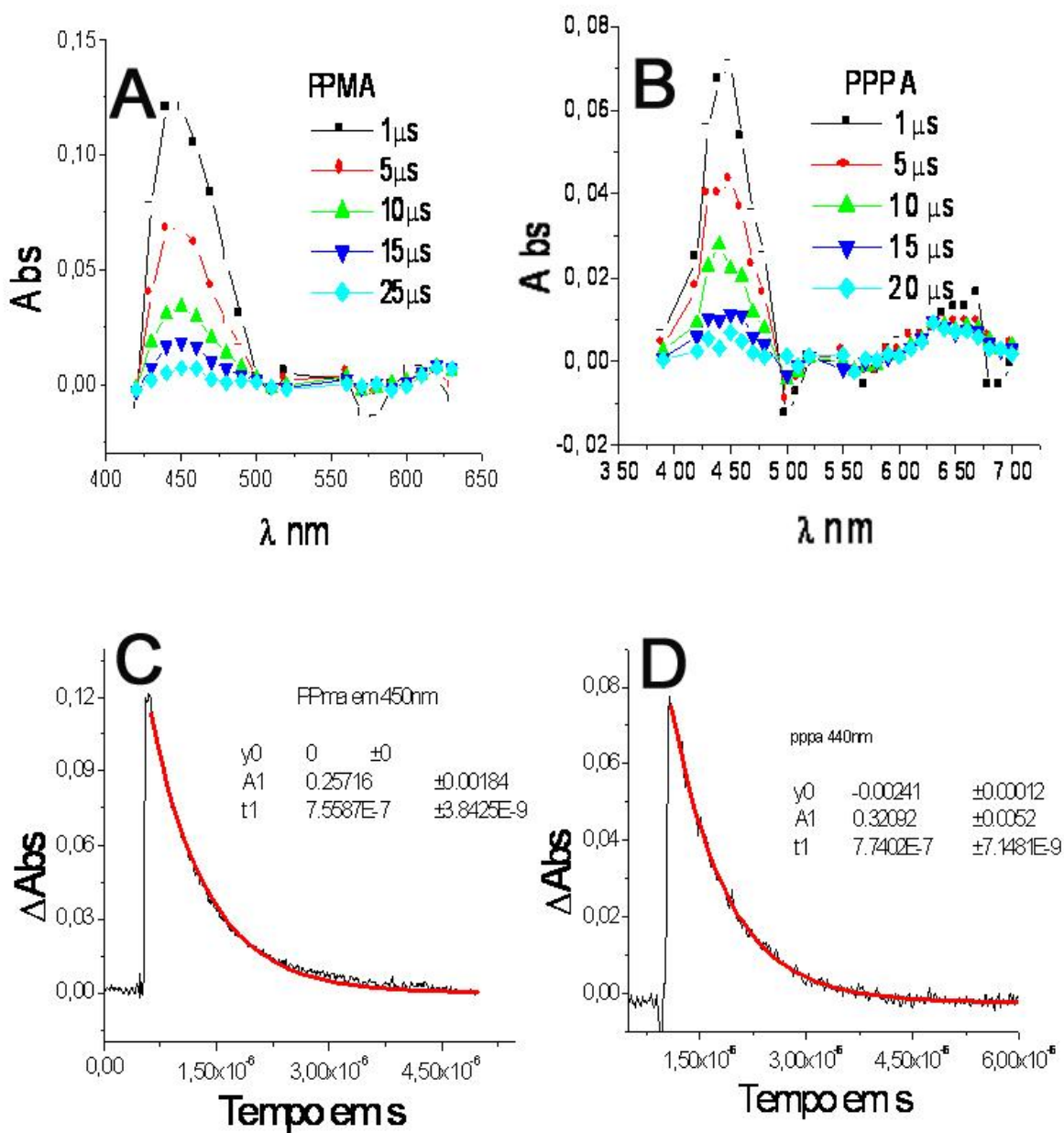


Figura 13: Espectro de absorção do triplete-triplete resolvido no tempo para os compostos sintetizados A)Ppma B)Pppa; Transiente do decaimento triplete C) Ppma D)Pppa, solução metanólica o saturada com O_2 . Excitado em 532 nm, 5mJ/pulso.

O espectro de transiente para ambas as porfirinas apresenta a absorção característica dos tripletes com λ_{max} em 450 nm e o tempo de vida obtido pelo ajuste monoexponencial é de 0,75 μs em solução saturada com ar. Pode-se observar que a absorção triplete-triplete é bastante semelhante ao apresentado por compostos similares.⁸⁹ Portanto, a eliminação dos vinílicos conjugados não apresenta alteração significativa no estado triplete destas moléculas. O tempo de vida de 0,75 μs é similar ao do triplete da hematoporfirina IX em solução metanólica e presença de ar.⁸⁹ Este tempo de vida é o esperado para a transferência de energia para o oxigênio molecular e levando à formação de oxigênio singlete.¹⁰⁰

4.2.1.4 - Emissão de oxigênio singlete

A determinação da emissão de $^1\text{O}_2$ foi realizada em soluções metanólicas. Para a quantificação, foi tomado como referência o oxigênio singlete gerado pela fotoexcitação da hematoporfirina IX.⁹⁰ Ambos transientes de emissão das amostras e do padrão, foram obtidos por excitação do composto nas mesmas condições experimentais (laser, densidade óptica, solvente e aberturas de fendas).

A geração do oxigênio singlete foi confirmada pela observação do seu espectro de emissão característico. A figura 14 mostra o espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado por PpNpNI. O espectro apresenta um máximo em 1270 nm característico de $^1\text{O}_2$. O tempo de vida da espécie ($^1\text{O}_2$) é outra forma de caracterização e foi determinado por ajuste exponencial da curva de decaimento figuras 14 e 15. O tempo de vida de $^1\text{O}_2$ para todos os decaimentos encontra-se entre 7 e 9 μs , característico de $^1\text{O}_2$ em metanol. Estes resultados oferecem uma caracterização inequívoca da espécie, que foi formada por transferência de energia do estado triplete destes compostos para o oxigênio molecular dissolvido na solução, mostrando que estes compostos atuam como fotossensibilizadores.

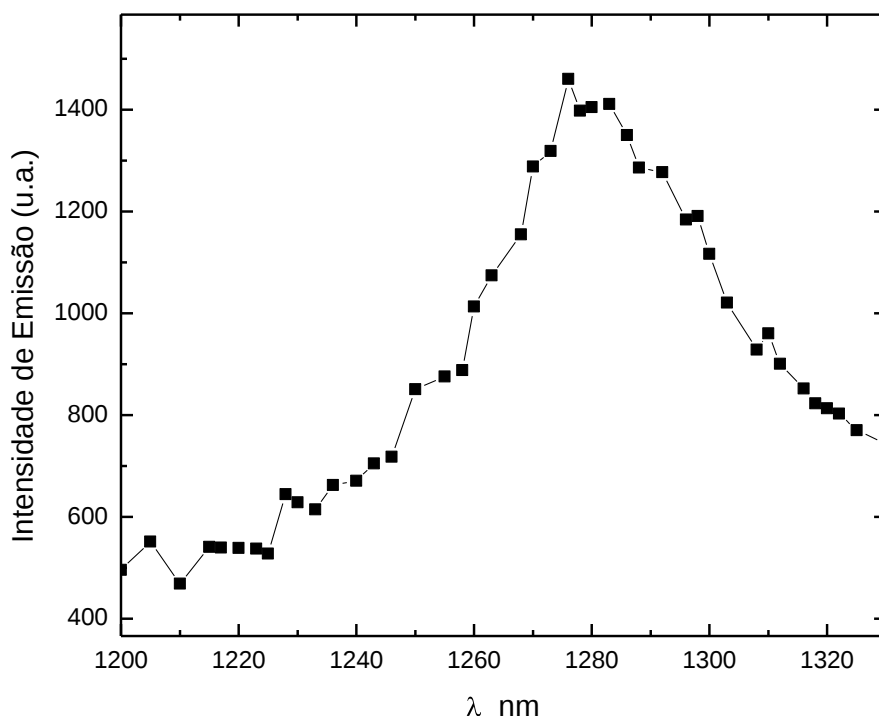


Figura 14: Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ obtido por excitação de solução metanólica de PppA excitado com laser em 532 nm 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo

A Figura 15 B ilustra a parte inicial do decaimento (próximo instante de excitação do laser) obtido numa escala de tempo reduzida (0,05 μs). Estes sinais foram usados para a determinação do rendimento quântico de formação do $^1\text{O}_2$ dos compostos. Os valores de rendimento quântico obtidos e os demais valores utilizados para determinação dos mesmos estão listados nas tabelas 5 e 6. Os resultados de emissão de $^1\text{O}_2$ são apresentados separadamente visto que foram obtidos por sistemas diferentes. Os compostos obtidos pelas rotas I e II são apresentados na tabela 5 e Figuras 14 (A e B). Já os compostos obtidos pela rota III são apresentados na tabela 6 e Figuras 15 (A e B).

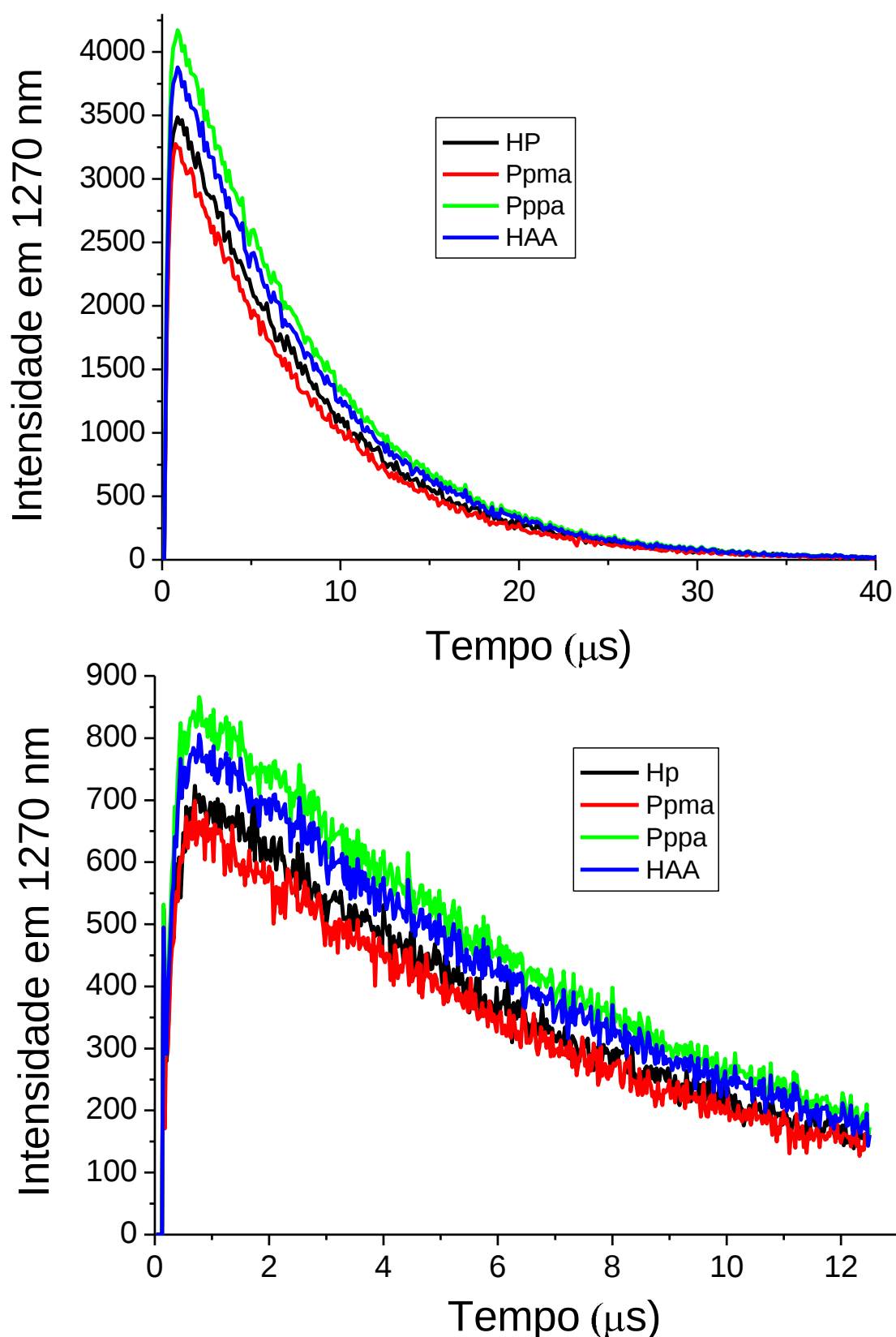


Figura 15: Transientes de decaimento da emissão $^1\text{O}_2$ a 1270 nm: A) janela temporal de 0.25 μs B) janela temporal de 0,05 μs. Obtido por excitação em 532 nm em solução com 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo

Tabela 5: Propriedades fotofísicas de derivados de Pp IX rotas I e II

Composto	Abs:532	Intensidade emissão em 1270 nm	ϕ_{Δ}
Hp IX	0,222	705	0.76
HAA	0,224	798	0.84
PpmA	0,227	667	0.73
PppA	0,222	788	0.83

A quantificação mostra que os novos fotossensibilizadores apresentam eficiência quântica de oxigênio singlete muito similar ao da Hp IX, evidenciam que a funcionalização em 3¹ e 8¹ não afetaram de forma significativa as propriedades fotoquímicas do cromóforo. Estes resultados já tinham sido indicados no estudo de absorção triplete-triplete realizado para os compostos PpmA e PppA. As variações no rendimento quântico dos novos fotossensibilizadores e do padrão (Hp IX) são muito similares não diferindo por mais que 10%.

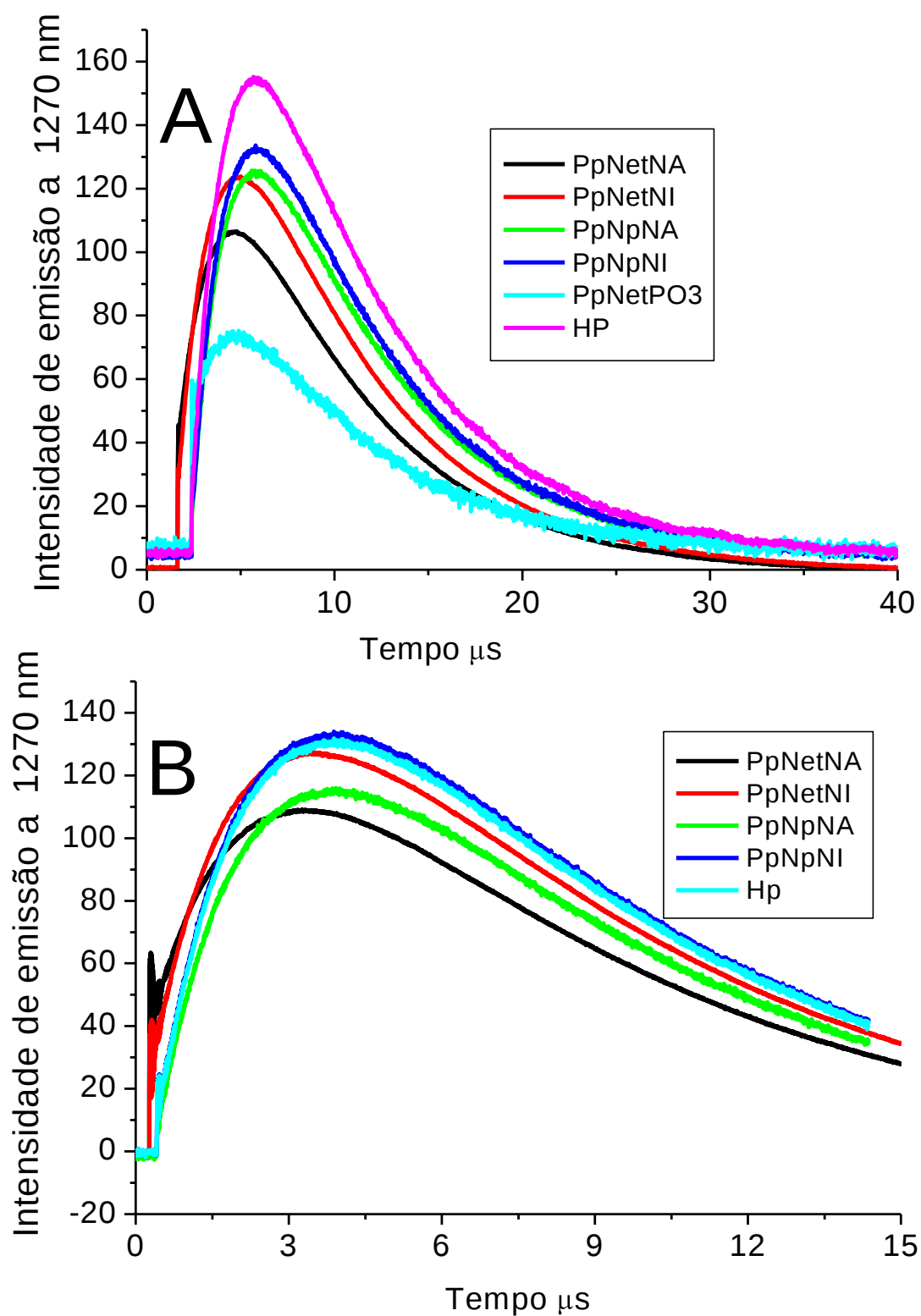


Figura 16: transiente de emissão a 1270 nm para os fotossensibilizadores derivados de Protoporfirina IX, obtidos pela rota III, por excitação em 532 nm em solução metanólica, com 5mJ/pulso, 10 pulsos/segundo A) Janela temporal de 0,25 μs B) Janela temporal de 0,05 μs .

Os resultados obtidos para os compostos da rota III são apresentados na tabela 6 e os transientes são expressos na Figura 16 (A e B). Com os decaimentos completos (Fig. 16A), pode-se calcular o tempo de vida das espécies. Na Figura 16B os transientes foram detectados apenas em tempo de decaimento inicial, a partir do qual foi determinada a intensidade de emissão para a quantificação. Os rendimentos quânticos obtidos, assim como, os valores de emissão utilizados na quantificação são apresentados na tabela 6

Tabela 6: Propriedades fotofísicas de derivados de Pp IX rotas III

Composto	Abs:532	Intensidade emissão em 1270 nm	ϕ_{Δ}
Hp IX	0,222	130.40	0.74
PpNetNA	0,224	108.61	0.61
PpNetNI	0,247	127.15	0.65
PpNpNA	0,222	114.88	0.65
PpNpNI	0,232	132.51	0.73
PpNelPO₃	0,227	66.89	0.38*

*Eficiência quântica de emissão de $^1\text{O}_2$

Todos esses derivados atuam como fotossensibilizadores formando $^1\text{O}_2$. O rendimento quântico de geração para os compostos com função amina e amônio quaternário é próximo do determinado para Hp IX. Já para o composto fosfônico, o valor foi reduzido em 50%. Este valor reduzido foi atribuído à formação de agregados, que já foi indicado para este composto no espectro UV-vis. Devido a essas considerações não é utilizado o termo rendimento

quântico para este composto, visto que tal rendimento só se aplica às substâncias puras. Portanto, para estes composto (PpNetPO₃) nos referimos como eficiência de emissão.

Alguns destes compostos já haviam sido sintetizados e os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singlete já foram estimados em D₂O. Os valores estabelecidos foram 0.64 para PpNetNI; 0.33 para PpNpNI; 0,19 para PpNpNA e 0,01 para PpNetNA.¹⁰¹ Nesta determinação não foi considerado o fator de agregação, comum aos compostos porfirínicos em solução aquosa. Nota-se que os dados publicados apresentam uma larga divergência entre os valores de rendimento estabelecido para a série de porfirinas e divergindo também dos resultados aqui estabelecido para os mesmos compostos em metanol, que apresentam rendimentos quânticos similares (tabelas 5 e 6). Os resultados aqui estabelecidos constam ser confiáveis uma vez que estes compostos não sofreram alterações no cromóforo como pode ser observado através das suas estruturas no Esquema 16, e através dos resultados experimentais apresentados neste trabalho nos itens 3.2.1.1(UV-vis e ϵ). 3.2.1.2 (Fluorescência e ϕ_f) e 3.2.1.3 (absorção trilete-triplete)

Embora a maioria dos compostos sintetizados esteja no estado monomérico em metanol (vide UV-vis), em solução aquosa isto não ocorre e a maioria destes compostos tende a se agregar. Desta forma, é importante estudar a agregação destes compostos em solução aquosa e as possíveis estratégias que diminuam sua agregação.

4.2.1.5 - Determinação dos agregados dos derivados de Protoporfirina IX obtidos pela rota III.

É sabido que as porfirinas podem sofrer interações atrativas entre as nuvens eletrônicas, uma vez que são planares e apresentam ampla nuvem π . Estas interações podem levar à formação de agregados. As porfirinas estudadas neste trabalho apresentaram várias evidências de formação de agregados, induzindo o alargamento e deslocamento dos sinais no espectro de RMN de ^1H , assim como nos espectro de absorção (UV-vis) na emissão de fluorescência e na diminuição da intensidade de emissão de oxigênio singlete em meio aquoso.

Os surfactantes e micelas têm potencial para alterar o balanço de forças que mantêm os agregados de fotossensibilizadores.⁸¹ Sendo assim, é interessante estudar o efeito da presença de micelas catiônicas (CTAB) e aniônicas (SDS) na possível agregação dos fotossensibilizadores.

Na determinação do estado de agregação foram utilizados, de forma comparativa, os espectros de absorção (UV-vis), fluorescência e espalhamento de luz ressonante^{57,61,102} Este estudo foi determinado para os compostos mais promissores, obtidos através da rota III, e para a hematoporfirina IX. De forma geral, foi observados que o tipo de interação esta relacionado com a carga do fotossensibilizador. Sendo assim, estes resultados foram apresentados de acordo com as cargas dos compostos: 1) Aniônicos, Hp IX e PpNetPO₃, apresentados na Figura 17; 2) Catiônicos, PpNetNI e PpNpNI (amônio quaternário), apresentados na Figura 18; 3) Compostos funcionalizados com aminas terciárias: PpNetNA e PpNpNA, (não carregados) estão apresentados na Figura 19.

No estudo por espectroscopia de absorção (UV-vis) o foco principal foi o deslocamento e alargamento da banda *soret*. Esta banda foi selecionada por apresentar um ϵ mais intenso e por ser mais sensível ao solvente.¹⁰³

Os espectros UV-vis dos compostos aniônicos em água apresentam bandas largas com perda da definição das bandas Q_s e decréscimo na intensidade de absorção (Fig. 17 A e B). Já o espectro UV-vis na presença de micelas de CTAB apresenta bandas mais intensas e bem definidas e de SDS apresentam intensidade intermediária entre as obtidas em água e em micelas de CTAB. Também foi observado deslocamento da banda *soret* para ambos compostos. A banda *soret* de PpNetPO₃ em CTAB encontra-se em 408 nm e em SDS em 405 nm, um deslocamento para o vermelho significativo considerando que o $\lambda_{\max}$ em água é 396 nm. A Hp IX apresenta deslocamento na mesma tendência, sendo que a banda *soret* em CTAB encontra-se em 399 nm, em SDS é deslocada para 396 nm e em água onde a banda foi determinada em 373 nm. O alargamento e deslocamento das bandas em água são compatíveis com uma intensa agregação. Os resultados com surfactantes sugerem que provavelmente estes são capazes de desagregar as porfirinas

Para os espectros de fluorescência (Fig. 17 C e D) foi observado um comportamento análogo, sendo verificada uma emissão de intensidade superior para os espectros obtidos em CTAB e em menor intensidade para os obtidos em SDS. Para solução aquosa não foi observada emissão fluorescente destes compostos nestas condições. Outro fator observado foi o deslocamento do máximo de emissão nos diferentes surfactantes. O composto fosfônico (PpNetPO₃) apresenta máximo de emissão em CTAB em 634 nm, sendo deslocado para 629 nm em SDS. A Hp IX apresenta máximo em 622 nm em CTAB, sendo deslocado para 616 nm em SDS. A ausência de emissão em água é compatível com a formação de agregados tipo H.^{55,56}

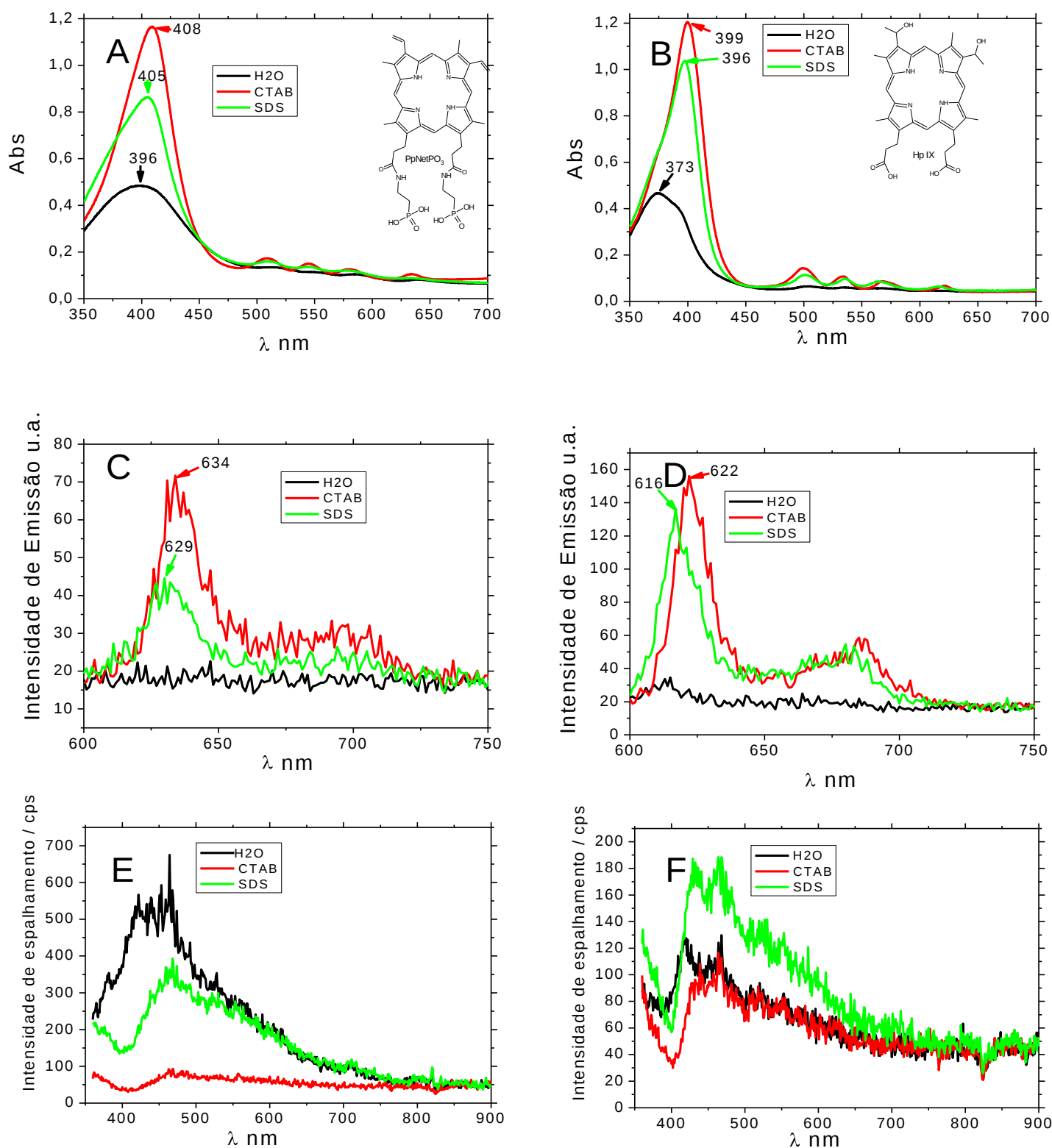


Figura 17: Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência excitados em 532 nm (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H₂O, CTAB e SDS para os compostos aniônicos PpNetPO₃ (A,C e E) e Hp IX (B, D e F)

O espalhamento de luz ressonante (Fig. 17 E e F) para o composto fosfônico é superior em solução aquosa, sendo seguido pelo espalhamento em SDS e praticamente nulo em CTAB. Já a Hp IX apresenta um espalhamento relativo em todas as soluções, sendo superior ao espalhamento em SDS, seguido pela solução aquosa e inferior em CTAB. Como mencionado anteriormente o sinal de espalhamento é proporcional à concentração e ao tamanho dos agregados. O fato de o espalhamento ressonante ser maior em água e decair na presença de micelas comprova as hipótese de agregação mencionadas. Portanto, no caso do PpNetPO₃, claramente os agregados são ausentes em micelas de CTAB e reduzidos nas micelas de SDS, quando comparado a intensidade de espalhamento com a intensidade em água.

Estes resultados mostram que os surfactantes alteram a relação das forças intermoleculares. Isto se dá pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre as micelas e compostos porfirínicos. No caso em que o composto e as micelas apresentem cargas opostas, estas forças são suficientemente intensas para superar a atração entre as nuvens π do anel porfirínico, levando à desagregação dos compostos e deslocando o equilíbrio no sentido de formação do monômero. Neste experimento, foi observado um maior fator de desagregação para o surfactante CTAB, visto que o sistema micelar deste surfactante apresenta forças hidrofóbicas e eletrostáticas com os compostos ensaiados, levando à formação de pares iônicos entre as micelas catiônicas e os compostos (Hp IX e PpNetPO₃) que são aniônicos.⁸¹

O surfactante SDS apresenta atividade relativamente inferior, visto que sua maior contribuição no fator de desagregação é através do efeito hidrofóbico entre a micela e a parte apolar da molécula. A influência das forças eletrostáticas está bem destacada através das diferenças nas intensidades dos espectros de absorção e emissão entre a solução em SDS e em CTAB.

Os espectros UV-vis para os compostos catiônicos (Fig. 18 A e B) também evidenciam a formação de auto-agregados em água e as bandas são mais intensas e definidas na presença de micelas de SDS seguido de CTAB. Em água as bandas mostram-se alargadas. Para PpNpNI foi observado que a intensidade das bandas em SDS e CTAB são similares, com uma mínima superioridade na intensidade em SDS. Ambas apresentam intensidade muito superior à determinada em água, sendo que todos os espectros foram determinados nas mesmas concentrações.

Por apresentarem cargas, estes compostos são relativamente hidrossolúveis, apresentando uma curva espectral com melhor definição para todas as bandas. A Figura 18 A mostra as posições da banda *soret* para PpNetNI. Esta banda encontra-se em 404 nm em SDS e em 400 nm em CTAB. Já para o espectro em água, esta banda apresenta um deslocamento superior, encontrando-se em 392 nm. Para PpNpNI foi observado que a banda *soret* apresenta o mesmo deslocamento para os espectros obtidos em ambos surfactantes (SDS e em CTAB) com definição esperada para espécies monoméricas com λ_{max} em 406 nm. Em água, esta banda está deslocada para 383 nm.

O espectro de fluorescência (Fig. 18 C e D) apresenta intensidade superior para ambos compostos na presença de micelas aniônicas (SDS) sendo determinada uma emissão de fluorescência menor na presença de micelas de CTAB. Em água, foi determinada uma emissão pequena para ambos compostos. Os deslocamentos das bandas de emissão não foram considerados significativos.

O espalhamento de luz ressonante (Fig 18. E e F) está presente em todas as amostras e as intensidades apresentam a mesma ordem para ambos os compostos: $\text{H}_2\text{O} > \text{CTAB} > \text{SDS}$. No entanto, todos os espectros são de pequena magnitude. Esta pequena magnitude é

indicativa de que os agregados presentes em água são de tamanho reduzido provavelmente dímeros ou trímeros.⁶¹

O surfactante mais efetivo para estabilizar o monômero foi o SDS (aniônico). Estes resultados condizem com o esperado, visto que a desagregação em sistema de micelas visa superar a atração entre as moléculas do soluto, que neste caso é devido à forte atração entre as nuvens π dos anéis porfirínicos, por uma atração de intensidade superior entre as moléculas do soluto com as micelas. Estas atrações com as micelas de SDS são tanto de natureza hidrofóbica quanto eletrostática. Já no surfactante CTAB, estes compostos são estabilizados somente pelas forças hidrofóbicas.

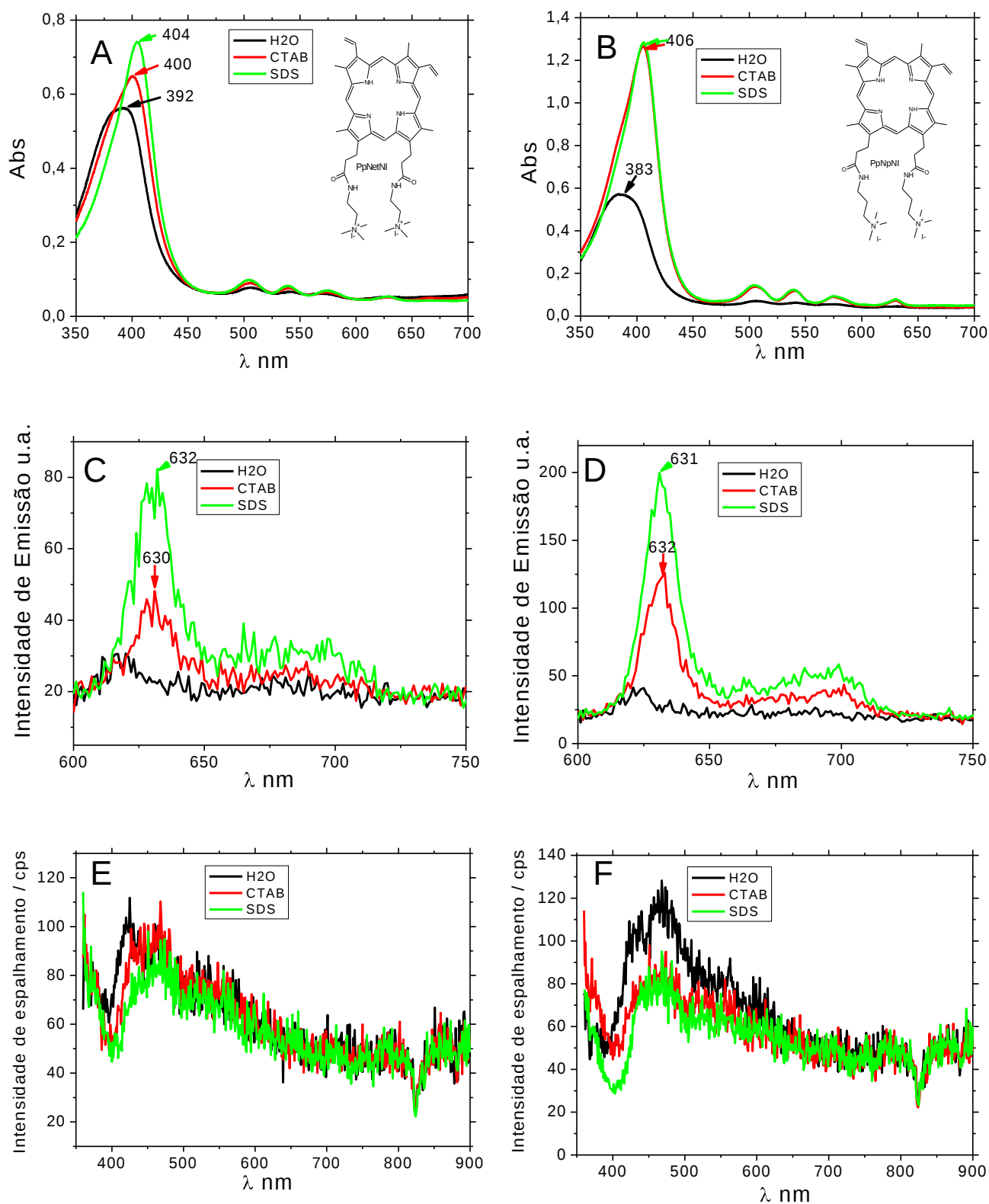


Figura 18: Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H₂O, CTAB e SDS para os compostos catiônicos PpNetNI (A, C e E) e PpNpNI (B, D e F)

Quando comparadas às desagregações dos dois compostos, observou-se que PpNetNI é mais facilmente desagregada por micelas de SDS. Já a PpNpNI, que apresenta um carbono a mais na cadeia alquílica, apresenta praticamente os mesmos fatores de desagregação em micelas de SDS e de CTAB para as mesmas concentrações de fotossensibilizador e de surfactantes utilizados. Esta diferença foi relacionada com o aumento da cadeia carbônica que, conseqüentemente, aumentadas forças hidrofóbicas. Neste caso, a contribuição do fator de desagregação pelas forças hidrofóbicas para PpNpNI é superior àquela observada para PpNetNI.

Para os compostos com amina livre a determinação do estado de agregação foi efetuada de forma análoga aos anteriores. Os espectros UV-vis (Fig. 19 A e B) em solução aquosa apresentam bandas alargadas e mal definidas. Na presença dos surfactantes, os compostos passam a apresentar espectros bem resolvidos com ótima definição das bandas. Os espectros obtidos em SDS e em CTAB apresentam intensidades de absorção similares. No entanto, as intensidades em SDS são superiores, mostrando que o surfactante aniônico tem maior contribuição na desagregação deste composto, deslocando o equilíbrio no sentido de formação do monômero de forma mais eficiente. Para PpNetNA pode-se observar que a banda *soret*, em SDS e em CTAB, está localizada para 405 nm. Em solução aquosa, esta banda foi deslocada em 10 nm, encontrando-se em 395 nm. A PpNpNA apresenta comportamento similar, com a banda *soret* em 406 nm para SDS, 405 nm para CTAB, e um deslocamento superior para a solução aquosa, sendo determinada esta banda em 394 nm.

Os compostos não apresentam fluorescência em solução aquosa, mas apresentam fluorescência mediana em CTAB e uma fluorescência de intensidade superior em SDS (Fig. 19 C e D), comprovando que o último tem melhor atuação no deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do monômero. As alterações na intensidade de emissão não podem ser explicadas pelas mudanças de absorção em 532 nm (comprimento de onda de excitação) uma

vez que as mesmas se mantiveram constantes em ambas as micelas. As posições das bandas não sofrem alterações significativas. Para a PpNetNA o máximo está localizado para ambas as soluções em 630 nm. Para a PpNpNA o máximo para SDS está em 631 nm e em CTAB em 632 nm.

Ambos compostos apresentam espalhamento de luz ressonante de mesma magnitude (Fig. 18 E e F) para as três soluções determinadas. Para a PpNetNA os espalhamentos são de intensidades muito próximas. Já a PpNpNA apresenta intensidade ELR próxima na presença dos surfactantes, e um ELR de intensidade superior para a solução aquosa. O único espectro de ELR que é característico de tamanho de agregado maior do que dímero é o espectro de PpNpNA em água, este resultado é compatível com sua maior hidrofobicidade.

Analisando os resultados de forma conjunta, foi observado que o espectro UV-vis apresenta uma melhor definição das bandas, um aumento de intensidade e um deslocamento batocrômico significativo para a banda *soret* na presença dos surfactantes em relação aos resultados obtidos para os mesmos compostos em solução aquosa. Isto mostra que estes compostos encontram-se agregados em solução aquosa e que na presença de micelas altera, de forma bastante significativa, o equilíbrio agregado-monômero, favorecendo a formação do monômero, sendo a atuação do SDS mais eficiente para este grupo de compostos. A desagregação e a maior eficiência do SDS foram confirmadas através da emissão fluorescente, visto que a solução contendo micelas deste surfactante apresenta maior intensidade de emissão. Este resultado confirma o observado nos espectros UV-vis, tanto no que se refere à desagregação na presença dos surfactantes quanto no tocante à superioridade do SDS como agente de desagregação

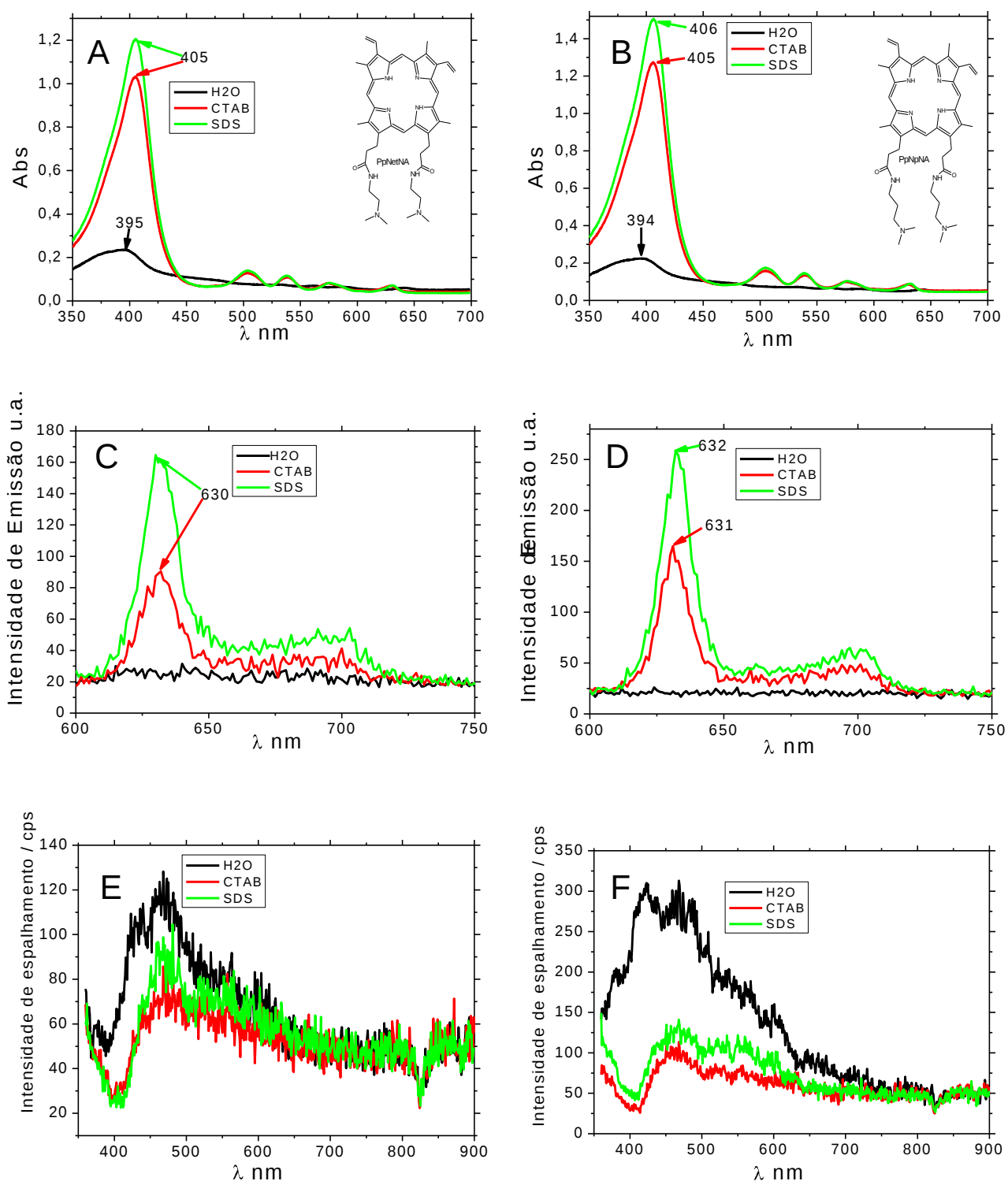


Figura 19: Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F). Todos obtidos em H₂O, CTAB e SDS para os compostos Neutros PpNetNA (A, C e E) e PpNpNA (B, D e F)

Em análise geral, foi determinado que os compostos porfirínicos estudados, quando dissolvidos em solução aquosa, estão agregados. Este resultado é condizente com aqueles já conhecidos, que atribuem esta propriedade à maioria dos macrocíclicos aromáticos, tais como porfirinas^{56,57,60}, fenotiazínicos^{81,104} e triarilmetanos.^{23,105} A auto-agregação ocorre, principalmente, em soluções concentradas ou em solventes onde o composto apresenta baixa solubilidade, ou seja, a auto-agregação está relacionada com a saturação da solução pelo monômero e, simultaneamente, a existências de forças atrativas entre moléculas do soluto, conduzindo à formação de dímeros, trímeros e formas oligoméricas. As forças atrativas que conduzem à auto-agregação dos poliaromáticos são, principalmente, as interações σ - π para interações laterais e face-lateral em forma de T e interações com faces paralelas deslocadas.

No entanto, os macrocíclicos aromáticos também apresentam forças repulsivas, por exemplo, as interações π - π para compostos que venham a formar agregados com faces paralelas. Estas forças atuam no sentido de impedir a auto-agregação. A inserção de cargas iônicas nas proximidades da nuvem eletrônica aumenta as forças repulsivas e minimiza a auto-agregação.

Uma relação entre a hidrofobicidade e as forças repulsivas parece estar presente nos compostos catiônicos, visto que o composto com cadeia alquílica maior (PpNpNA) apresenta maior agregação em água e é igualmente desagregado em micelas de SDS e CTAB, mostrando que a natureza da carga existente nas micelas não apresenta contribuição significativa para alterar o equilíbrio monômero-agregado, e que, o aumento da hidrofobicidade e que a desagregação é causada pela diminuição do efeito hidrofóbico no ambiente micelar. Como é extensamente documentado na literatura, a auto-agregação altera as propriedades físicas, físico-químicas e fotofísicas das moléculas.^{54,55,56} Este fator foi observado pelo ELR determinado para todos os compostos em solução aquosa. A formação de auto-agregados aumenta os níveis vibracionais, viabilizando o decaimento através destes,

reduzindo o rendimento quântico de fluorescência, como observado para Hp IX, PpNetNI e PpNetNI, ou eliminando a fluorescência, como ocorrido com os compostos PpNetPO₃, PpNetNA e PpNetNA.

As alterações das propriedades fotofísicas causadas pela auto-agregação, está bem evidenciada nos espectros UV-vis, nos quais foi observado um alargamento das bandas devido ao aumento dos níveis vibracionais e a uma redução da absorção, visto que os agregados apresentam menor secção de choques. Estes fatos foram evidenciados para todos os compostos em solução aquosa. Também foi observado, para solução aquosa, que todos os compostos apresentam deslocamento da banda *soret* para o azul. Este deslocamento mostra que ocorre um aumento da diferença de energia entre o HOMO e o LUMO, indicando que estes são conduzidos à agregação com faces paralelas (tipo H).

A formação de agregados também altera as propriedades fotodinâmicas dos fotossensibilizadores, podendo reduzir de forma significativa a pequena eficiência de oxigênio singlete. Este último fator foi relacionado com baixo Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (0.38) de PpNetPO₃ e condizente com a agregação. No entanto, sistemas fisiológicos, são bastante complexos, contendo, entre outras biomoléculas, aminoácidos e proteínas, que podem também alterar a composição de forças que estabilizam espécies monoméricas ou agregadas. Uma simulação do sistema fisiológico pode ser o meio de cultivo celular (DMEM) utilizado no cultivo de células HeLa, que foram utilizadas na determinação da citotoxicidade e fotocitotoxicidade destes compostos. Entre os constituintes do DMEM está albumina, componente do soro fetal bovino, adicionado ao meio de cultivo e a varias outras biomoléculas (aminoácidos, proteínas, sais,...) constituintes do meio. Com o intuito de estimar a influência do meio de cultivo na auto-agregação destes compostos, foi realizado um estudo comparativo do espectro de absorção UV-vis em meio de cultivo e em solução aquosa.

Determinação do estado de agregação em meio de cultivo celular (DMEM)

Uma vez que foi bem caracterizada a auto-agregação em meio aquoso, foi determinado o espectro UV-vis destes compostos em meio de cultivo celular e comparados com os espectros obtidos para estes compostos em água (Fig.20).

A figura 20 apresenta os espectros UV-vis de todos os compostos. Foi observado um deslocamento batocrômico da banda *soret* em relação ao composto em solução aquosa, mostrando que em meio de cultivo celular, o equilíbrio monômero-agregado é afetado, favorecendo a formação do monômero. Este deslocamento de equilíbrio que é bem menor do que aquele observado nas micelas é provavelmente devido à interação com proteínas do meio^{23,24,79}. Portanto, ocorre um favorecimento das propriedades fotodinâmicas destes fotossensibilizadores em sistema fisiológico, minimizando os efeitos causados pela tendência à auto-agregação, familiar nos compostos porfirínicos.

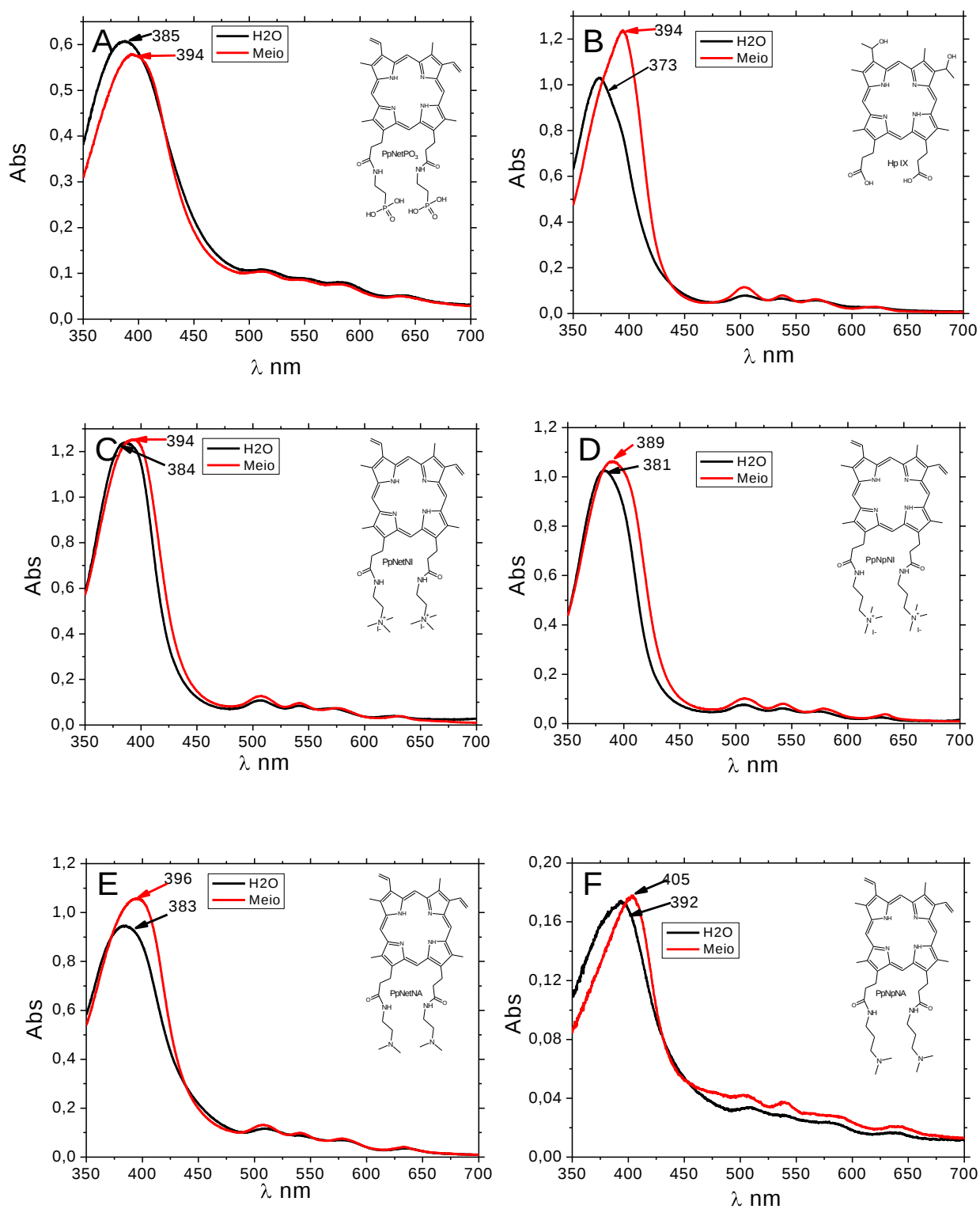


Figura 20: Espectros de UV-vis em solução aquosa e em meio de cultivo celular (DMEN) para os compostos derivados de Pp IX obtidos pela rota III.

4.2.1.6 - Coeficiente de Partição 1-octanol/água

O coeficiente de partição 1-octanol/água é um parâmetro físico-químico utilizado para estimar a afinidade de moléculas por uma membrana celular. A partição 1-octanol/água (Po/a) foi determinada em função do *pH*, visando entender a partição em diferentes valores de *pH*, visto que estes apresentam grupos funcionais que podem estar protonados e não protonados. Os resultados estão apresentados na Figura 22. O estudo também foi realizado com hematoporfirina IX, a qual serve como parâmetro para os novos compostos.

O composto de referência Hematoporfirina IX (Hp) é solúvel em ambos solventes (1-octanol e água) em todos os *pHs* testados, de 1 a 10. Sua maior solubilidade em 1-octanol ocorre em *pH* 5. Já a maior solubilidade em água ocorreu nos *pHs* extremos 1 e 10. Esta solubilidade foi respectivamente atribuída à protonação do anel porfirínico em *pHs* 1 e 2, e à ionização completa dos carboxílicos em *pH* maior que 8. Também foi observada uma nova curva espectral para fração aquosa, com deslocamento da banda *Soret* de 400 nm para 397 nm e uma nova banda em 550 nm, nas soluções de *pH* 1 a 5. O deslocamento da banda *Soret* evidencia que nestes *pHs* está favorecida a formação do estado agregado tipo H. A intensidade da banda em 550 nm é inversamente proporcional ao *pH*. Esta nova banda é atribuída à protonação do anel porfirínico¹⁰⁶

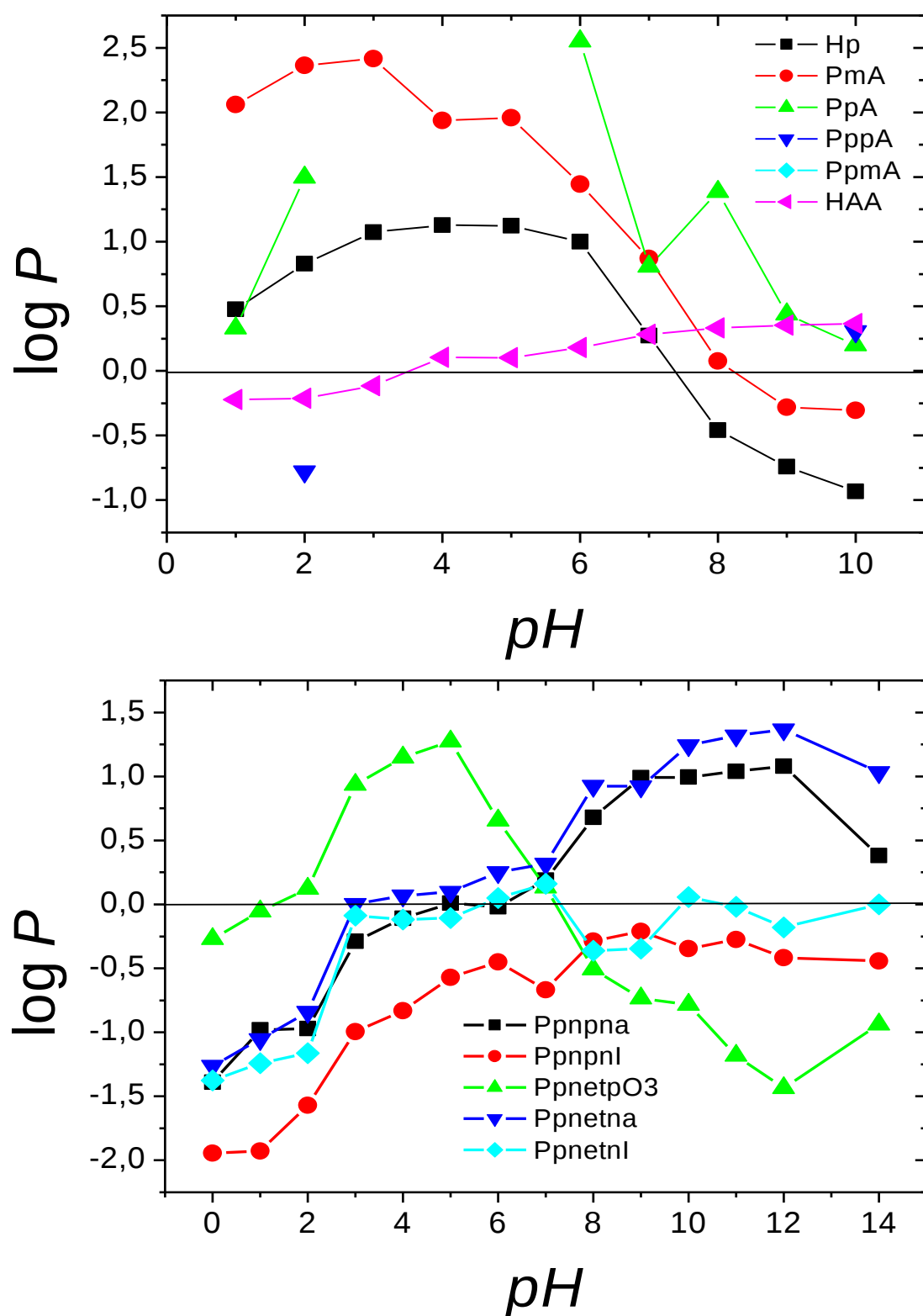


Figura 21: $\log P_{o/a}$ para os novos fotossensibilizadores porfirínicos derivados de Pp IX em função do pH: A) compostos obtidos pelas rotas I e II B) Compostos obtidos pela rota III

O composto obtido pela rota 1 (HAA) apresenta $\log P_{o/a}$ próximo de zero, ou seja, particiona em 1-octanol e em água em todos pHs testados, sendo mais solúvel em água em pHs menores que 5 e, acima disto, apresenta maior solubilidade em 1-octanol pelo maior caráter lipofílico devido a presenças das amins das posições 3¹ e 8¹ desprotonadas.

Dentre as porfirinas produzidas pela rota II, apenas os compostos carboxilados (PMA e PPA) apresentam uma partição favorável. Já os produtos de esterificação destes são insolúveis em água em praticamente toda a faixa de *pH* ensaiada. Já os compostos obtidos pela rota III apresentam alta solubilidade em ambos solventes (1-octanol e água) em todos os *pHs* ensaiados 0-14.

Os compostos catiônicos (Fig. 21) apresentam $\log P_{o/a} \leq 0$, com boa solubilidade na fase lipofílica, e solubilidade ligeiramente superior na fase aquosa. Esta relação lipofílica/hidrofílica é considerada excelente, visto que estes compostos têm estabilidade tanto em meio aquoso quanto em membranas, podendo atravessar membranas. Além disso membranas biológicas apresentam geralmente cargas negativas, de tal forma que a carga positiva deve ser favorável para ligação em membranas.⁷³

Os compostos amins também apresentam excelente $\log P_{o/a}$, aproximadamente igual a zero entre os *pH* =3 e *pH*=7, apresentando aumento da lipossolubilidade em meio básico, onde os grupos amins se encontram desprotonados. Estas características são consideradas favoráveis para aplicações biológicas em meio ácido ou neutro, visto que estes em $pH \leq 7$ se apresentam parcialmente protonados. Já o composto fosfônico se apresenta protonado em meio ácido e desprotonado em meio básico. Por isso, sua curva de solubilidade é inversa às curvas das amins. Para este composto, o $\log P_{o/a}$ é negativo para meios básicos. A melhor relação lipo/hido solúvel para aplicação em TFD foi considerada entre os pHs 6-8, que é a faixa de pH de cultivo das células HeLa, usadas para determinação de fotocitotoxicidade.

Todos os compostos ensaiados apresentam uma hidrossolubilidade muito superior à Protoporfirina IX (precursor) e Hematoporfirina IX (Fig. 22). Os compostos ensaiados apresentam caráter anfifílico em todos os pHs, em especial em pH fisiológico ($\text{pH} \cong 7$). Compostos anfifílicos apresentam atividade fotodinâmica melhorada, e podem ligar-se em lipoproteínas sanguíneas, que funcionam como ótimos carreadores para alguns tipos de tumores.^{2,6,66,72}

4.2.1.7 - Incorporação em lipossomos em função do pH

A incorporação em lipossomo foi utilizada como modelo para avaliar o grau de incorporação dos novos fotossensibilizadores em membranas biológicas e em mitocôndrias. Esta organela tem carga negativa, com o potencial de -180mV .¹⁰⁷ Este estudo foi realizado para todos os novos fotossensibilizadores que apresentaram $\log P_{o/a}$ favoráveis. Os ensaios de incorporação foram realizados em $\text{pH}=4$, tampão acetato, $\text{pH}=7,2$; em meio de cultivo celular, e em $\text{pH}=10$, tampão fosfato.

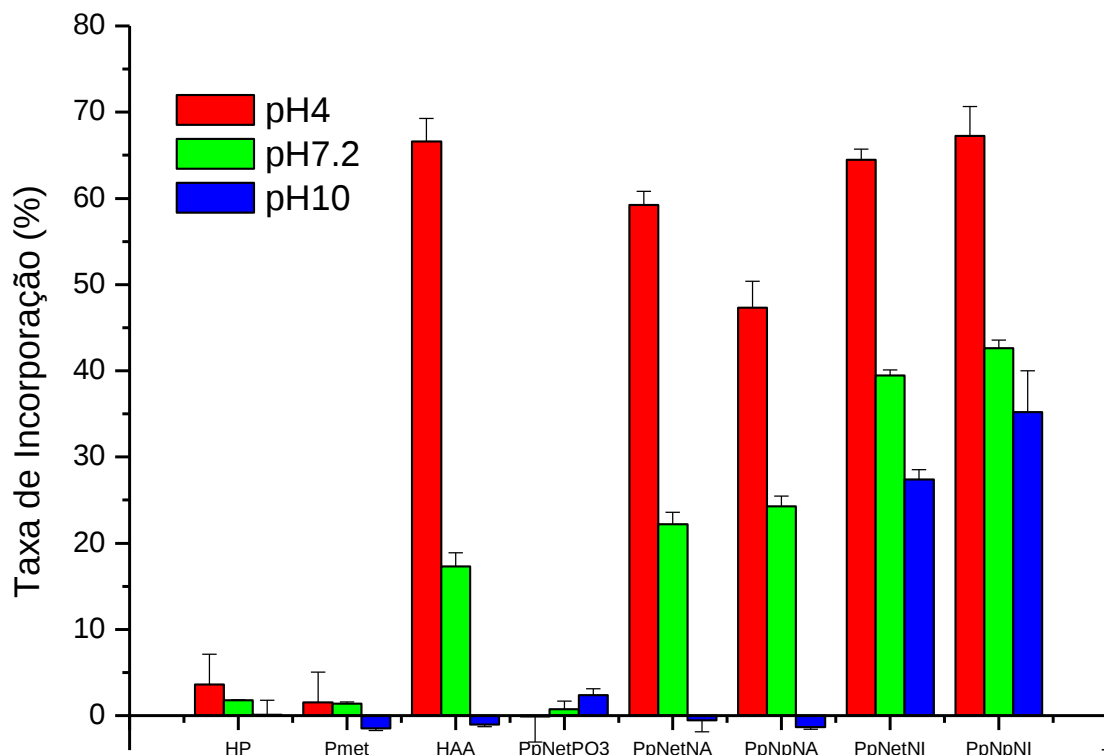


Figura 22: Taxa de incorporação dos novos fotossensibilizadores (20 μM), em lipossomos aniônicos de fosfatidil glicerol (1mg/mL)

Foi observado que a taxa de incorporação para todos os fotossensibilizadores que contenham os grupos funcionais amina ou amônio quaternário são muito superiores aos demais. Em meio ácido (pH=4), foi observada uma taxa de incorporação muito superior para os fotossensibilizadores que apresentam os grupos amina ou amônio quaternário. Em pH=7,2 a taxa de incorporação também é relativamente elevada tanto para os fotossensibilizadores com grupos amina, quanto para o amônio quaternário, sendo maior para o último.

Em meio básico, não ocorre incorporação dos compostos com grupos funcionais amina. Ocorre uma pequena taxa de incorporação para o composto fosfônico que é aniônico. Esta incorporação é muito similar à incorporação da Hp IX. Já para os compostos quaternários foi observada uma alta taxa de incorporação.

Pode-se perceber que a magnitude de incorporação está relacionada com a atração eletrostática, visto que a maior taxa de incorporação foi observada para os compostos de amônios quaternários e aminas em pH ácido. Este fato se torna mais evidente em pH=7,2 onde apenas parte dos grupos aminas estão protonados e, portanto, a incorporação das aminas é inferior à incorporação dos quaternários. A diferença também foi observada em meio básico, no qual apenas os quaternários se destacam por apresentarem cargas permanentes. Desta forma, foi verificada uma grande influência da atração eletrostática. A presença de cargas torna a molécula anfifílica (uma parte hidrofílica e outra lipofílica) o que aumenta a incorporação destes compostos em membranas⁷². O fato de esta interação ser favorável com vesículas negativas sugere uma possível interação preferencial com mitocôndrias (a interação com mitocôndrias será discutido na seção 4.3).

4.2.2 - Propriedades Físicas e fotofísicas dos derivados de clorofilina

4.2.2.1 - Espectros visível e Coeficientes de extinção molar (ϵ).

Os espectros UV-vis dos derivados da clorofilina e o espectro do composto de partida Cu-clorofilina estão apresentados na figura 23. Os espectros dos derivados sintéticos apresentam o mesmo perfil do espectro da clorofilina tri-esterificada (as estruturas dos novos fotossensibilizadores estão apresentadas no Esquema 19).

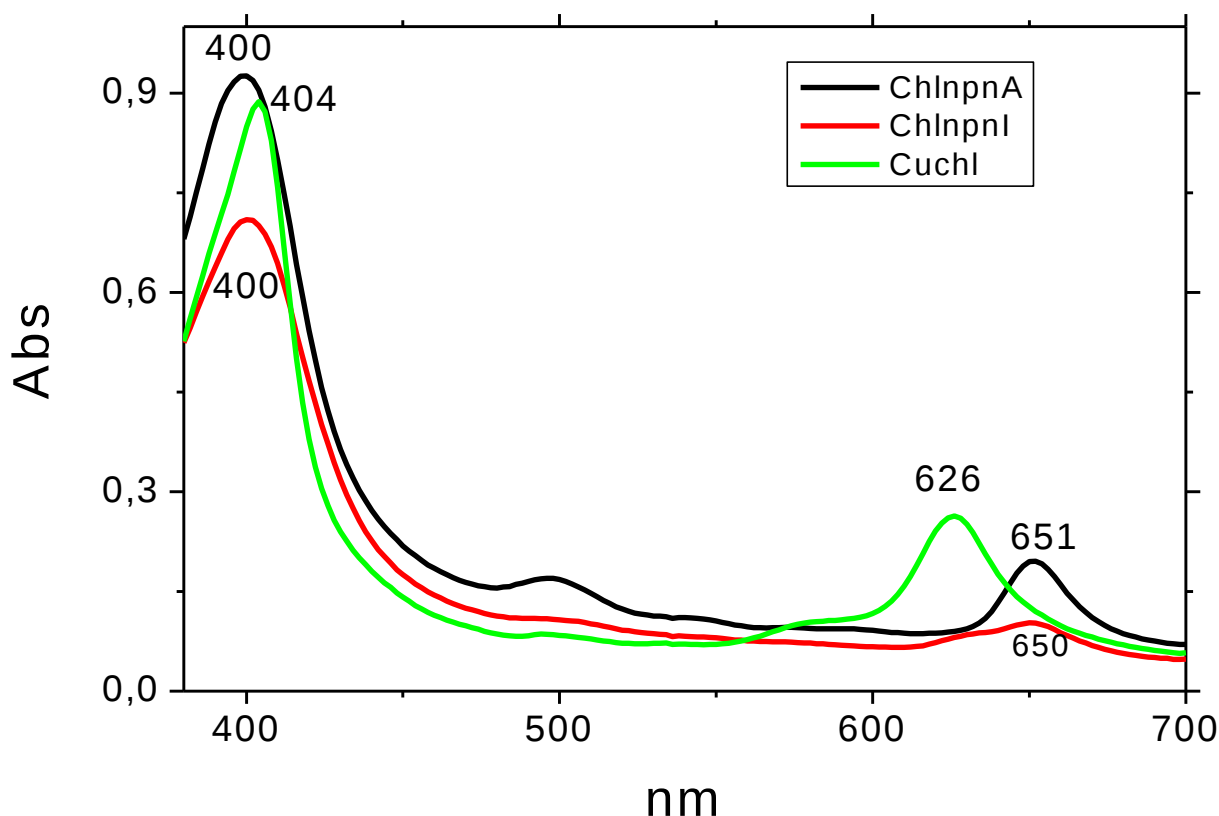


Figura 23: Espectros de absorção em metanol de Cu^{2+} -clorofilina, ChlnpnA e ChlnpnI

Quando comparamos os espectros UV-vis dos novos compostos foram comparados com o espectro do composto de partida (Cu^{2+} -clorofilina), verifica-se podemos observar um deslocamento para o azul da banda *soret*, que na CuChl encontrava-se em 404nm e nos derivados ChlnpnA e ChlnpnI encontra-se em 400 nm. Os compostos desmetalados apresentam uma nova banda em 496 nm e a diminuição da banda em 580 nm da Cu-clorofilina. A banda de 625 nm de Cu-clorofilina foi deslocada para 651 nm em ChlnpnA e 650 nm em ChlnpnI. Estes deslocamentos são atribuídos à eliminação do metal como já discutido anteriormente.

O deslocamento de todas as bandas mostra que a influência do íon Cu^{2+} é estendida à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, fator evidenciado pelo deslocamento da banda *soret*, que é referente a esta transição. Como esperado, a influência é mais pronunciada sobre as bandas Qs, decorrente das

transições $n \rightarrow \pi^*$, que são bastante afetadas pela coordenação, visto que Cu^{2+} está coordenado através dos elétrons n dos nitrogênios com os orbitais d vazios do íon metálico. A eliminação do íon diminui, de forma significativa, a energia de transição referente à última banda Q, causando um deslocamento de 25 nm. Não foi observado deslocamento nos espectros relacionados a funcionalização do composto (tabela 7). A absorbância destes compostos na janela terapêutica podem possibilitar que sejam utilizadas em TFD.

As intensidades das bandas Qs apresentam as seguintes ordens: $Q_{IV} > Q_I > Q_{II} > Q_{III}$, sendo que as bandas Q_{II} e Q_{III} são quase imperceptíveis. A banda Q_{IV} , esta centrada em 651 nm. O espectro de emissão fluorescente apresenta um máximo de decaimento em 657 nm sendo observado para esta molécula um deslocamento de Stokes de 6 nm. Os coeficientes de extinção molar foram determinados nas duas principais bandas, a *soret*, de 400 nm, e a banda Q mais deslocada ao vermelho.

Tabela 7: Comprimento de onda e ϵ para os novos fotossensibilizadores

	Soret (λ)	ϵ	Q_{IV}	ϵ
CuChl	404	48293	626	7192
ChlnpnA	400	20825	651	3797
ChlnpnI	400	19736	650	3584
triesterclorofilina	400	20121	650	3612

A eliminação do íon Cu^{2+} leva a um decréscimo no coeficiente de extinção molar dos compostos. Este decréscimo é de 56% para a banda *soret* de ChlnpnA e de 59% para ChlnpnI. Para a banda Q_{IV} é observada a mesma tendência nas mesmas proporções. Estes valores estão coerentes com a literatura.¹⁶

4.2.2.2 - Espectro de fluorescência e rendimento quântico.

O espectro de fluorescência (Figura 24) foi determinado por excitação em 532 nm, conforme processo descrito na parte experimental. O composto catiônico apresenta máximo em 652 nm e o composto com função amina apresenta seu máximo deslocado para o vermelho em 657 nm. Este deslocamento pode estar relacionado com as interações intermoleculares, que alteram a energia do primeiro estado vibracional do estado excitado. Outro fato interessante de ser mencionado é que o precursor Cu^{2+} -Clorofilina não apresenta fluorescência devido ao decaimento não radiativo do estado excitado através dos níveis vibracionais dos orbitais *d* vazios.⁵¹

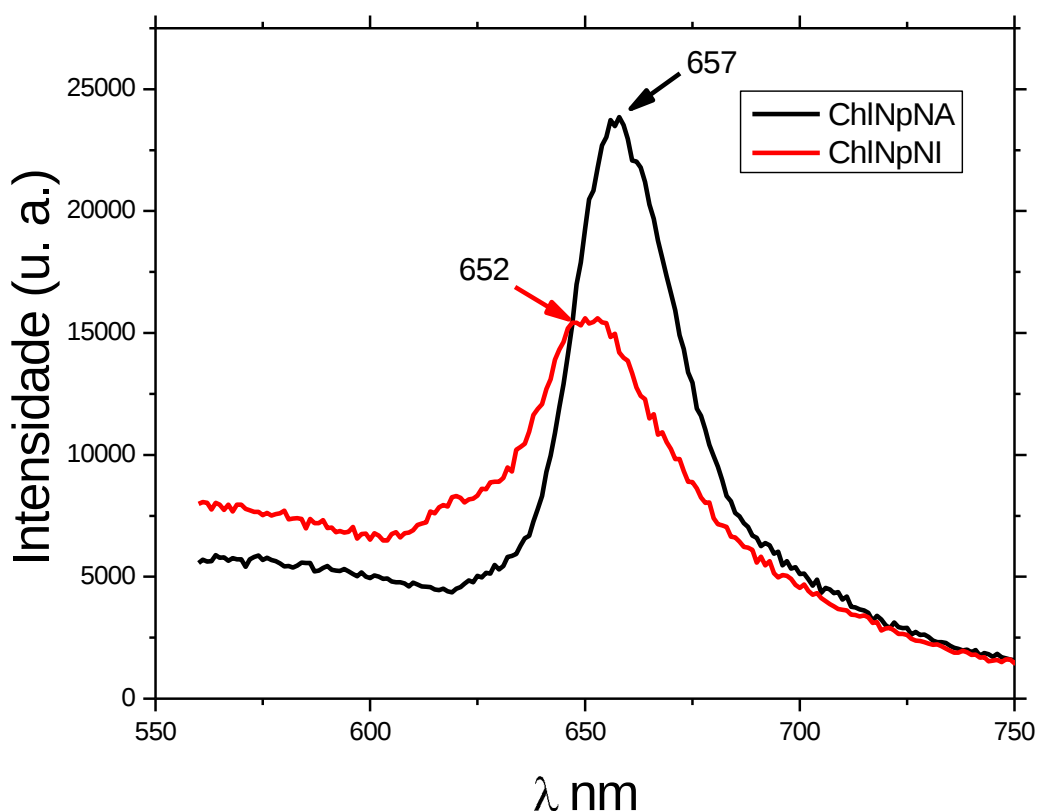


Figura 24: Espectros de fluorescência em metanol para ChlNpNA e ChlNpNI, excitados em 532 nm com fendas de 8 mm e Abs de 0,04 em 532 nm

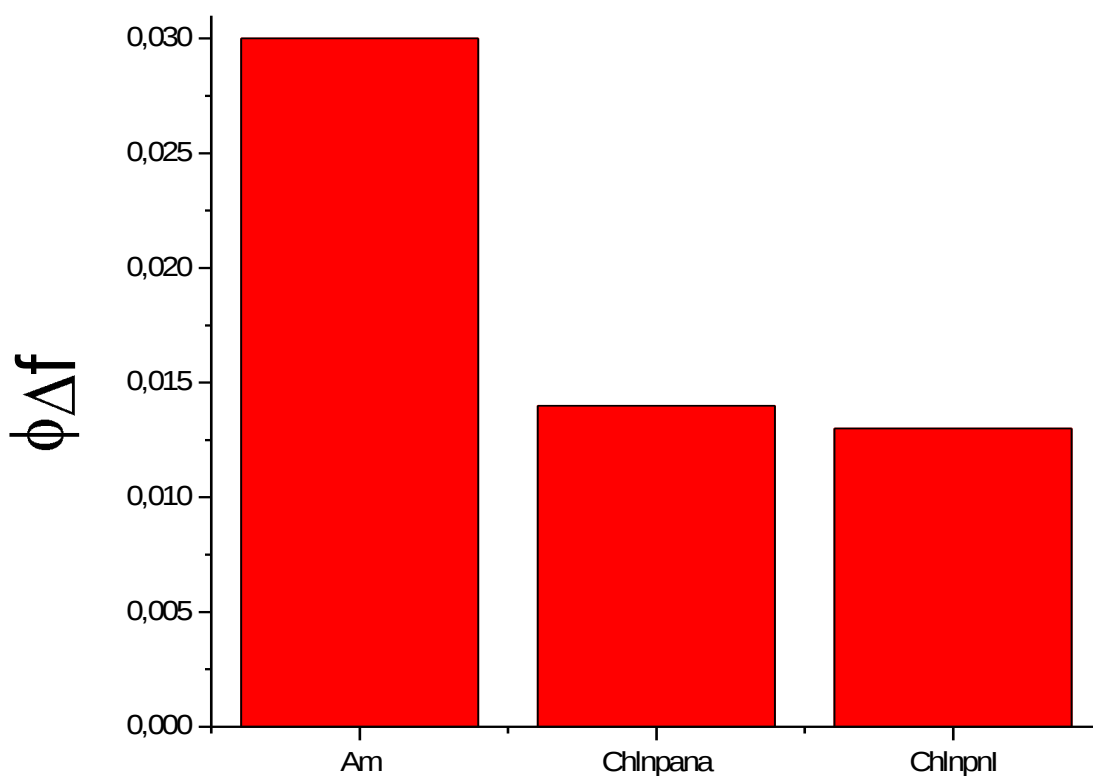


Figura 25: Rendimento quântico de fluorescência para o azul de metileno (Am) e para os dois novos fotossensibilizadores derivados de clorofila, Chlnpna e Chlnpni

Para a determinação da magnitude da desativação do estado excitado por emissão fluorescente, foi realizado um estudo quantitativo determinando o rendimento quântico (Fig. 25). Ambos os compostos apresentam fluorescência com rendimento quântico de 1,4% e 1,3% para Chlnpna e Chlnpni, respectivamente.

4.2.2.3 – Geração e rendimento quântico de oxigênio singleto.

A emissão de oxigênio singleto foi determinada através do espectro de emissão obtido em solução metanólica dos derivados de clorofilina (Chlnpna, Fig.26). O espectro apresenta máximo em 1270 nm, caracterizando a emissão desta espécie de oxigênio singleto. Espectros semelhantes de oxigênio singleto foram obtidos através fotoexcitação de Chlnpni.

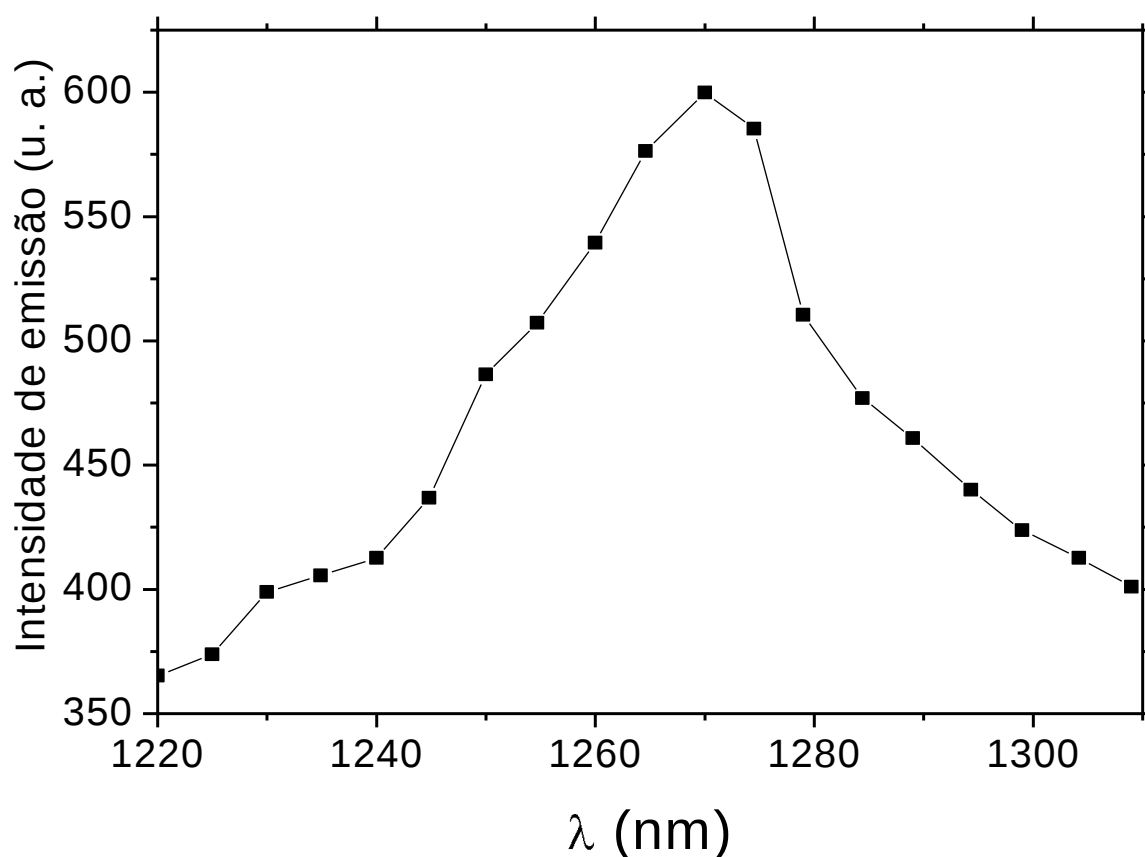


Figura 26: Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ obtido por excitação de solução metanólica de ChlNpNA, excitado com laser em 532 nm, com 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo. E Absorbância de 0,2 em 532 nm

A caracterização da emissão de $^1\text{O}_2$ foi também efetuada através da avaliação do decaimento exponencial dos transientes, no qual foi determinado o tempo de vida de $\approx 8\mu\text{s}$, que é característico do oxigênio singlete em metanol. Os transientes foram determinados em duas escalas de tempo: uma escala longa, sendo determinado todo o decaimento (Fig. 27 A), permitindo calcular o tempo de vida da espécie; e uma escala reduzida (Fig. 27 B), sendo determinado apenas o decaimento inicial para a quantificação da intensidade de emissão no tempo zero (algumas dezenas de nanosegundos depois do pulso de laser). A quantificação foi realizada por comparação da intensidade do transiente emitido por Hp IX, adotada como padrão de referência, com a intensidade de emissão dos transientes emitidos pelos novos fotossensibilizadores (Fig. 27 B). Todos os transientes foram obtidos no mesmo solvente

(metanol) e nas mesmas condições experimentais (aberturas de fendas). Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 26 A e B e listados na tabela 8, sendo de 0,58 para ChlNpNA e 0,57 para ChlNpNI. Estes resultados mostram uma excelente eficiência quântica de oxigênio singlete para estas moléculas, sendo comparável ao da Hp IX (0,76).⁹⁰

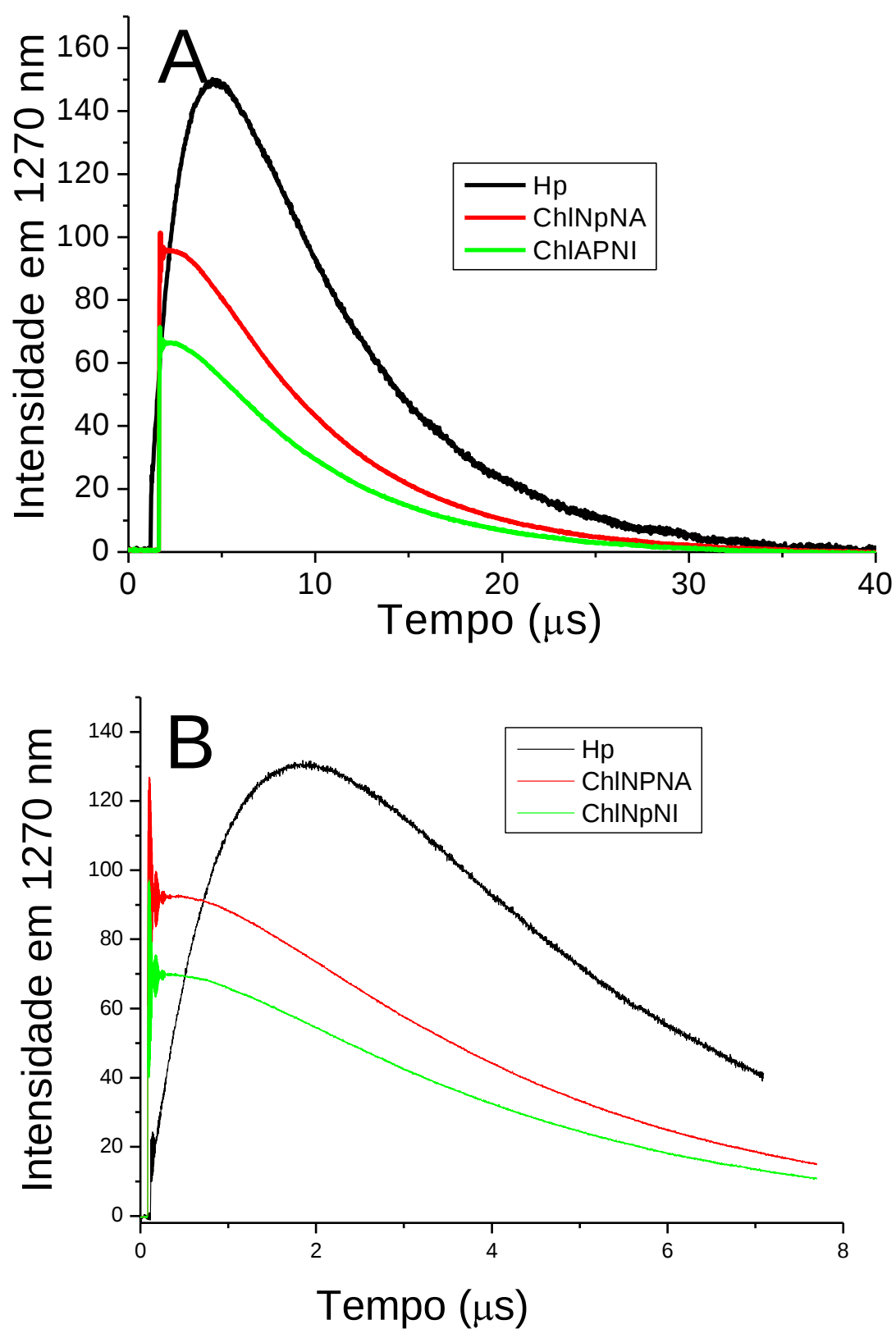


Figura 27: Transientes de emissão de oxigênio singlete emitidos por Hp IX, ChlNpNA e ChlNpNI em metanol. A) Janela temporal de 0,25 μs B) Janela temporal de 0,05 μs . excitados em 532 nm.

Tabela 8: Propriedades fotofísicas de derivados de Clorofilina

Composto	Abs:532	Intensidade	ϕ_{Δ}
Hp IX	0,220	130,29	0,74
ChlNpNA	0,203	92,55	0,57
ChlNpNI	0,180	79,72	0,56

Os novos compostos atuam como bons fotossensibilizadores, conduzindo há um bom rendimento quântico, superior ao azul de metileno (0,52) para este mesmo solvente.⁸⁹ Vale ressaltar que estes compostos absorvem na janela terapêutica, é de fácil obtenção e baixo custo, além de apresentar em um bom Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete.

4.2.2.4 - Determinação da formação de estados agregados para os derivados de Clorofilina

De forma similar aos derivados de Pp IX, os derivados de clorofilina apresentaram propriedades características da formação de estados agregados durante a caracterização. Por exemplo, alargamentos dos sinais de RMN de ^1H , mascarando a multiplicidade dos sinais.

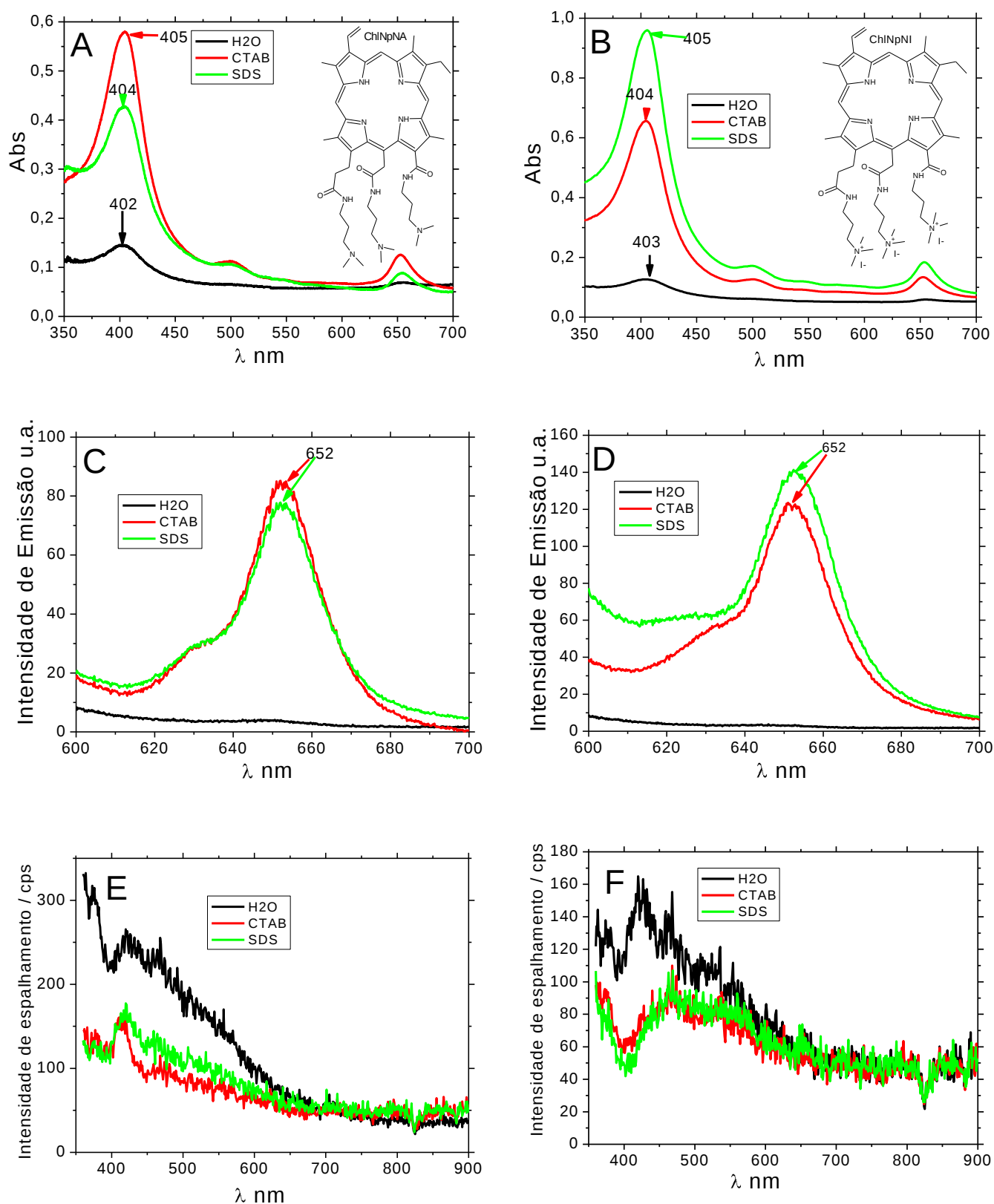


Figura 28: Espectros de UV-vis (A e B), fluorescência (C e D) e espalhamento de luz ressonante (E e F), todos obtidos em H₂O, CTAB e SDS para os compostos ChlNpNA (A,C e E) e ChlNpNI (B, D e F)

De forma geral os resultados obtidos para os derivados de clorofilina, foram análogos aos obtidos dos derivados de Pp IX. Os espectros UV-vis da solução aquosa (Fig 28 A e B) apresentam bandas mais largas e menos intensas que as apresentadas em soluções com a mesma concentração na presença de micelas dos surfactantes (CTAB e SDS). Além disso, o máximo de absorção está deslocado para o azul em água, sugerido a presença de agregados tipo H.⁵⁶ Na presença de micelas foi observado um deslocamento batocrômico de alguns nanômetros. O composto funcionalizado com amina terciária (ChlNpNA) apresenta um maior fator de desagregação no surfactante catiônico (CTAB). Já para a ChlNpNI que é catiônica, foi observado que o surfactante mais efetivo é aquele que apresenta carga oposta (SDS). Estes resultados mostram contribuições das forças eletrostáticas e hidrofóbicas na desagregação destes compostos.

A formação de auto-agregação em solução aquosa foi confirmada pela ausência de fluorescência, sendo que o equilíbrio monômero-agregado encontra-se deslocado no sentido do agregado, favorecendo a desativação do estado excitado S_1 , através dos níveis vibracionais dos agregados do tipo H. Ambos os surfactantes promovem a desagregação. Este resultado foi confirmado através do espectro de fluorescência na presença de micelas. O espectro de ELR para ambos os compostos (ChlNpNA e ChlNpNI) em solução aquosa apresenta intensidade superior àquela apresentada na presença de micelas, confirmando a existência de agregados. No entanto, estes agregados devem ser de tamanhos reduzidos, provavelmente dímeros, uma vez que o aumento na intensidade de espalhamento é pouco expressiva.⁶¹

Visando uma análise comparativa, foi determinada a influência do meio de cultura celular no equilíbrio monômero-agregado para os compostos ChlNpNA e ChlNpNI. A Figura 29 ilustra a comparação do espectro UV-vis em solução aquosa e em meio de cultivo.

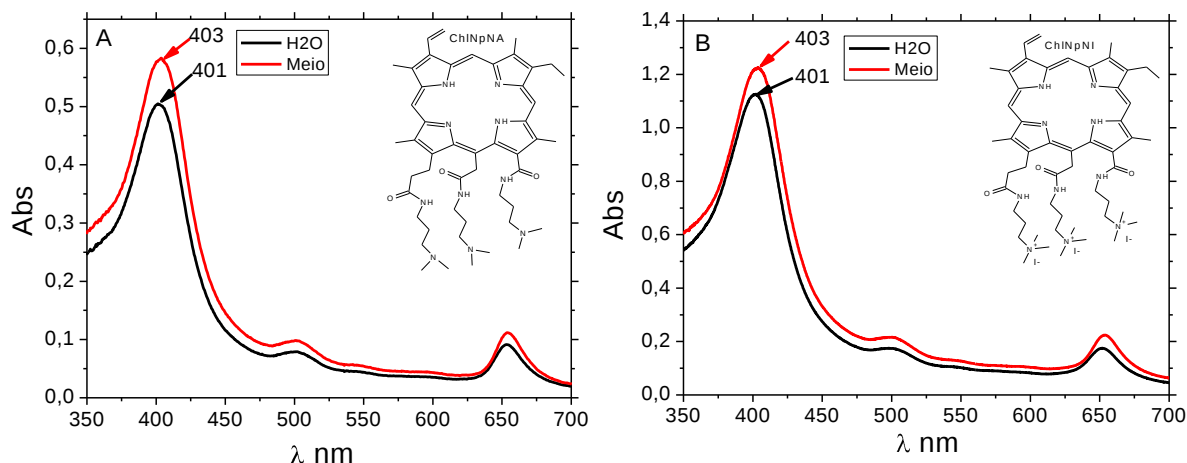


Figura 29: Espectros de UV-vis de: A) ChlNpNA B) ChlNpNI. Ambos foram determinados em DMEM e em solução aquosa, em $pH = 7,2$

Por meio dos espectros UV-vis, pode-se observar que ambos os compostos (ChlNpNa e ChlNpNI) apresentam maior intensidade de absorção em DMEM, que em solução aquosa e um deslocamento da banda *soret* para o vermelho de 2 nm. Estes dados mostram que o meio de cultivo altera as forças de solvatação deslocando o equilíbrio monômero-agregado, conseqüentemente, favorecendo a formação do monômero. Este favorecimento da formação de monômeros pode ser atribuído interação com albumina.²³

4.2.2.5 - Coeficiente de Partição 1-octanol/água

Como mencionado anteriormente é importante estudar a possível tendência de interação com membrana mensurando o valor do coeficiente 1-octanol/água em função do pH.

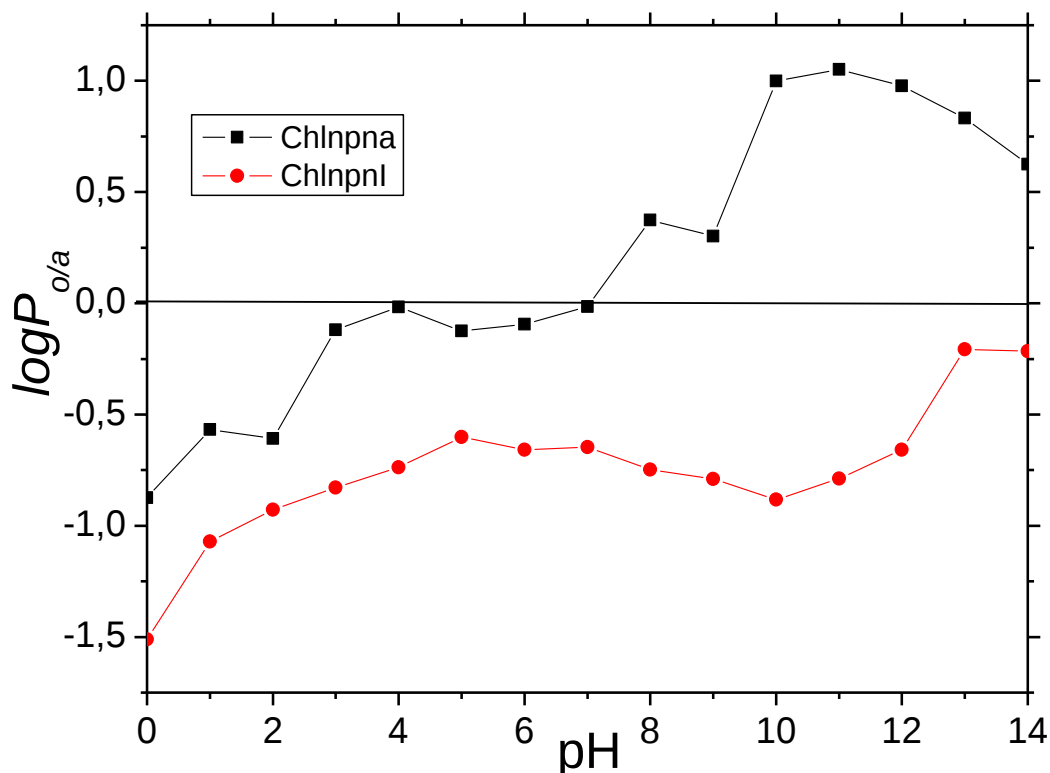


Figura 30: $\log P_{o/a}$ para os novos fotossensibilizadores derivados de clorofilina: Chlnpna e Chlnpnl em função do pH

A variação do $\log P_{o/a}$ em função do pH, (Fig. 30) mostra que Chlnpna se encontra protonada em $\text{pH} \leq 2$. Nestas condições, a sua afinidade por meio aquoso é bem superior. Já na faixa de três a oito, a afinidade por ambas as fases é similar e, acima disto, o composto apresenta maior afinidade pela fase orgânica. Já o Chlnpnl apresenta uma tendência muito superior à fase aquosa, sendo que esta tendência é ainda maior em meio ácido, devido à protonação do anel porfirínico. Vale notar que devido ao composto apresentar uma parte apolar considerável (anel porfirínico) e as cargas estarem situadas todas do mesmo lado da molécula, este apresenta característica anfifílica.

4.3 - Determinação da atividade Fotodinâmica

O estudo da atividade dos compostos sintetizados neste trabalho foi realizado utilizando células HeLa como modelo para determinação da taxa de incorporação, toxicidade, fototoxicidade e citolocalização. Este estudo complementa as etapas preliminares de caracterização e atividade dos fotossensibilizadores, além de possibilitar a comparação e interpretação da influência dos grupos funcionais, principalmente o efeito da carga e da solubilidade na atividade fotodinâmica. Este estudo foi realizado tanto com os derivados de Pp IX como com os derivados de Clorofilina.

4.3.1 - Derivados de Protoporfirina IX.

Nesta etapa foi estudada a atividade de sete compostos sintetizados por três diferentes rotas, cujas estruturas estão apresentadas nos Esquema 14, 15 e 16. Estes compostos apresentam diferentes grupos funcionais (aminas, amônio e fosfônico) permitindo um estudo comparativo da interação destes compostos com sistemas biológicos (membranas modelo, mitocôndrias e células) e uma avaliação da funcionalidade na atividade fotodinâmica.

4.3.1.1- Taxa de Incorporação

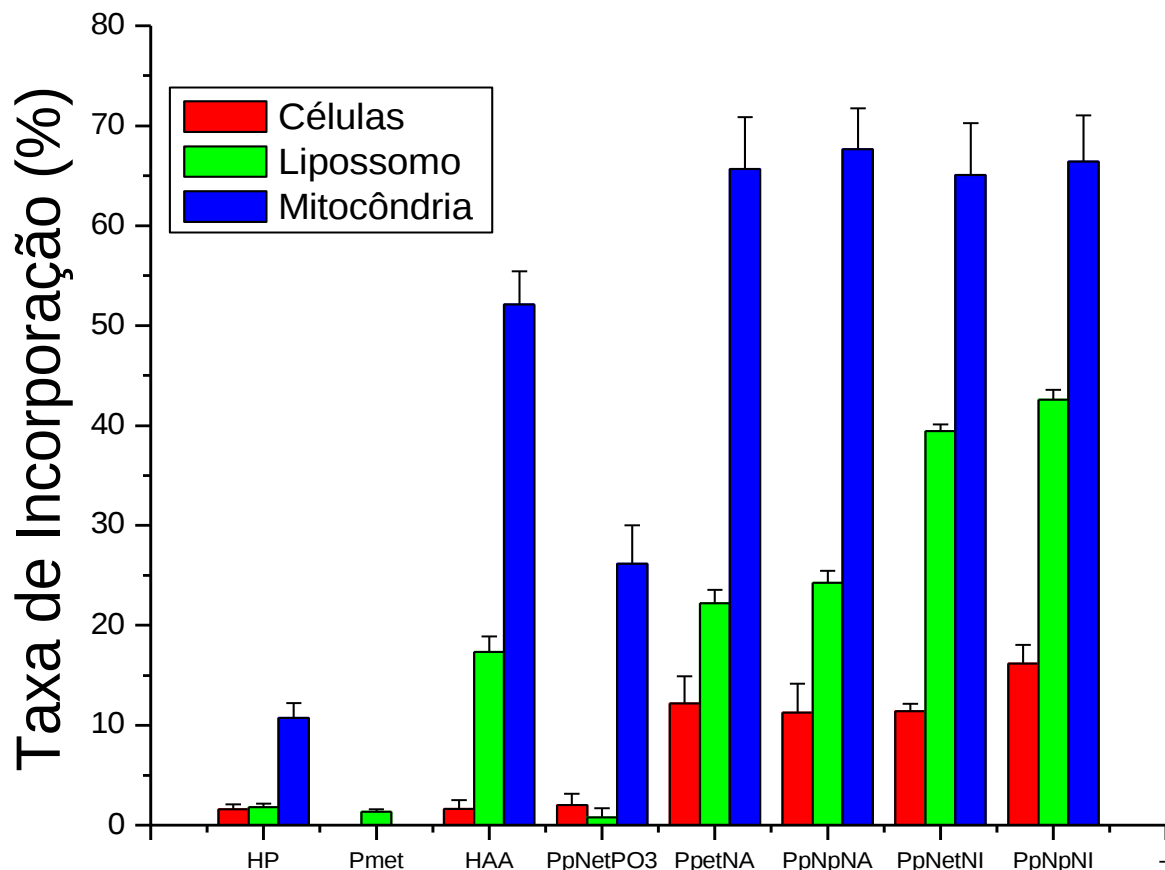


Figura 31: Comparação das taxas de incorporação para os derivados de protoporfirina IX. [Fs]= 20 μM ; em lipossomo aniônicas $\approx 1\text{mg.mL}^{-1}$, células e em mitocôndrias 10^6 células. mL^{-1} . Mitocôndria 13 mg.mL^{-1}

A taxa de incorporação em lipossomos (Fig. 31) já foi discutida anteriormente e está mostrada para facilitar a comparação. A incorporação dos compostos derivados de amina e de amônio quaternário é de quatro a cinco vezes superior a apresentada por Hp IX. De forma geral, a incorporação em células e mitocôndria segue perfil semelhante. A principal diferença é que as taxas de incorporação em mitocôndrias e em células são similares entre os quaternários (PpNetNI e PpNetNI) e aminas (PpNetNA e PpNetNA). No caso dos lipossomos a incorporação dos derivados de amônio quaternário é sensivelmente superior. É possível que o aumento de incorporação dos derivados de amina nas mitocôndrias e nas células seja devido a protonação dos mesmos, adquirindo carga e se tornando anfífilos como os derivados de

amônio quaternário. Cabe mencionar que o espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria tem *pH* diminuído, podendo explicar este efeito.

O aminofosfônico (PpNetPO₃) e a HAA apresentam taxa de incorporação em células similar à Hematoporfirina IX, no entanto, apresentam uma taxa de incorporação muito superior em mitocôndria. A maior incorporação nesta organela pode ser atribuído ao fato de que nas mitocôndrias isoladas os sítios de interação com proteínas e com a região com potencial eletrostático positivo do espaço entre-membranas estar acessível para estes compostos. No entanto, de forma geral, os compostos catiônicos e as aminas apresentam uma taxa de incorporação superior aos demais, provavelmente devido a atuação de forças eletrostáticas entre os compostos com cargas positivas e a mitocôndria.

4.3.1.2 - Toxicidade e Fotocitotoxicidade

A citotoxicidade e a fotocitotoxicidade foram determinadas para todos os compostos sintetizados. A aplicação dos compostos no cultivo de células foi efetuada mediante aplicação direta do fotossensibilizador em meio de cultivo ou aplicação do fotossensibilizador incorporado em lipossomo. A aplicação do fotossensibilizador em lipossomo visa utilizar este sistema como veículo de transporte para a incorporação em células.¹⁰⁸

Nesta concentração (20 µM) nenhum dos compostos apresentou resultados que diferissem da referência (ensaio sem a droga) por valores maiores que o desvio padrão (10%), o que mostra que estes compostos não apresentam toxicidade para estes níveis de concentração.

A fotocitotoxicidade foi determinada por irradiação com laser em 532 nm na banda Q_{II}. A análise foi realizada de forma comparativa, utilizando-se cultivos controle na ausência do fotossensibilizador (tomado com 100% de viabilidade) e Hp IX, que tem fotocitotoxicidade

conhecida, foi adotada como segundo padrão de referência. A Figura 32A apresenta os resultados para os compostos obtidos pelas rotas I e II (Esquema 14 e 15), e a figura 32B apresenta os resultados obtidos para os compostos resultantes da rota III (Esquema 16).

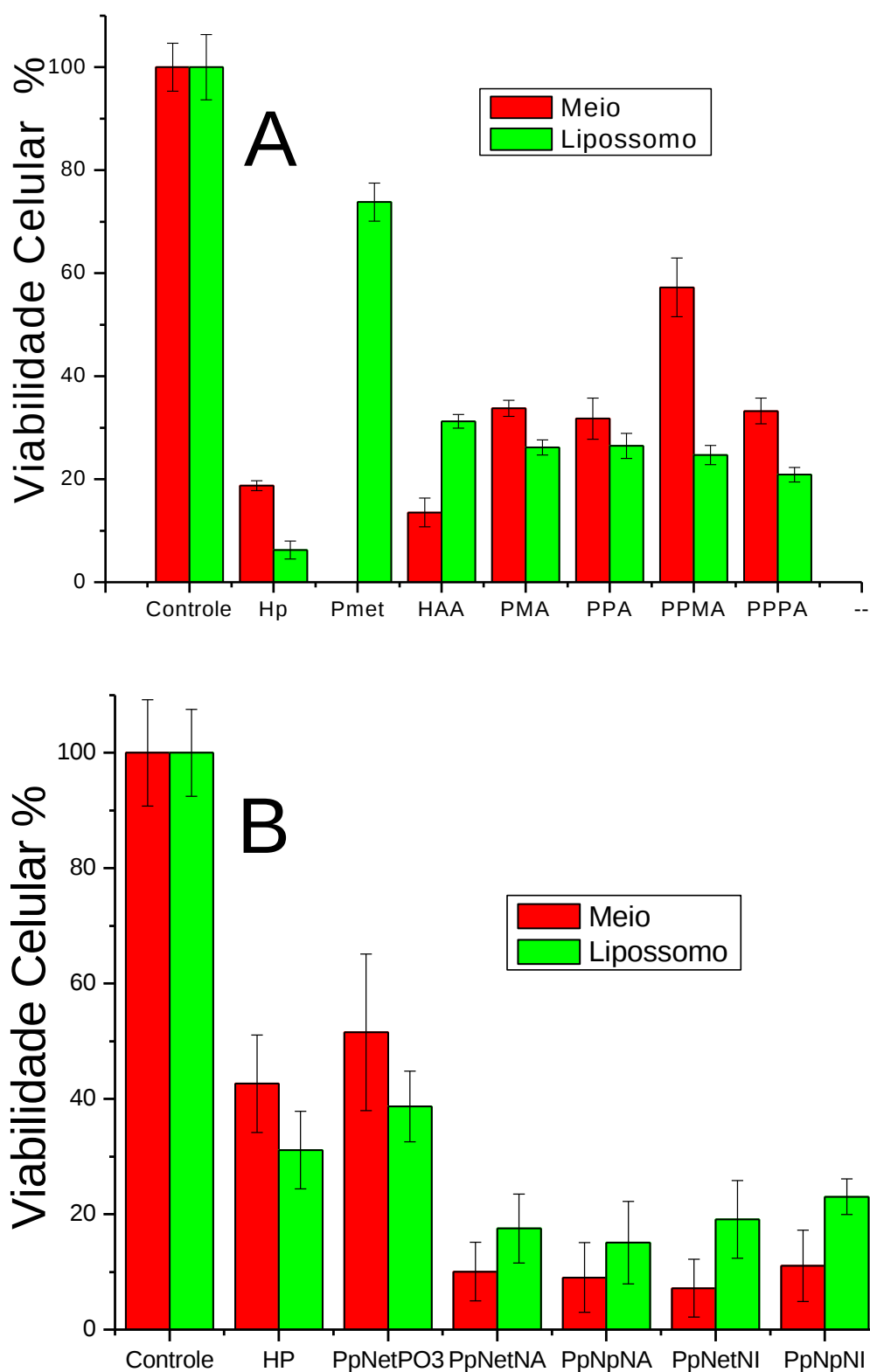


Figura 32: Fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores a 20 μM em células tipo HeLa 10^6 células.mL⁻¹. Irradiado em 532 nm, com dose de 2,7 mJ.cm⁻² A) obtido por funcionalização de protoporfirina em 3¹ e 8¹ e Hematoporfirina em 3¹ e 8¹, e em 13³ e 17³; B) Obtidos por funcionalização de Protoporfirina em 13³ e 17³. Lipossomo de fosfatidilglicerol 1mg.mL⁻¹

A funcionalização dos fotossensibilizadores em 3¹ e 8¹ proporcionou hidrossolubilidade para os compostos PMA e PPA, viabilizando tanto a aplicação direta quanto em lipossomos. A esterificação destes compostos nas posições 13³ e 17³ (PpmA e PppA) reduziu a hidrossolubilidade, mas foi mantida uma solubilidade apreciável em meio ácido e em meio de cultivo celular pH 7,2, permitindo a aplicação direta e a análise comparativa.

Todos os compostos ensaiados apresentam redução da viabilidade celular através da aplicação direta ou em lipossomos. Já a Protoporfirina IX (percussor), assim como o produto de esterificação (Ppmet), não apresentam solubilidade em água, inviabilizando sua aplicação direta. A aplicação de Ppmet foi determinada unicamente através da incorporação em lipossomo. Já a Pp IX não apresentou solubilidade suficiente para aplicação por nenhuma das técnicas.

Quando comparadas às atividades dos compostos obtidos através das rotas I e II (Fig. 32) com a atividade da Hp IX, apenas o composto obtido através da rota I (HAA) apresenta atividade superior à Hp IX para a aplicação direta em meio de cultivo. Note que a viabilidade celular no tratamento com Hp IX e luz é de 18% enquanto que para HAA é de 13%. A atividade de HAA é inferior na aplicação realizada através da incorporação em lipossomo. A diminuição da viabilidade celular dos compostos obtidos através da rota II é muito superior a apresentada por Ppmet, mas ligeiramente inferior ao apresentado por Hp IX. O método de aplicação em lipossomo apresenta melhor desempenho para todos os compostos obtidos através da rota II. Esta mesma tendência foi observada para o composto de referência (Hp IX). Isto mostra que a estratégia de utilização de lipossomo como carreador pode incrementar a atividade destes compostos, que são hidrofóbicos. Já a maior atividade de HAA por aplicação direta foi atribuída a um certo caráter anfifílico do composto, que é funcionalizado com amina

nas posições 3¹ e 8¹ e amida nas posições 13³ e 17³, apresentando uma relação Lip/hidrofílica que permitiu a sua incorporação mais eficiente nas células na ausência de lipossomos.

Na figura 32B estão apresentados os resultados para a fotocitotoxicidade dos compostos obtidos por funcionalização nas posições 13³ e 17³, obtidos através da rota III. Assim como os demais (rotas I e II), a atividade foi determinada por comparação, utilizando-se Hp IX como padrão. Entre os compostos obtidos através desta rota, foi observado que PpNetPO₃ apresenta atividade similar ao padrão (Hp IX). Já os demais compostos, amins e quaternários, apresentam diminuição da viabilidade celular em torno de quatro vezes superior à atividade de Hp IX. A maior atividade destes compostos foi relacionada com a sua estrutura anfifílica e $\log P_{o/a}$ favorável, próximo de zero entre os $pH=3$ e $pH=7$ e, possivelmente, com atrações eletrostáticas das carga positiva dos compostos que apresentam afinidade pelo potencial negativo da membrana interna das mitocôndrias.

4.3.2 - Derivados de Clorofilina.

Os ensaios efetuados para os derivados de clorofilina (ChlNpNA e ChlNpNI) foram similares aos realizados para os derivados de Pp IX. Determinou-se inicialmente a incorporação em mitocôndrias e em células HeLa em cultura.

4.3.2.1 – Taxa de Incorporação (lipossomo, Célula e Mitocôndria)

Os ensaios de incorporação em lipossomo foram efetuados em pH 7,2. A determinação da incorporação em pHs ácidos e básicos foi considerada desnecessária, visto que estes compostos apresentam os mesmos grupos funcionais (amina e amônio quaternários) dos obtidos pela rota III estabelecida para Pp IX. Assim, a tendência pôde ser estimada a partir dos resultados já obtidos para os derivados de Pp IX.

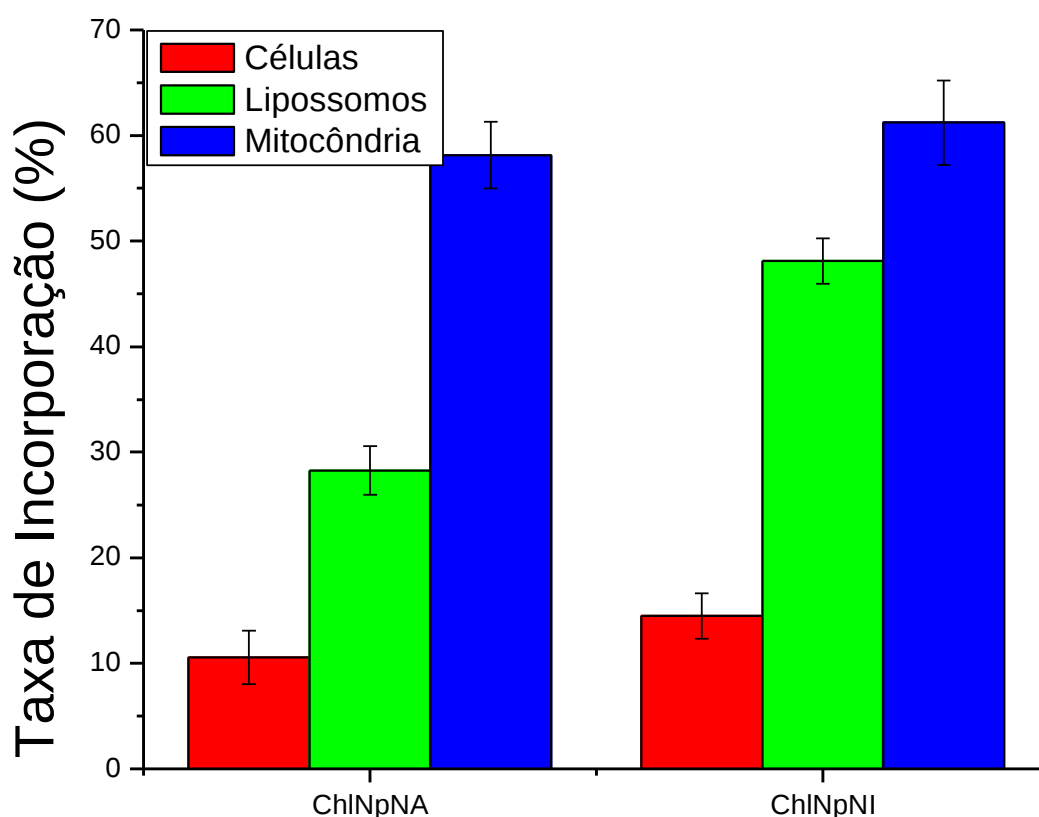


Figura 33: Comparação das taxas de incorporação dos derivados de clorofilina a 20 μM em 10^6 células. mL^{-1} , lipossomo aniônico de fosfatidicolina $\approx 1\text{mg.mL}^{-1}$ e mitocôndrias 13mg.mL^{-1} . Experimentos realizados em triplicata

A Figura 33 apresenta as taxas de incorporação em lipossomos, mitocôndrias e células. Os resultados mostram uma ótima taxa de incorporação para ambos os compostos ensaiados nos três sítios de incorporação. Em lipossomos ChlNpNA apresenta 28% de incorporação e

ChlNpNI 48%. Estes resultados estão coerentes com os já obtidos para os derivados de Pp IX, mostrando que o composto catiônico (ChlNpNI) tem uma afinidade superior com os lipossomos de cargas opostas e bastante superior ao observado para Hp IX (em torno de 2%). A incorporação em mitocôndrias é semelhante para ambos os compostos (58% de incorporação para ChlNpNA e 61% para ChlNpNI), provavelmente devido a protonação do derivado de amina no espaço entre-membranas das mitocôndrias, efeito já observado para os derivados de Pp IX (Figura 31). A incorporação em células é também bastante expressiva (11% para ChlNpNA e 13% para ChlNpNI), compado com 2% para a Hp IX. Estes resultados são análogos aos obtidos para os derivados de Pp IX. Foi determinada uma pequena tendência de maior incorporação do ChlNpNI em células e em mitocôndrias. De forma geral estes compostos apresentam características favoráveis à interação com sistemas biológicos, podendo ser incorporados em células e organelas e atraídos mais intensamente por sítios com potencial negativo, tais quais os das mitocôndrias.

4.3.2.2 - Toxicidade e Fotocitotoxicidade

A citotoxicidade e a fototoxicidade foram determinadas em células HeLa, experimentos realizados em triplicatas. Nos experimentos de citotoxicidade, não foi observada toxicidade significativa para ambas as drogas ensaiadas na concentração de 20 μ M, sendo que as diferenças entre viabilidade das células incubadas com as drogas e as células controle se encontram dentro do desvio padrão.

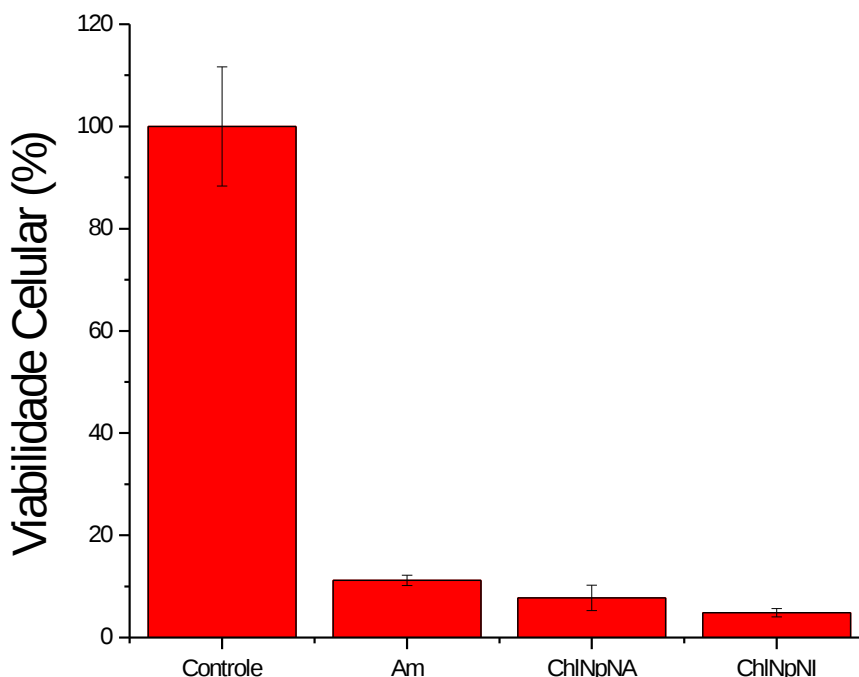


Figura 34: Fotocitotoxicidade dos novos fotossensibilizadores (ChlNpNA e ChlNpNI) e azul de Metileno (AM) a 20 μM em células tipo HeLa, 10^6 células.mL⁻¹, irradiadas em 650 nm, com dose de 2,4 mJ.cm⁻²

Para a determinação da fotocitotoxicidade, além do controle na ausência do fotossensibilizador também foi realizada uma análise comparativa com azul de metileno, composto com fotocitotoxicidade conhecida. O azul de metileno foi tomado como referência, visto que é uma droga cuja atividade em TFD esta bem estabelecida³⁴ e ambas as drogas (azul de metileno e as porfirinas aqui ensaiadas) podem ser irradiadas no mesmo comprimento de onda, permitindo uma comparação direta.

A incubação com azul de metileno e irradiação resultou em 88 % de morte celular com desvio padrão de 1 %. Para os novos Fs, observou-se 92% de morte celular com 3% de desvio padrão para ChlNpNA (grupo funcional amina) e 95% com desvio padrão de 1% para o composto catiônico, ChlNpNI. Este dado bruto sugere que estes novos compostos apresentam fotoatividade semelhante à do Azul de metileno, o que já é um bom resultado, considerando

que AM é já estabelecido como um bom Fs em TFD. No entanto, é importante comparar a quantidade de fótons absorvidas em cada situação para poder comparar a eficiência quântica de morte celular de cada Fs. Não foi possível medir diretamente a absorção dos Fs nas células, mas podemos estimar o fator de absorção (fração de luz absorvida por um meio qualquer, (Eq.5) utilizando o ϵ de cada composto, a percentagem de incorporação nas células e a concentração utilizada, que foi constante para todos os Fs e igual a 20 μ M. O ϵ do azul de metileno em 650nm é igual a 68000 M⁻¹cm⁻¹.⁸¹ O ϵ das porfirinas neste comprimento de onda é 3584 e 3797 para ChlNpNI e ChlNpNA, respectivamente (tabela 7).

$$\alpha = 1 - 10^{-Abs} \quad \text{Equação 5}$$

A fração de incorporação em células HeLa é 70% para AM¹⁰⁹, 61% para ChlNpNI e 58% para ChlNpNA. Multiplicando-se a fração de incorporação pela concentração e pelo ϵ , obtem-se os valores de absorção, e utilizando estes na equação 1 obtem-se os fatores de absorção que são 0,9 para suspensão de células tratadas com AM; 0,09 para células tratadas com ChlNpNI e 0,09 para células tratadas com ChlNpNA. Ou seja, as células tratadas com as novas porfirinas absorvem 10 vezes menos fótons do que aquelas tratadas com AM. Consequentemente, as novas porfirinas induzem morte celular muito mais frequentemente por fóton absorvido. A razão desta diferença deve ser devida a diversos fatores, incluindo, citolocalização e eficiência fotodinâmica intracelular. Cabe mencionar que o AM pode ser reduzido no ambiente celular, tendo atividade fotodinâmica diminuída, o que não acontece com as porfirinas. A redução do AM em células HeLa foi demonstrada recentemente em outro trabalho do grupo.¹⁰⁹

4.4 - Citolocalização em células HeLa

Os ensaios de citolocalização foram realizados em células HeLa. Três Fs foram testados, dois compostos com cargas iônicas, um carregado positivamente (PpNpNI), outro negativamente (PpNetPO₃) e a Hp IX, possibilitando o estudo comparativo da contribuição dos grupos funcionais na sublocalização celular. Obtiveram-se imagens por microscopia de fluorescência confocal de células co-encubadas com os Fs e com Rodamina 123, que é marcador de mitocôndria.^{94,110,111} A possível presença dos compostos em mitocôndrias foi determinada por comparação das áreas de emissão fluorescentes dos compostos e do padrão (rodamina 123). Estas áreas foram integradas e sobrepostas, para determinação da porcentagem de área coincidente.

As imagens das figuras 35 a 37 mostram que toda fluorescência encontra-se sempre na região do citoplasma possivelmente concentrada em organelas. Isto foi observado tanto para Rd, como para a fluorescência dos Fs. Note que não há fluorescência no núcleo e na região da membrana citoplasmática.

Para a Hp IX pode ser observado um certo grau de colocalização entre o perfil de fluorescência da Rd (Figura 35A) e da HpIX (Figura 35B), que resulta em uma interseção de área da ordem de 0,6. Isto mostra que Hp IX tem certa tendência de concentra-se em mitocôndria¹¹², mas a Hp IX deve distribuir-se por diversos outros sítios celulares além das mitocôndrias, o perfil de distribuição não havia sido ainda estabelecido com clareza. Outros padrões de cito localização serão utilizados para se ter uma idéia mas ampla do padrão de distribuição destes compostos em células.

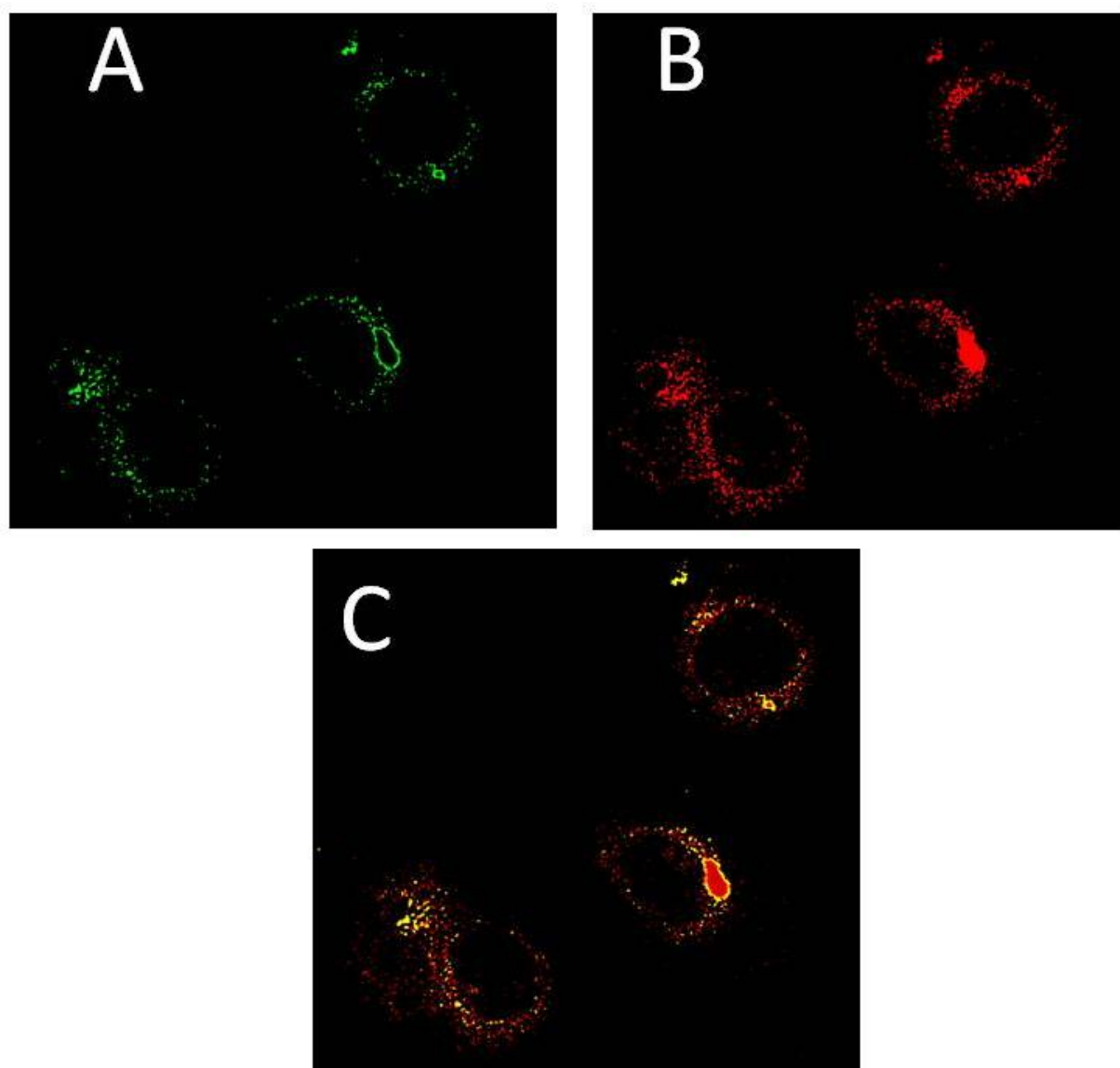


Figura 35 : Micrografia de fluorescência de Hp IX (painel A), Rodamina 123 (painel B) e sobreposição de Hp IX e Rodamina 123 (painel C)

Tabela 9: Área celular de fluorescência para Rd e Hp IX			
	Rodamina 123	Hp IX	Interseção
Área	236439	386852	0,6

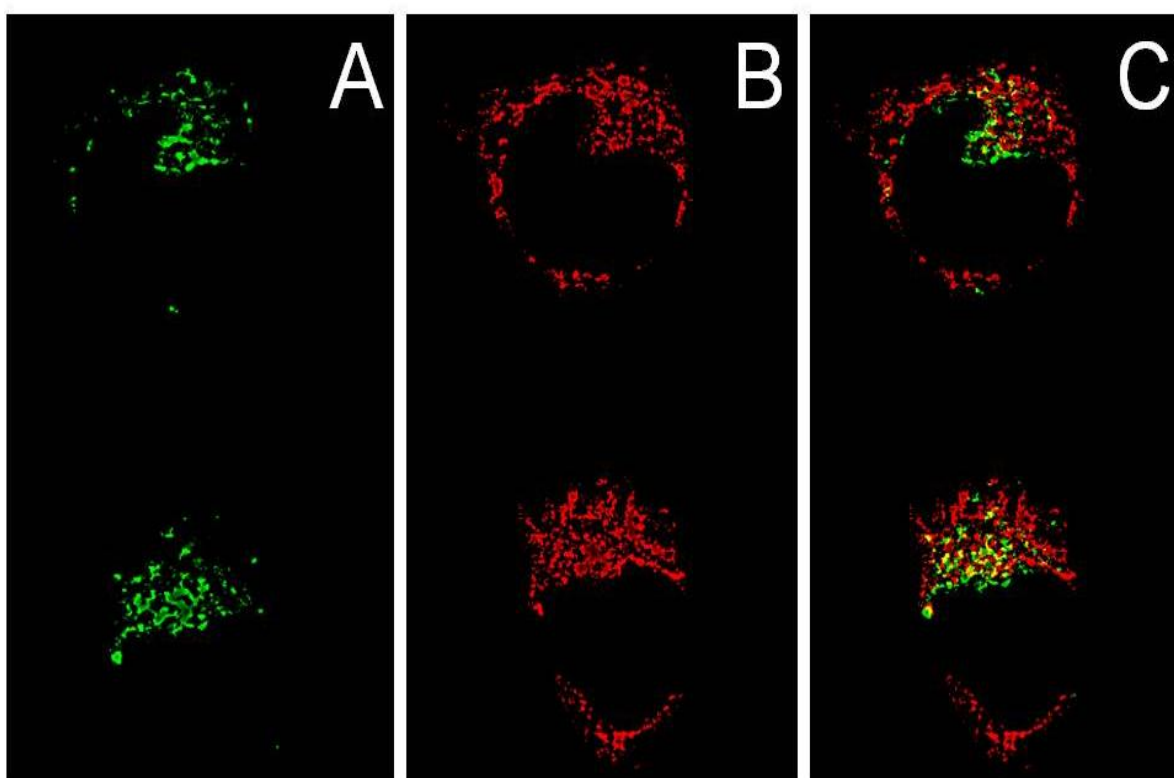


Figura 36: Micrografia de fluorescência de Rodamina 123 (painel A), PpNetPO₃ (painel B) e sobreposição de PpNetPO₃ e Rodamina 123 (painel C)

Tabela 10: Área celular de fluorescência para Rd e PpNetPO ₃			
	Rodamina 123	PpNetPO ₃	Interseção
Área	305541	961730	0,3

A Figura 36 apresenta as imagens de fluorescência das células co-encubadas com o fotossensibilizador aniônico PpNetPO₃ e Rd. Os painéis A e B apresentam, respectivamente, a fluorescência do padrão (Rd) e do fotossensibilizador (PpNetPO₃), e a região de interseção que é de 0,3 (painel c da figura 36). Esta pequena interseção das imagem indica que o PpNetPO₃ não deve se concentrar na mitocôndria. Por ser aniônico deva atuar preferencialmente em outras organelas, provavelmente lisossomos, como já foi determinado para outras drogas carregadas negativamente.⁷⁸

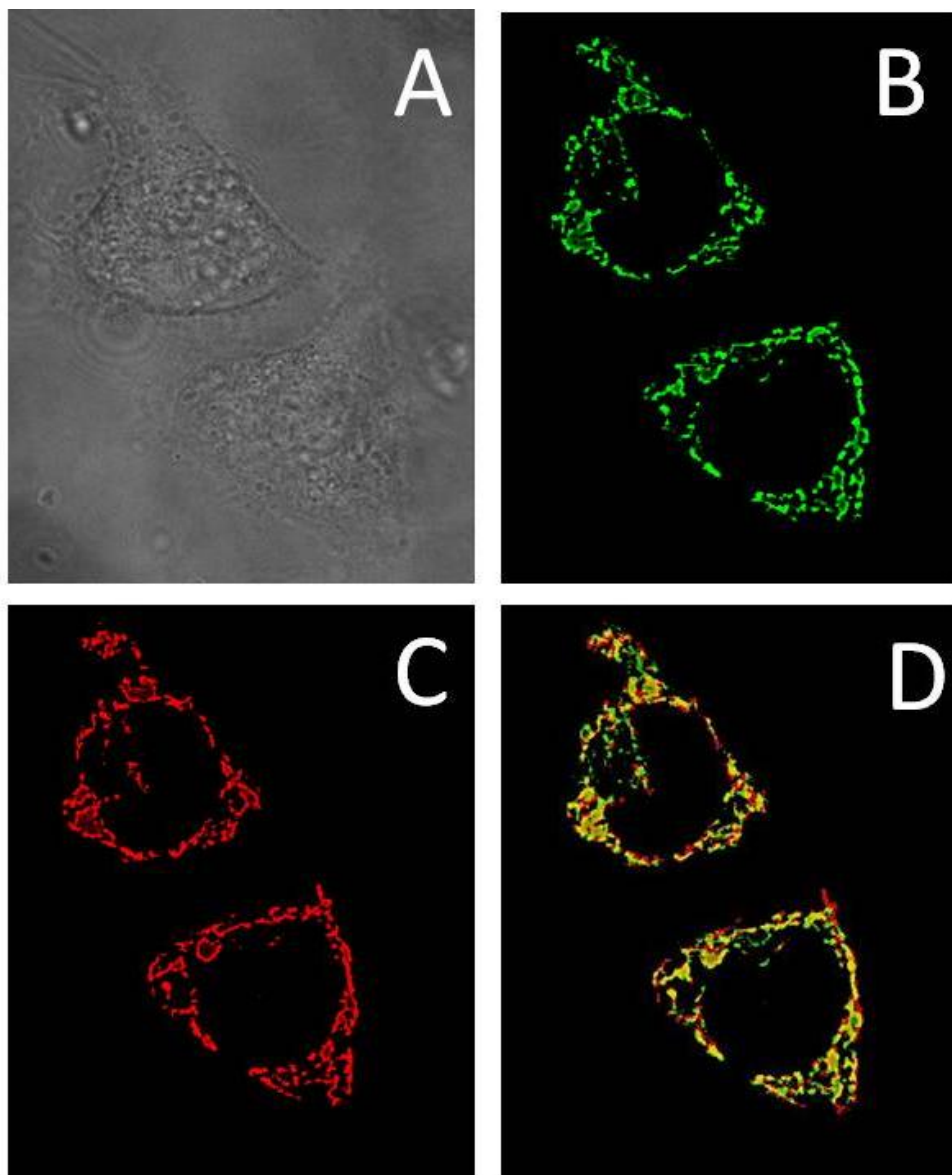


Figura 37: Micrografia transmitida (painel A), de fluorescência de PpNpNI (painel B), Rodamina 123 (painel C) e sobreposição de PpNpNI e Rodamina 123 (painel D)

Tabela 11: Área celular de fluorescência para Rd e Hp IX			
	Rodamina 123	PpNpNI	Interseção
área	848353	1063440	0,8

Analisando os perfis de distribuição de fluorescência da PpNpNI e da Rd (Figura 37) percebe-se um grau elevado de sobreposição. Esta percepção é comprovada pela análise da sobreposição das áreas fluorescentes de ambos os compostos de 0.8 (Figura 37D e tabela 11). A excelente intersecção entre as fluorescência de PpNpNI e Rd mostra que os compostos têm tendência a ocuparem as mesmas regiões celulares, ou seja, PpNpNI deve localizar-se, preferencialmente, em mitocôndrias. A citolocalização preferencial por esta organela foi atribuída às atrações eletrostáticas entre a carga positiva do composto com o $\Delta\Psi$ localizado na membrana interna mitocondrial. Resultados semelhantes já foram observados para outros compostos catiônicos.^{72,111}

5 – CONCLUSÕES

Entre as estratégias de funcionalização dos compostos porfirínicos, a funcionalização nos grupos carbonilas com cloreto de oxalila (Rota III, Esquemas 16, 17 e 19) foi a que ofereceu melhores rendimentos, compostos puros e estáveis. Através desta rota foram sintetizados sete derivados de Pp IX e dois derivados de Cu^{2+} -Clorofilina. Entre outros ganhos, o derivados de Cu^{2+} -Clorofilina apresentam um deslocamento batocrômico de 625 para 650 nm e ϵ superior $3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Foi observado que os derivados de Pp IX não apresentam alterações significativas nas suas propriedades fotofísicas. Já os derivados de Cu^{2+} -clorofilina apresentam alterações bastante significativas e favoráveis à utilização em TFD. Os novos compostos apresentam rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ de 0,57 com baixo rendimento quântico de fluorescência, ao contrário do precursor Cu^{2+} -Clorofilina, que não apresentava fluorescência nem geração de oxigênio singlete.

Foi determinado que todos os compostos porfirínicos formam estados agregados em solução aquosa, e que o equilíbrio agregado monômero é alterado em sistema micelar de CTAB e SDS, assim como em meio de cultivo celular DMEM. A desagregação em sistema micelar é mais efetiva quando a carga da micela é oposta à carga do fotossensibilizador, já desagregação em meio de cultivo foi atribuída à interação com albumina e/ou com outras proteínas contidas na solução.

Nos estudos comparativos, os ensaios de solubilidade e incorporação mostraram que os compostos que apresentam cargas, especialmente, aqueles com grupo funcional amina e amônio quaternário, apresentam melhor incorporação em lipossomos, em células e em mitocôndrias. Também foi observado que estes foram os compostos que apresentaram maior

fotocitotoxicidade. Desta forma, a funcionalização do cromóforo mostra ter solucionado o problema de solubilidade encontrado na Protoporfirina IX e na Hematoporfirina IX. Além disso, os compostos funcionalizados proporcionam interações eletrostáticas, contribuindo para a maior taxa de incorporação. A maior atividade destes compostos foi atribuída ao caráter anfifílico considerado ideal ($\log P_{O/A}$ próximo de zero entre os pH 4 e 8), e à presença de carga positiva, a qual, além de estar permitindo a maior internalização dos compostos, direciona estes para as mitocôndrias por atração eletrostática com $\Delta\Psi$ da membrana mitocondrial interna. A citolocalização em mitocôndria, determinada por microscopia de fluorescência confocal indica que este deve ser o sítio de ação dos Fs que sejam lipossolúveis e apresentem cargas positivas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ WALKER, I.; GORMAN, S.A.; COX, R.D.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S.B. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells *in vitro*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, n.7, p.653-659, 2004.
- ² KUNZ, L.; CONNELLY, J.P.; WOODHAMS J.H.; MACROBERT A.J. Photodynamic modification of disulfonated aluminium phthalocyanine fluorescence in a macrophage cell line. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.6, p.940-948, 2007.
- ³ MCCAUGHAN Jr., J.S. Photodynamic therapy: a review. **Drugs & Aging**, v.15, p.49-68, 1999.
- ⁴ ROBERTS, D.J.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, p.360-370, 1995.
- ⁵ BONNETT, R.; MARTINEZ G., Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.57, p.9513-9547, 2001.
- ⁶ STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-4202, 1998.
- ⁷ RAAB, O. Action of fluorescent materials on infusorial substances. **Zeitschrift fuer Biologie**, v.39, p.524-546, 1900.
- ⁸ TAPPEINER, V.H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluorescierenden stoffen. **Münchener Medizinische Wochenschrift**, v.47, p.2042-2044, 1903.
- ⁹ DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.5, p.380-387, 2003.
- ¹⁰ HAUSMANN, W.H. Die sensibilisierende Wirkung des Hamatoporphyrins. **Biochemische Zeitschrift**, v.30, p.276-316, 1910.
- ¹¹ LIPSON, R.L.; GRAY, M.J.; BALDES, E.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 9, Tokyo, 1966. **Proceedings**. Tokyo, 1966. p.393.
- ¹² PUSHPAN, S.K.; VENKATRAMAN, S.; ANAND, V.G.; SANKAR, J.; PARMESWARAN, D.; GANESAN, S.; CHANDRASHEKAR, T.K. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. **Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents**, v.2, n.2, p.187-207, 2002.
- ¹³ LIPSON, R.L.; BALDES, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **AMA, Archives of Dermatology**, v.82, p.508-516, 1960.
- ¹⁴ LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of an derivative of hematoporphyrin in tumor. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.42, p.623-629, 1961.

-
- ¹⁵ POTTER, W.R.; MANG, T.S.; DOUGHERTY, T.J. The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photodestruction of sensitizer. **Photochemistry and Photobiology**, v.46, p.97–101, 1987.
- ¹⁶ BONNETT, R. **Chemical aspects of photodynamic therapy**. London: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. 305p. (Advanced chemistry texts, v.1)
- ¹⁷ BALZANI, V.F.; SCANDOLA, M.G. **Energy Resources Through Photochemistry and Catalysis**. New York: Academic Press, 1983. 560p.
- ¹⁸ KALYANASUNDARAN, K. **Photochemistry in microheterogeneous systems**. Orlando: Academic Press, 1987. 388p.
- ¹⁹ OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.39, n.1, p.1-18, 1997.
- ²⁰ HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work. **Photochemistry and Photobiology**, v.1, p.145-157, 1992.
- ²¹ QUINA, F.H.; WEISS, R.G. Time-resolved techniques in photochemistry, photophysics and photobiology introduction. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p.2-3, 1997.
- ²² FOOTE, C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation: there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**, v.162, p.963-970, 1968.
- ²³ BAPTISTA, M.S.; INDIG, G.L. Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. **Journal of Physical Chemistry B**, v.102, p.4678-4688, 1998.
- ²⁴ INDIG, G.L.; ANDERSON, G.S.; NICHOLS, M.G.; BARTLETT, J.A.; MELLON, W.S.; SIEBER, F. Effect of molecular structure on the performance of triarylmethane dyes as therapeutic agents for photochemical purging of autologous bone marrow grafts from residual tumor cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, p.88-99, 2000.
- ²⁵ HACHAM, H.; FREEMAN, S.E.; GANGE, R.W.; MAYTUM, D.J.; SUTHERLAND, J.C.; SUTHERLAND, B.M. Does exposure of human skin in situ to 385 or 405 nm UV induce pyrimidine dimers in DNA? **Photochemistry and Photobiology**, v.52, p.893-896, 1990.
- ²⁶ DALMANS, E.J.G.J.D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.380-387, 2003.
- ²⁷ RAVANAT, J.L.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIO, P.; CADET, J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.423, p.23-30, 2004.
- ²⁸ RAVANAT, J.L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.G.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.51, p.40601–40604, 2000.

-
- ²⁹ SNYDER, J.W.; SKOVSEN, E.; LAMBERT, J.D.C.; OGILBY, P.R. Sub-cellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p.14558-14559, 2005.
- ³⁰ BELOUSOVA, I.M.; MIRONOVA, N.G.; YUR'EV, M.S. A mathematical model of the photodynamic fullerene-oxygen action on biological tissues. **Optics and Spectroscopy**, v.98, p.349-356, 2005.
- ³¹ KESSEL, D.; CHOU, T.H. Tumor-localizing components of the porphyrin preparation hematoporphyrin derivative. **Cancer Research**, v.43, p.1994-1999, 1983.
- ³² RAVANAT, J.L.; SAUVAIGO, S.; CAILLAT, S.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO P.; FAVIER, A.; CADET, J. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. **Biological Chemistry**, v.385, p.17-20, 2004.
- ³³ MARTINEZ, G.R.; LOUREIRO, A.P.M.; MARQUES, S.A.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, L.F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E.A.; GARCIA, C.C.M.; BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO P. Oxidative and alkylating damage in DNA. **Mutation Research**, v.544, p.115-127, 2003.
- ³⁴ TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; DAYANE, B.T.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2, p.175-191, 2005.
- ³⁵ MILESI, S.; MASSOT, B.; GONTIER, E.; BOURGAUD, F.; GUCKERT, A. Ruta graveolens L.: a promising species for the production of furanocoumarins. **Plant Science**, v.161, p.189-199, 2001.
- ³⁶ BIGELOW, C.E.; MITRA, S.; KNUECHEL, R.; FOSTER, T.H. ALA- and ALA-hexylester-induced protoporphyrin IX fluorescence and distribution in multicell tumour spheroids. **British Journal of Cancer**, v.85, p.727-734, 2001.
- ³⁷ NLUD-PAKKANEN, S.G.; WAHLFORS, J.; KINEN, K.; PAKKANEN, T.M.; TALAJA, M.; ALA-OPAS, I.M.; ALHAVA, E.; MOORE, R.B. The fluorescence biodistribution and kinetics of aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in the bladder of a rat model with orthotopic urothelial carcinoma. **Journal of Urology**, v.167, p.1848-1853, 2002.
- ³⁸ GREGORIE, H.B.; HORGER, E.O.; WARD, J.L. Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. **Annals of Surgery**, v.167, p.820-828, 1968.
- ³⁹ LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**, v.26, p.1-12, 1961.
- ⁴⁰ BYRNE, C.J.; MARSHALLSAY, L.V.; WARD, A.D. The composition of Photofrin II. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B. Biology**, v.6, p.13-27, 1990.
- ⁴¹ HAHN, S.M.; PUTT, M.E.; METZ, J.; SHIN, D.B.; RICKTER, E.; MENON, C.; SMITH, D.; GLATSTEIN, E.; FRAKER, D.L.; BUSCH, T.M. Photofrin uptake in the tumor and

normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. **Clinical Cancer Research**, v.12, p.5464-5470, 2006.

⁴² SAVELLANO, M.D.; TAYYABA, H. Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, p.431–439, 2003.

⁴³ LOTTNER, C.; BART, K.C.; BERNHARDT, G.; BRUNNER H. Hematoporphyrin-derived soluble porphyrin-platinum conjugates with combined cytotoxic and phototoxic antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.2064-2078, 2002.

⁴⁴ KIM, Y.S.; SONG, R.; KIM, D.H.; JUN, M.J.; SOHN, Y.S. Synthesis, biodistribution and antitumor activity of hematoporphyrin–platinum(II) conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.8, p.1753-1760, 2003.

⁴⁵ M. G. Maslov, **Calculations of electronic spectra of Fe and Co porphyrins and their anionic forms**, *Theoretical and Experimental Chemistry*, 27, 133-139, 1991.

⁴⁶ Woodward R. B et al **The total synthesis of chlorophyll a** *Tetrahedron* 1990,46, 7599-7659.

⁴⁷ OSTER, G.; BROYDE, S.B.; BELLIN, J.S. Spectral properties of chlorophyllin *a*. **Journal of the American Chemical Society**, v.86, p.1309, 1964.

⁴⁸ OSTER, G.; BELLIN, J.S.; BROYDE, S.B. Photochemical properties of chlorophyllin *a*. **Journal of the American Chemical Society**, v.86, p.1313, 1964.

⁴⁹ NEURATH, A.R.; STRICK, N.; HABERFIELD, P.; JIANG, S. Rapid prescreening for antiviral agents against HIV-1 based on their inhibitory activity in site-directed immunoassays. II. Porphyrins reacting with the V3 loop of gp120. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v.31, p.55-63, 1992.

⁵⁰ KAY A.; GRIITZEL M. Artificial Photosynthesis. 1. Photosensitization of TiO₂ solar cells with chlorophyll derivatives and related natural porphyrins. **Physical Chemistry**, v.97, p.6272-6277, 1993.

⁵¹ BECKER, R.S.; ALLISON, J.B. Metalloporphyrins. Electronic spectra and nature of perturbations. I. Transition metal ion derivatives. **Journal of Physical Chemistry**, v.67, p.2662-2669, 1963.

⁵² BHYRAPPA, P.; KRISHNAN, V. Octabromotetraphenylporphyrin and its metal derivatives: electronic structure and electrochemical properties. **Inorganic Chemistry**, v.30, n.2, p.239-245, 1991.

⁵³ VAN DAMME, H.; CRESPI, M.; OBRECHT, F.; CRUZ, M.I.; FRIPIAT, J.J. Acid-base and complexation behavior of porphyrins on the intracrystal surface of swelling clays. Meso-tetraphenylporphyrin and meso-tetra(4-pyridyl) porphyrin on montmorillonites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.66, p.43-54, 1978.

⁵⁴ HUTENER, C.A.; SANDERS, J.K.M. The nature of π - π interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, p.5525-5534, 1990.

-
- ⁵⁵ Kasha, M., Rawls, H.R., and El-Bayoumi, M-A. **The exciton model in molecular spectroscopy.** *Pure Appl. Chem.* (1965) 11, 371-392.
- ⁵⁶ AGGARWAL L.P.F.; BORISSEVITCH I.E. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions successive formation of H and J aggregates. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.63, p.227–233, 2006.
- ⁵⁷ PARKASH, J.; ROBBLEE, J.H.; AGNEW, J.; GIBB, E.; COLLINGS, P.; PASTERNAK, R.F.; DE PAULA, J.C. Depolarized resonance light scattering by porphyrin and chlorophyll a aggregates. **Biophysical Journal**, v.74, p.2089-2099, 1998.
- ⁵⁸ KANO, K.; FUKUDA, K.; WAKAMI, H.; NIHIYABU, R.; PASTERACK, R.F. Factors influencing self-aggregation tendencies of cationic porphyrins in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v.122, p.7494-7502, 2000.
- ⁵⁹ YUSHMANOV, V.E.; TOMINAGA, T.T.; BORISSEVITCH, I.E.; MASATO, H.; TABAK, M. Binding of magnesium and iron tetraphenylporfirine sulfonates to albumin relevant to their contrast properties. **Magnetic Resonance Imaging**, v.14, p.255-261, 1996.
- ⁶⁰ PERUSSI, J.R.; YUSHMANOV, V.E.; MONTE, S.C.; IMASATO, H.; TABAK, M. Interaction of primaquine and chloroquine with ionic micelles as studied by ¹HNMR and electronic absorption spectroscopy. **Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR**, v.27, p.1-15, 1995.
- ⁶¹ BORISSEVITCH, I.E.; TOMINAGA, T.T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. **Analytica Chimica Acta**, v.343, p.281-286, 1997.
- ⁶² SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GUGLIOTTI, M.; GABRIELLI, D.; SBAPTISTA, M.S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, n.5, p.459-468, 2003.
- ⁶³ ENGELMANN, F.M.; ROCHA, S.V.O.; TOMA, H.E.; ARAKI, K.; BAPTISTA M.S. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, n.1/2, p.12–18, 2007.
- ⁶⁴ WEBBER, J.; HERMAN, M.; KESSEL, D.; FROMM, D. Photodynamic treatment of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v.385, p.299-304, 2000.
- ⁶⁵ SIBATA, M.N., TEDESCO, A.C.; MARCHETTI, J.M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, p.131-138, 2004.
- ⁶⁶ JORI, G.; BELTRAMINI, M.; REDDI, E.; SALVATO, B.; PAGNAN, A.; ZIRON, L.; TOMIO, L.; TSANOV, T. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as haematoporphyrin carriers *in vivo*. **Cancer Letters**, v.24, p.291-297, 1984.
- ⁶⁷ MICHELS, S.; SCHMIDT-ERFURTH U. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.44, p.2147-2154, 2003.

-
- ⁶⁸ COSTA, M.A.; PELLERITOB, L.; IZZOA, V.; FIOREB, T.; PELLERITOB, C.; MELISA, M.; MUSMECIC, M.T.; BARBIERI, G. Diorganotin(IV) and triorganotin(IV) complexes of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine induce apoptosis in A375 human melanoma cells, **Cancer Letters**, v.238, p.284–294, 2006.
- ⁶⁹ FIGGE, F.H.J.; WEILAND, G.S.; MANGANIELLO, O.J. Cancer detection and therapy: affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.68, p.640-641, 1948.
- ⁷⁰ CERNAY, T.; ZIMMERMANN, H.W. Selective photosensitization of mitochondria by the lipophilic cationic porphyrin POR10. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.34, n.2/3, p.191-196, 1996.
- ⁷¹ ZIMMERMANN, A.; RITSCH-MARTE, M.; KOSTRON, H. mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, p.611-616, 2001.
- ⁷² ENGELMANN, F.M.; MAYER, I.; GABRIELLI, D.S.; TOMA, H.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; ARAKI, K.; BAPTISTA, M.S., Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.39, p.175–185, 2007.
- ⁷³ TOSSI, A.; BENEDETTI, F.; NORBEDO, S.; SKRBEC, D.; BERTI, F.; ROMEO, D. Small hydroxyethylene-based peptidomimetics inhibiting both HIV-1 and *C. albicans* aspartic proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.4719–4727, 2003.
- ⁷⁴ COZZINI, P.; FORNABAIO, M.; MARABOTTI, A.; ABRAHAM, D.J.; KELLOGG, G.E.; MOZZARELLI, A. Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein–ligand complexes. 1. Models without explicit constrained water. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.2469-2483, 2002.
- ⁷⁵ IKEDA, A.; DOI, Y.; NISHIGUCHI, K.; KITAMURA, K.; HASHIZUME, M.; KIKUCHI, J.; YOGO, K.; OGAWA, T.; TAKEYA, T. Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60]fullerene. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.5, p.1158–1160, 2007.
- ⁷⁶ GABRIELI, D.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.S. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v.79, p.227–232, 2004.
- ⁷⁷ ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1704, p.59-86, 2004.
- ⁷⁸ CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p.279-293, 2004.
- ⁷⁹ BAPTISTA, M.S.; INDIG, G.L. Mechanism of photobleaching of Ethyl violet non-covalently bound to bovine serum albumin. **Chemical Communications**, v.18, 1791-1792, 1997.

-
- ⁸⁰ BORBA, E.B.; AMARAL, C.L.C.; POLITI, M.J.; VILLALOBOS, R.; BAPTISTA, M.S. Photophysical and photochemical properties of pyranine/methyl viologen complexes in solution and in supramolecular aggregates: a switchable complex. **Langmuir**, v.16, p.5900-5907, 2000.
- ⁸¹ JUNQUEIRA, H.C.; SEVERINO, D.; DIAS, L.G.; GUGLIOTTI, M.; BAPTISTA, M.S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.4, n.11, p.2320-2328, 2002.
- ⁸² RODRIGUES, M.A.; TADA, D.B.; POLITI, M.J.; BAPTISTA, M.S. Photophysical and photochemical properties of porphyrin and naphthalene diimide modified silica-gel particles. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.304, p.116-125, 2002.
- ⁸³ RODRIGUES, M.A.; BEMQUERER, M.P.; POLITI, M.J.; BROCHSZTAIN, S.; MIRANDA, M.T.M.; ; BAPTISTA, M.S.; BEMQUERER, M.P. Porphyrin and naphthalenediimide functionalized silica-gel particles: photophysical properties. **Chemistry Letters**, v.6, p.604-605, 2002.
- ⁸⁴ OLIVEIRA, C.S.; BRANCO, K.P.; BAPTISTA, M.S.; INDIG, G.L. Solvent and concentration effects on the visible spectra of tripara-dialkylamino-substituted triarylmethane dyes in liquid solutions. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.58, p.2971-2982, 2002.
- ⁸⁵ ARMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D.D. **Purification of laboratory chemicals**. 4.ed. Oxford, Boston: Butterworth Heinemann, 1997. p.65.
- ⁸⁶ TAUBER, A.Y.; HELAJA, J.; KILPELÄINEN, I.; HYNINEN, P.H. Chlorophylls. 8. Synthesis of a new chlorophyll derivative and anthraquinone-based dyad and triad molecules for executing photoinduced electron transfer. **Acta Chemica Scandinavica**, v.51, n.1, p.88-93, 1997.
- ⁸⁷ KASUGA, K.; HAYASHI, H.; HANDA, M. Photoreduction of methylviologen with a water-soluble phthalocyaninatozinc(II) complex in an aqueous solution. **Chemistry Letters**, v.11, p.1877-1880, 1991.
- ⁸⁸ MUROV, S.L.; CARMICHAEL, I.; HUG, G.L. **Handbook of photochemistry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.30, p.56, 114.
- ⁸⁹ WILKINSON, F.; HELMAN, W.P.; ROSS, A.B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution. **Journal of Physical Chemistry**, v.22, p.113-262, 1993.
- ⁹⁰ REDMOND, R.W.; GAMLIN, J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochemistry and Photobiology**, v.70, p.391-475, 1999.
- ⁹¹ BRONSHTEIN, I.; AFRI, M.; WEITMAN, H.; FRIMER, A.A.; SMITH, K.M.; EHRENBERG, B. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. **Biophysical Journal**, v.87, p.1155-1164, 2004.

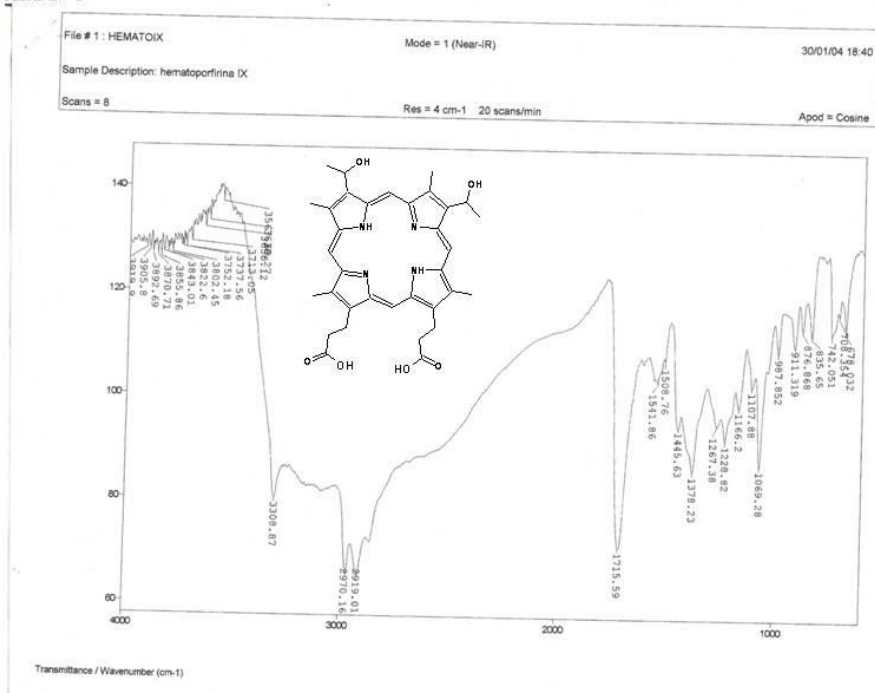
- ⁹² Pierre, M. B. R.; Marchetti, J. M.; TEDESCO, A. C. and Bentley, M. V. L. B. **Potential incorporation of 5-aminolevulinic acid in micelles and stratum corneum lipids liposomes: fluorescence quenching studies.** *Brazilian Journal of Biology*, (2001) 37, 355-361.
- ⁹³ IKEDA, A.; DOI, Y.; NISHIGUCHI, K.; KITAMURA, K.; HASHIZUME, M.; KIKUCHI, J.; YOGO, K.; OGAWA, T.; TAKEYA, T. Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60]fullerene. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.5, p.1158–1160, 2007.
- ⁹⁴ SCHNECKENBURGER, H.; STOCK, K.; LYTTEK, M.; STRAUSS, W.S.; SAILER, R., Fluorescence lifetime imaging (FLIM) of rhodamine 123 in living cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.127–131, 2004.
- ⁹⁶ TAIMA, H.; OKUBO, A.; YOSHIOKA, N.; INOUE, H. Synthesis of cationic water-soluble esters of chlorin e₆. **Tetrahedron Letters**, v.46, p.4161–4164, 2005.
- ⁹⁷ DAVIS, M.; SZKUTA, H.; KRUBSACK, A.J. Chemistry of the thionil halides. **Mechanisms of Reactions of Sulfur Compounds**, v.5, p.3-57, 1970.
- ⁹⁸ HAYLET, A.K.; FORBES, E.; MAC LENNAN, A.; TRUSCOTT, T.G.; MOORE, J.V. Novel asymmetric photosensitizers: an *in vitro* study. **Cancer Letters**, v.105, p.187-193, 1996.
- ⁹⁹ JEAN-PIERRE, B.; FREDERIC, C.; JEAN-PIERRE, G.; ANNE-VALENTINE, V.L.; DIDIER, R.; YVES, L. Covalent grafting of optically active molecules on silica gels. **AIChE Journal**, v.43, p.2820-2826, 1997.
- ¹⁰⁰ FRIMER A.A. **Singlet O₂: reaction model and products.** Boca Raton: CRC Press, 2000. v.2, pt.1.
- ¹⁰¹ HAYLETT, A.K.; MCNAIRA, F.I.; MCGARVEY, D.; DODDA, N.J.F.; FORBES, E.; TRUSCOTT, T.G.; MOORE, J.V. Singlet oxygen and superoxide characteristics of a series of novel asymmetric photosensitizers. **Cancer Letters**, v.112, p.233-238, 1997.
- ¹⁰² PASTERNAK, R.F.; COLLINGS P.J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. **Science**, v.269, p.935-939, 1995.
- ¹⁰³ LIA, X.; LIA, D.; HAN, M.; CHEN, Z.; ZOU, G. Neutral porphyrin J-aggregates in premicellar SDS solution. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.256, p.151–156, 2005.
- ¹⁰⁴ ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T.; GILLAN, J.M.N. Micellar properties of drugs: properties of micellar aggregates of phenothiazines and their aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.63, p.6988–993, 2006.
- ¹⁰⁵ BUJDÁK, J. Effect of the layer charge of clay minerals on optical properties of organic dyes: a review. **Applied Clay Science**, v.34, p.58–73, 2006.

-
- ¹⁰⁶ MELLISH, J.K.; COX, D.R.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, B.S. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, n.4, p.392-397, 2002.
- ¹⁰⁷ GUNTER, K.K.; GUNTER, T.E. Transport of calcium by mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.26, p.471-485, 1994.
- ¹⁰⁸ TAVARES NUNES, N.S.; SGUILLA, F.S.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.2, p.273-284, 2004.
- ¹⁰⁹ OLIVEIRA, C.S. **Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores cristal violeta e azul de metileno em sistemas microheterogêneos e em células cancerosas em cultura**. São Paulo, 2006. 195p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- ¹¹⁰ KLEIN, B.Y.; GAL, I.; HARTSHTARK, Z.; SEGAL D.J. Induction of osteoprogenitor cell-differentiation in rat marrow stroma increases mitochondrial retention of rhodamine 123 in stromal cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.53, n.3, p.190-197, 1993.
- ¹¹¹ ALVAREZ, G.M.; PRÍNCIPE, F.M.; MILANESIO, E.; DURANTINI, E.N.; RIVAROLA, V. Photodynamic damages induced by a monocationic porphyrin derivative in a human carcinoma cell line. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, p.2504–2512, 2005.
- ¹¹² CHERNYAEVA, E.B.; KOROTEEV, N.I.; LITINSKAYA, L.L.; PUGACHEVA, N.V.; VARDANYAN, A.G. Intracellular sensitizer fluorescence: microfluorimetry and fluorescent spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology: B, Biology**, v.8, n.1, p.39-50, 1990.

APÊNDICES

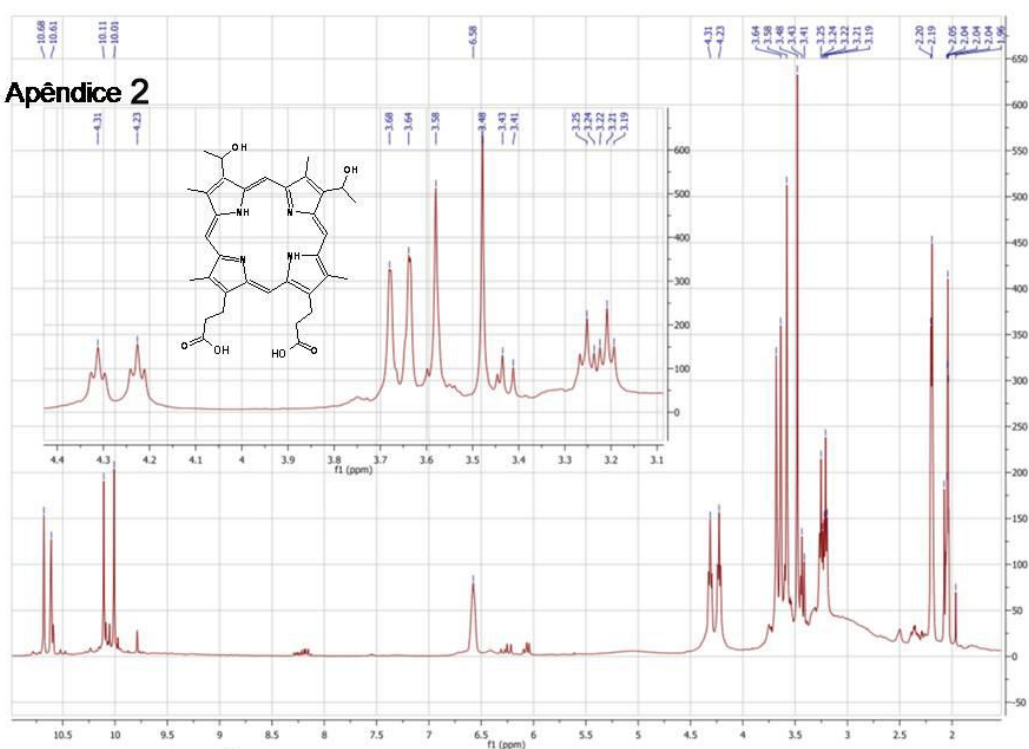
Espectroscopia e Espectrometria

Apêndice 1



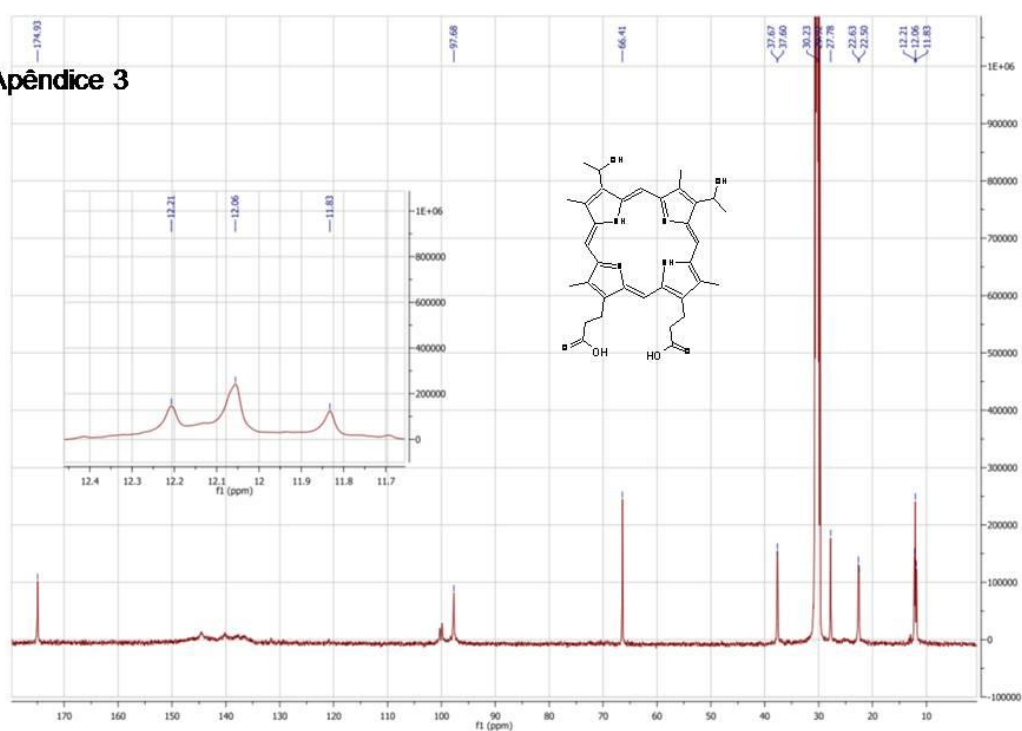
Espectro IV em KBr para Hp IX

Apêndice 2



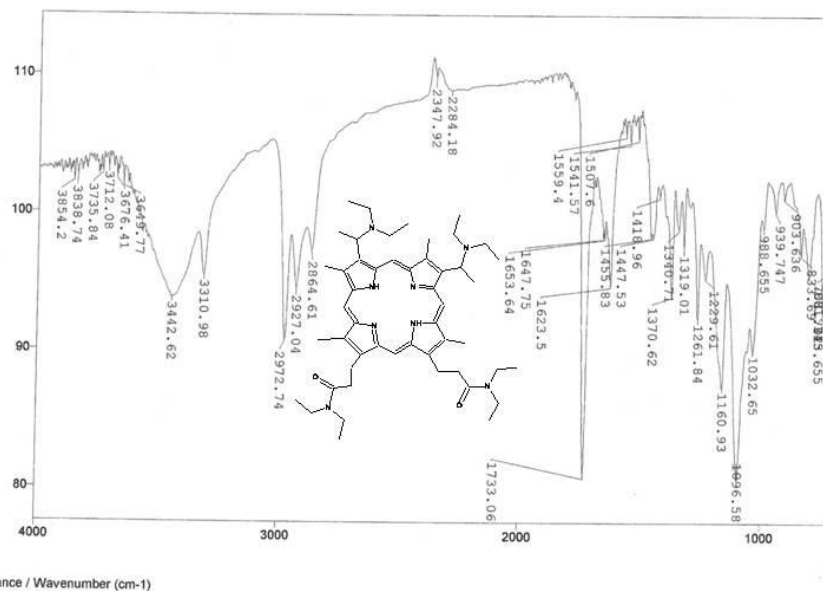
Espectro de RMN ¹H, Hp IX, a 500MHz, CDCl₃ obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 3

Espectro de RMN ^{13}C Hp IX, à 500MHz, CDCl_3 obtido por 780 minutos de aquisição

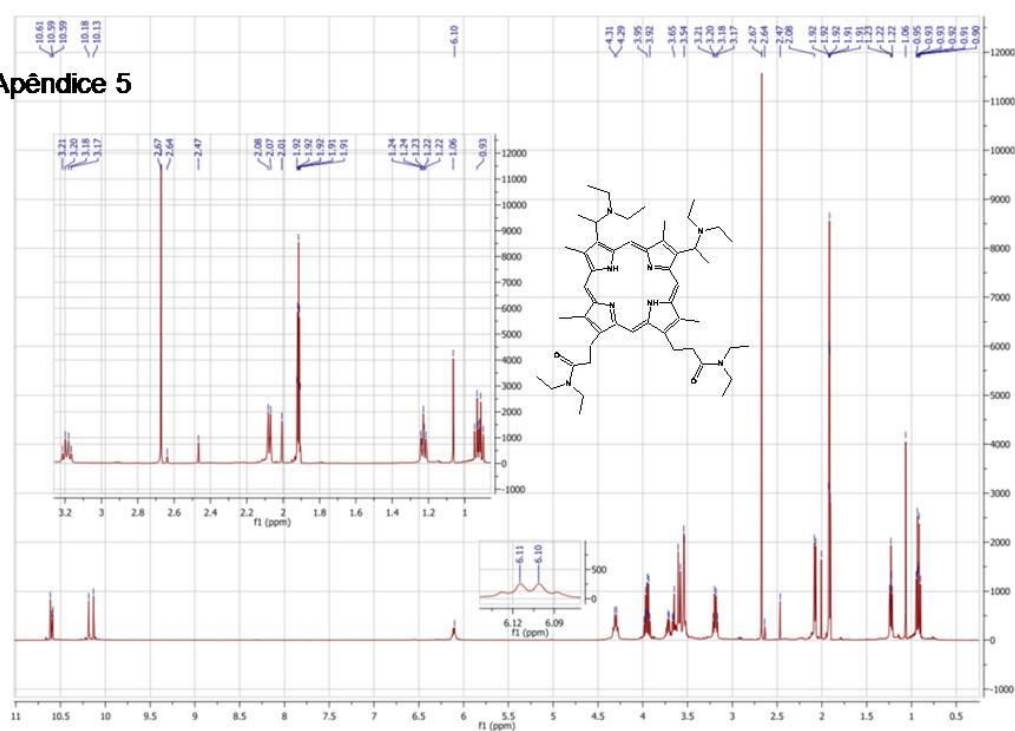
Apêndice 4

File # 1 : HEAMIDA Mode = 1 (Near-IR) 15/03/04 17:16
 Sample Description: ar
 Scans = 8 Res = 4 cm $^{-1}$ 20 scans/min Apod = Cosine



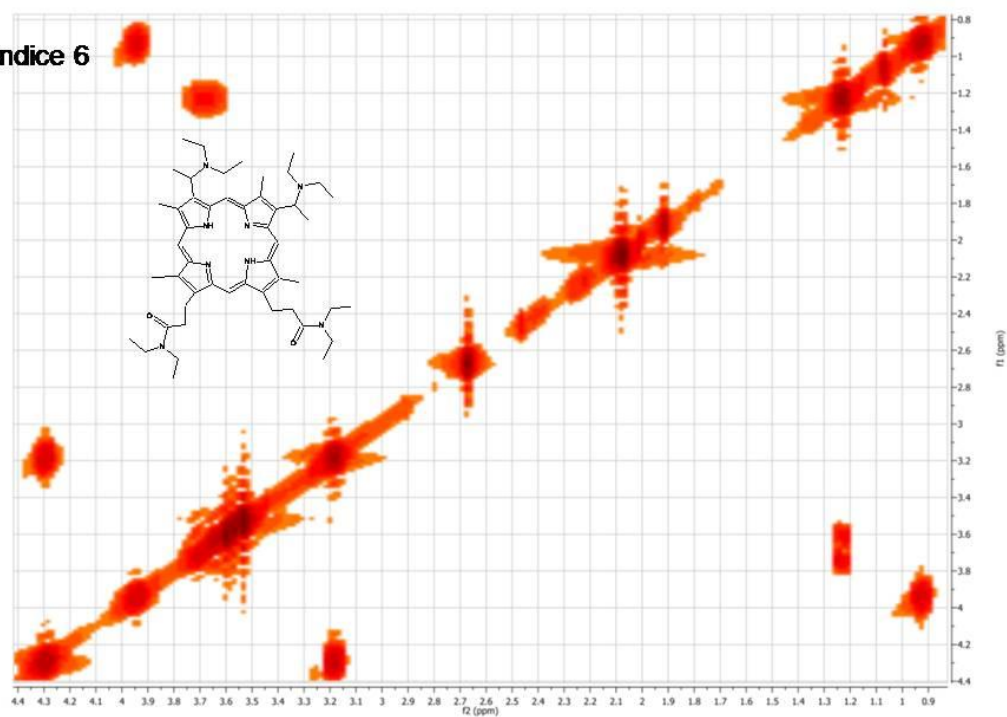
Espectro IV em KBr para HAA

Apêndice 5



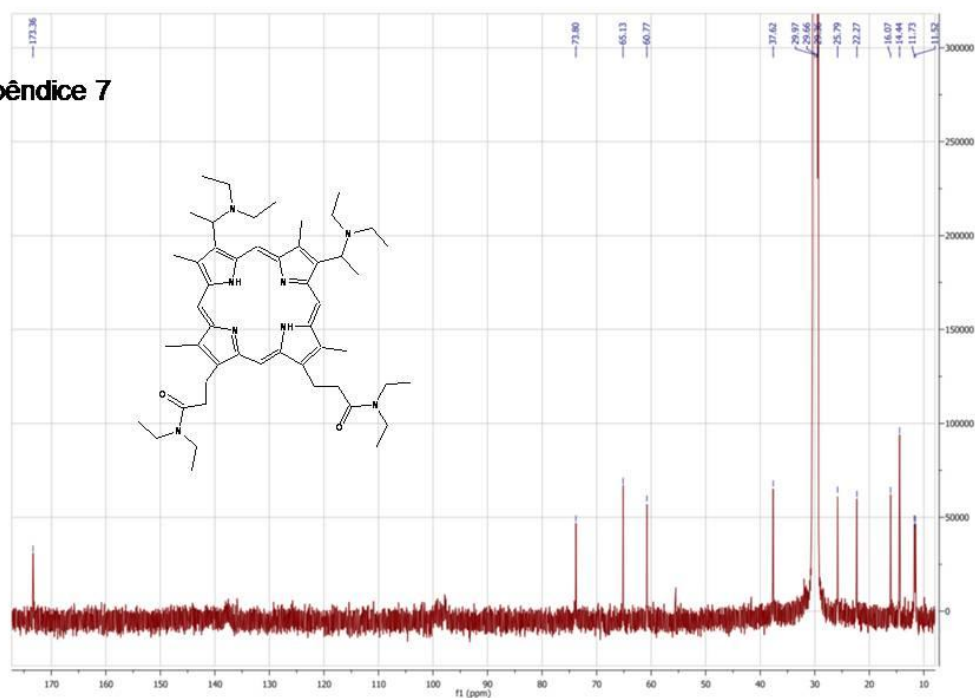
Espectro de RMN ^1H , HAA, a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 6



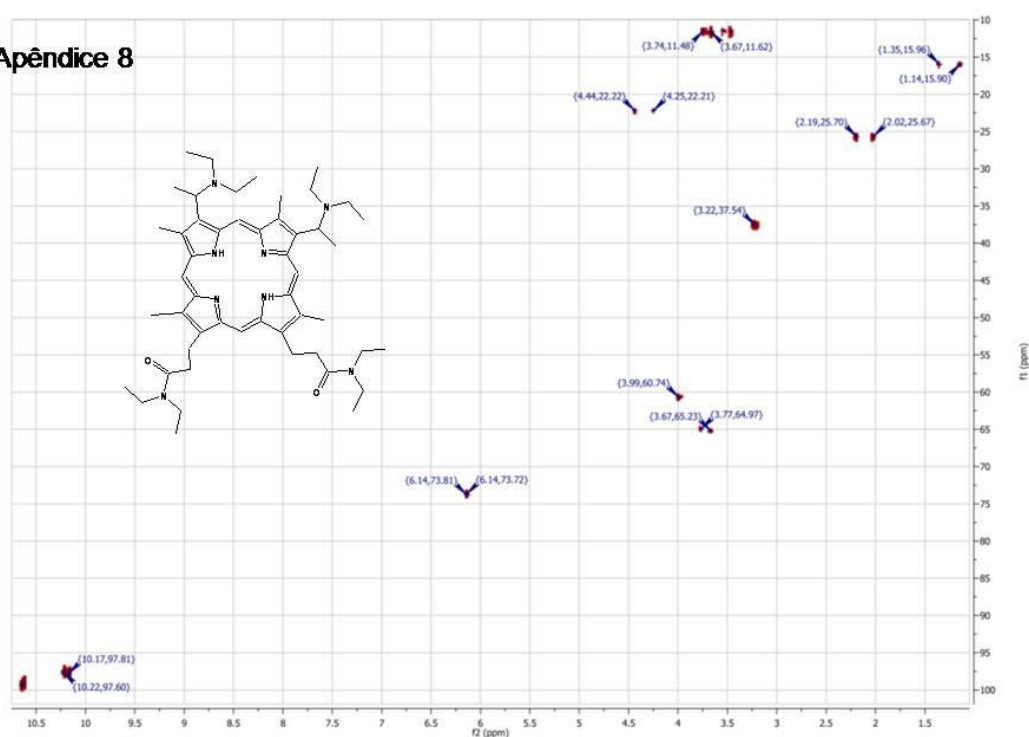
Espectro de RMN 2D cosy, para HAA, a 500MHz, CDCl_3 obtido por 120 minutos de aquisição

Apêndice 7



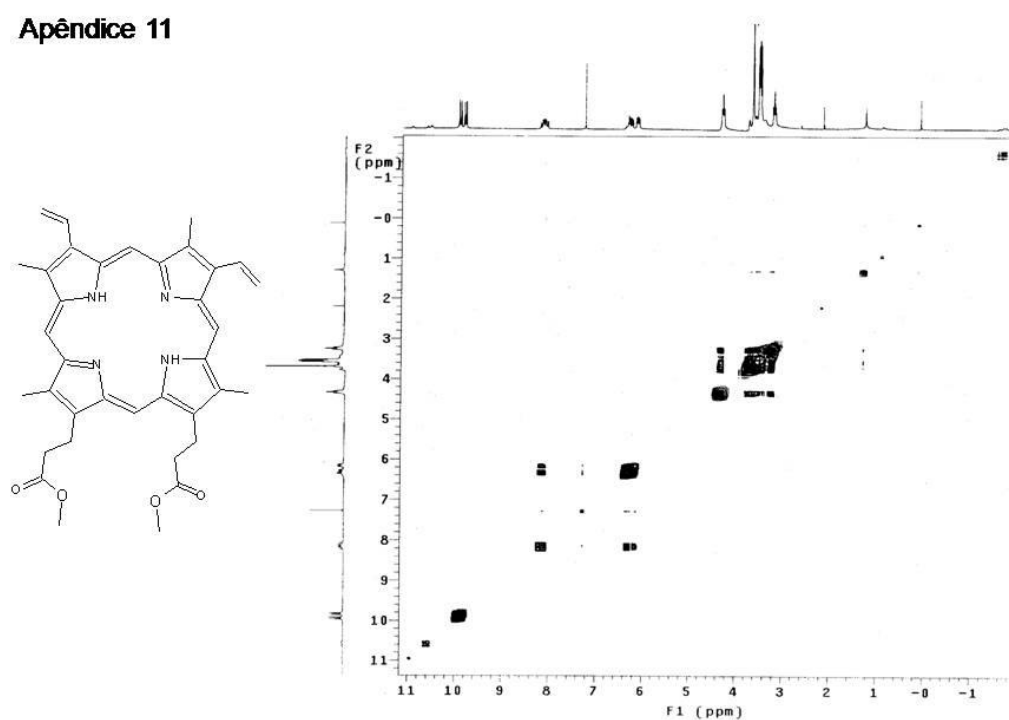
Espectro de RMN ^{13}C para HAA, a 500MHz, CDCl_3 obtido por 720 minutos de aquisição

Apêndice 8



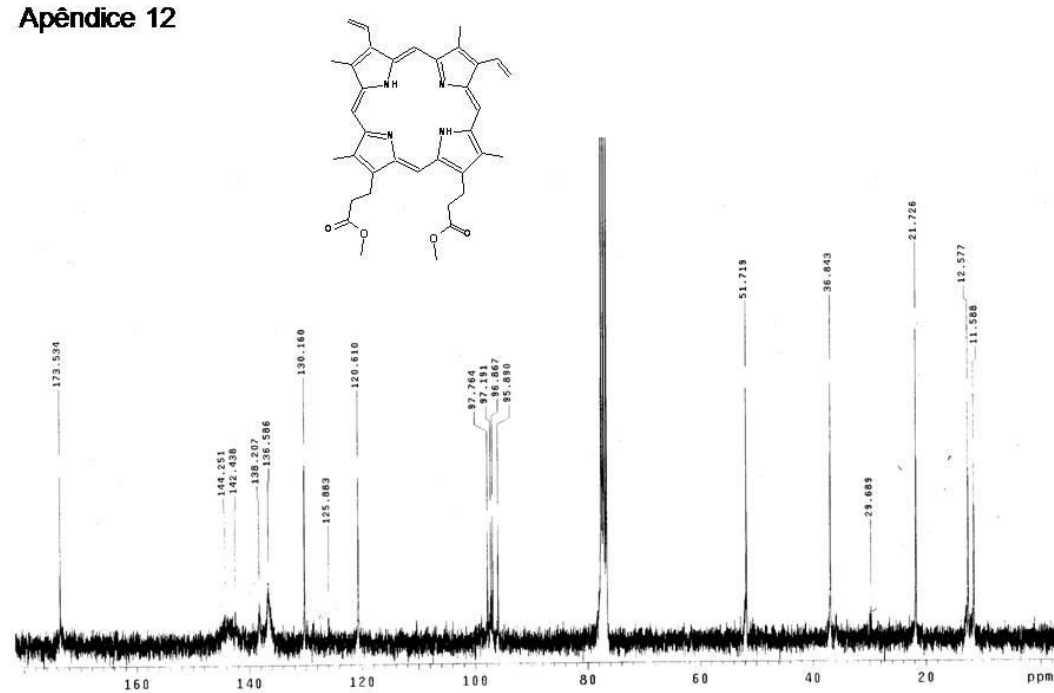
Espectro de RMN 2D, hetcor para HAA, a 500MHz, CDCl_3 obtido por 420 minutos de aquisição

Apêndice 11



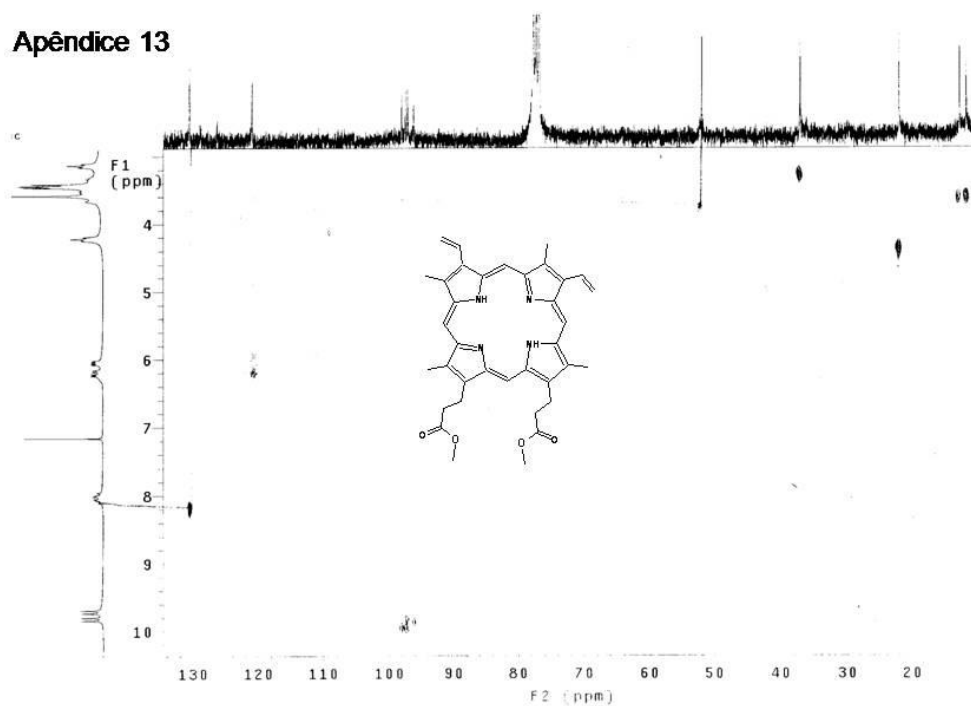
Espectro de RMN 2D, cosy, para Ppmet a 300MHz, CDCl_3 obtido por 240 minutos de aquisição

Apêndice 12



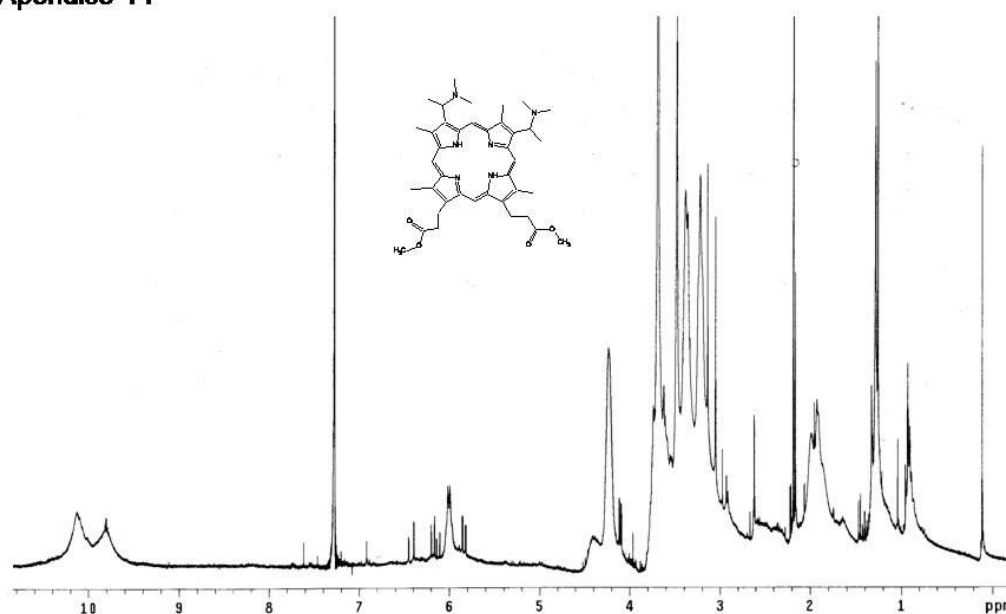
Espectro de RMN ^{13}C , para Ppmet a 300MHz, CDCl_3 obtido por 1440 minutos de aquisição

Apêndice 13



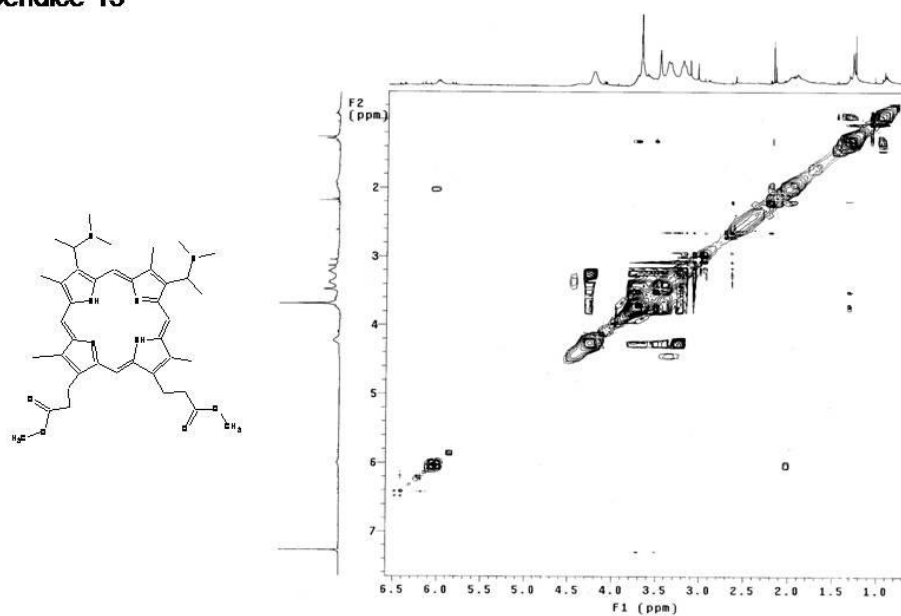
Espectro de RMN 2D hetcor, para Ppmet a 300MHz, CDCl_3 obtido por 1440 minutos de aquisição

Apêndice 14



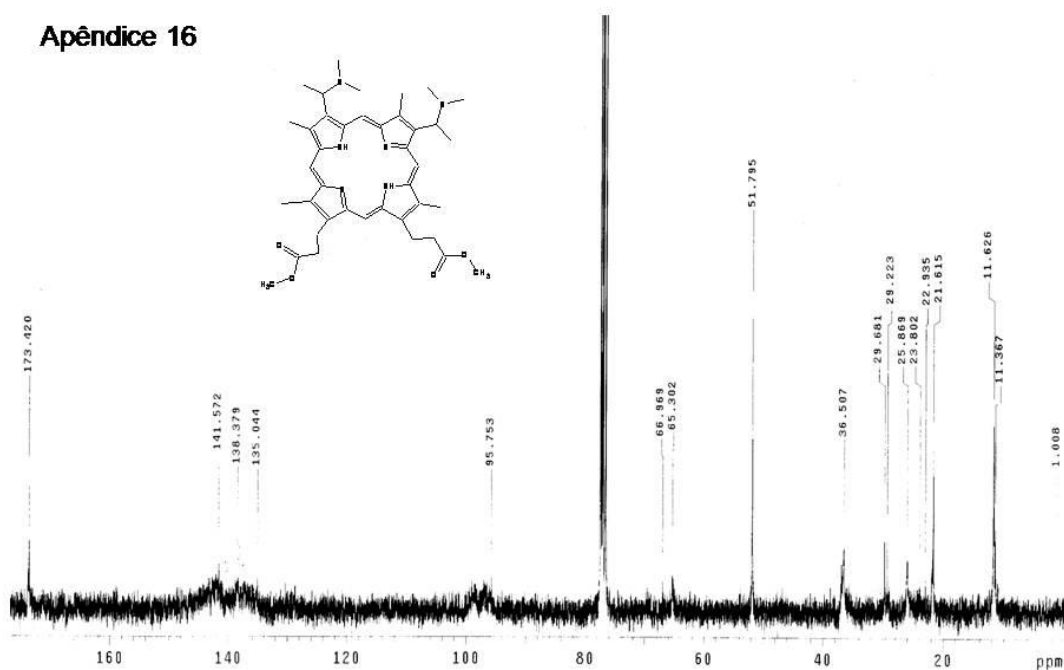
Espectro de RMN ^1H para PpmA a 300 MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 15



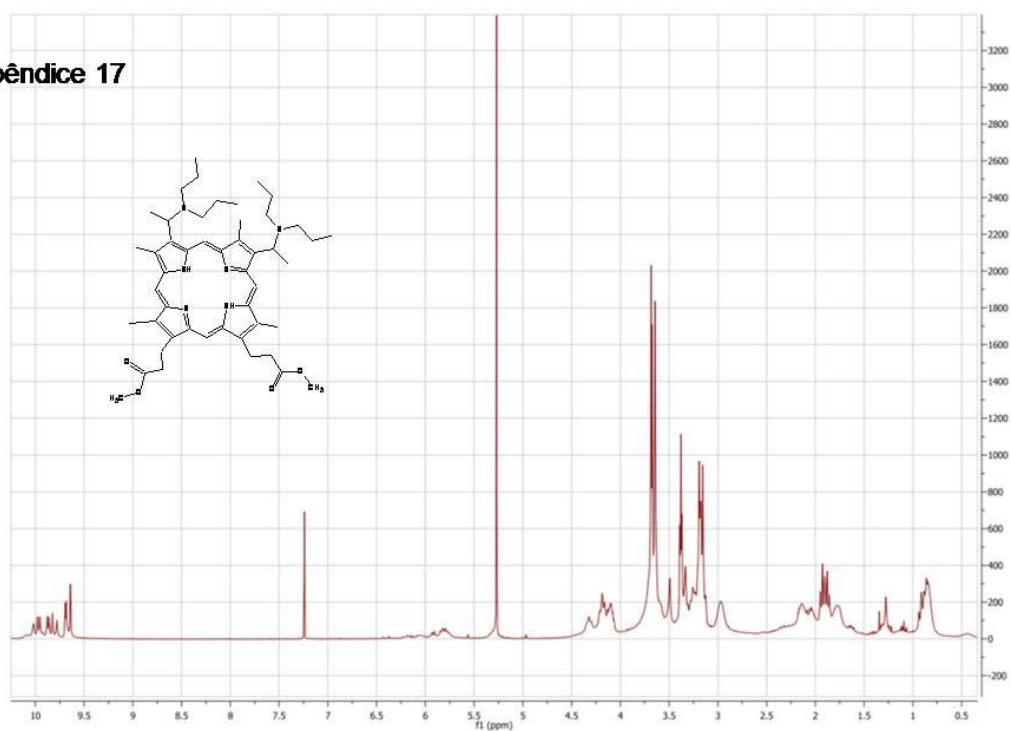
Espectro de RMN 2D, cosy, para PpmA a 300MHz, CDCl_3 obtido por 520 minutos de aquisição

Apêndice 16



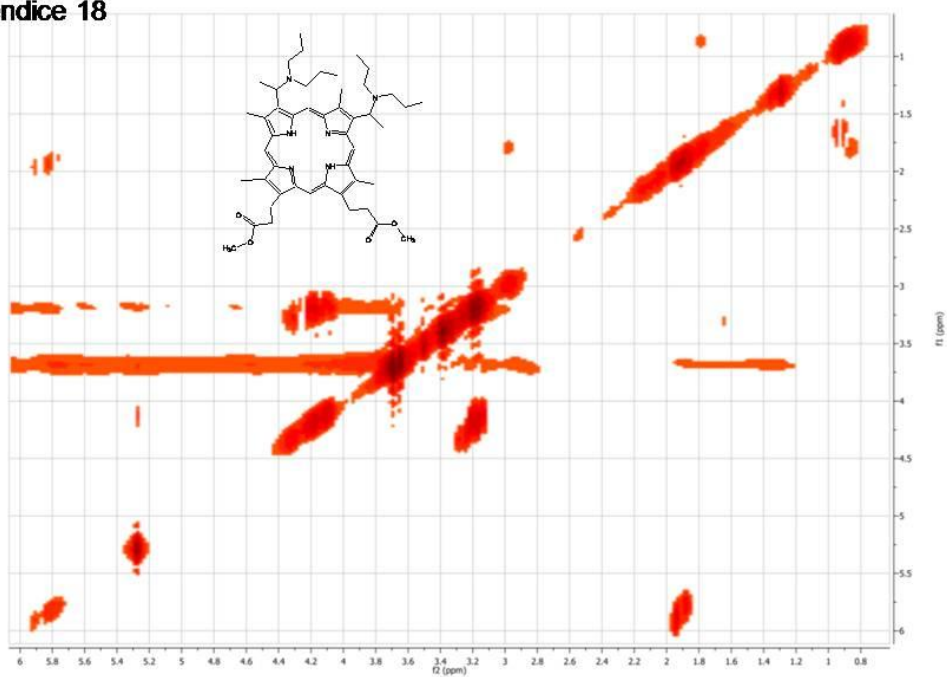
Espectro de RMN ^{13}C , para PpmA a 300MHz, CDCl_3 obtido por 1380 minutos de aquisição

Apêndice 17



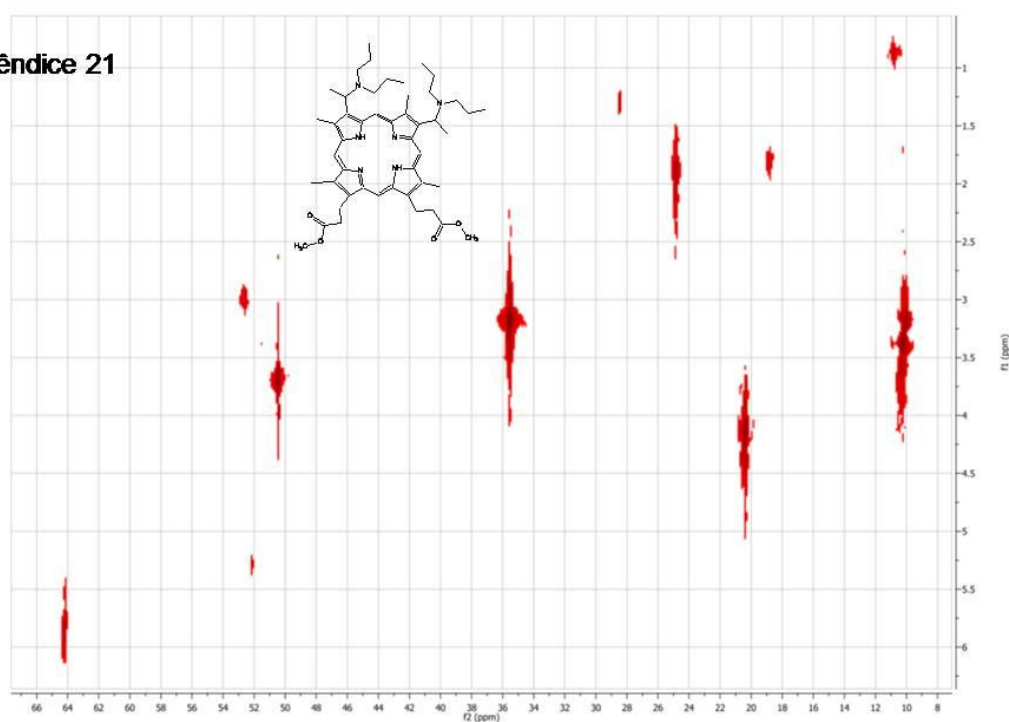
Espectro de RMN ^1H para PppA a 300 MHz, CDCl₃ obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 18



Espectro de RMN 2D, cosy, para PppA a 300MHz, CDCl₃ obtido por 480 minutos de aquisição

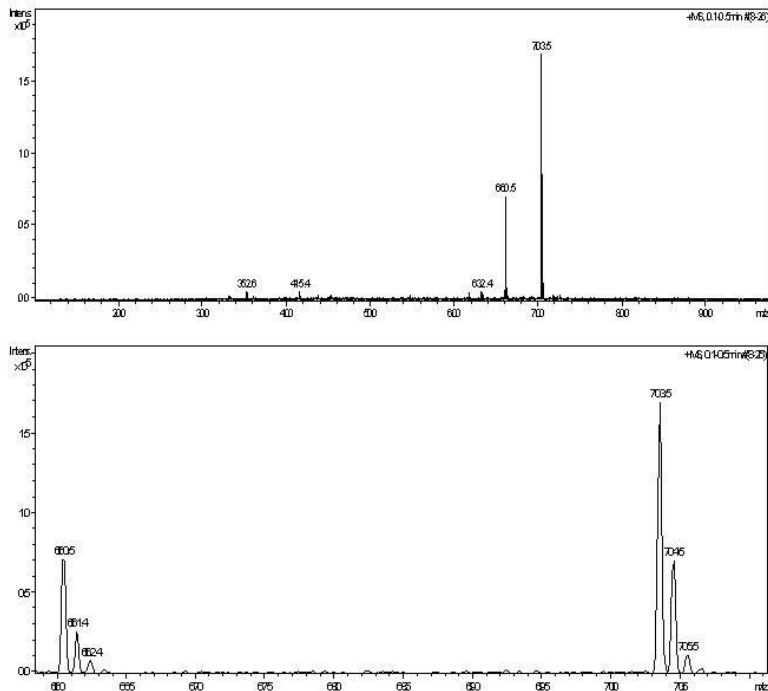
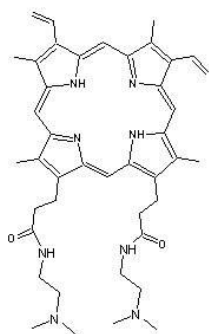
Apêndice 21



Espectro de RMN 2D hetcor, para PppA a 300MHz, CDCl_3 obtido por 930 minutos de aquisição

Apêndice 22

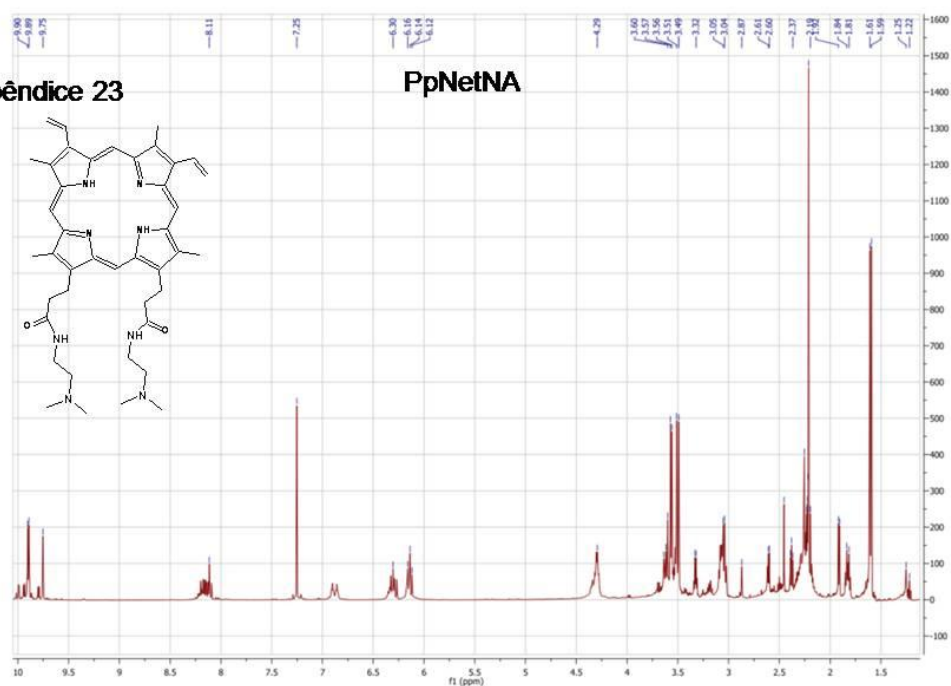
PpNetNA



Espectro de massa obtido para PpNetNA, por infusão direta

Apêndice 23

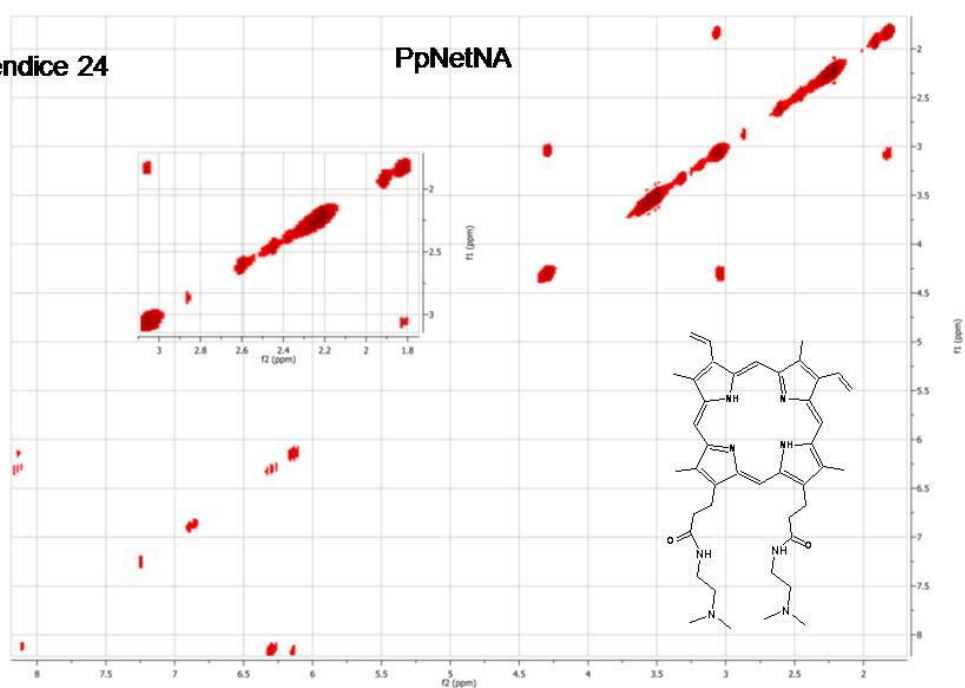
PpNetNA



Espectro de RMN ^1H para PpNetNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 24

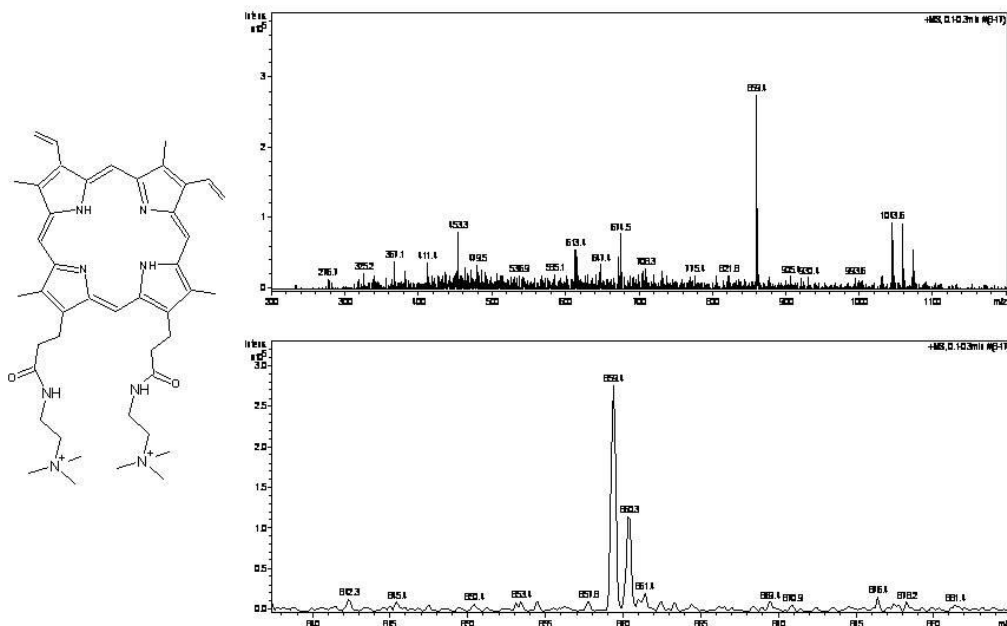
PpNetNA



Espectro de RMN 2D cosy, para PpNetNA a 500 MHz, CDCl₃ obtido por 60 minutos de aquisição

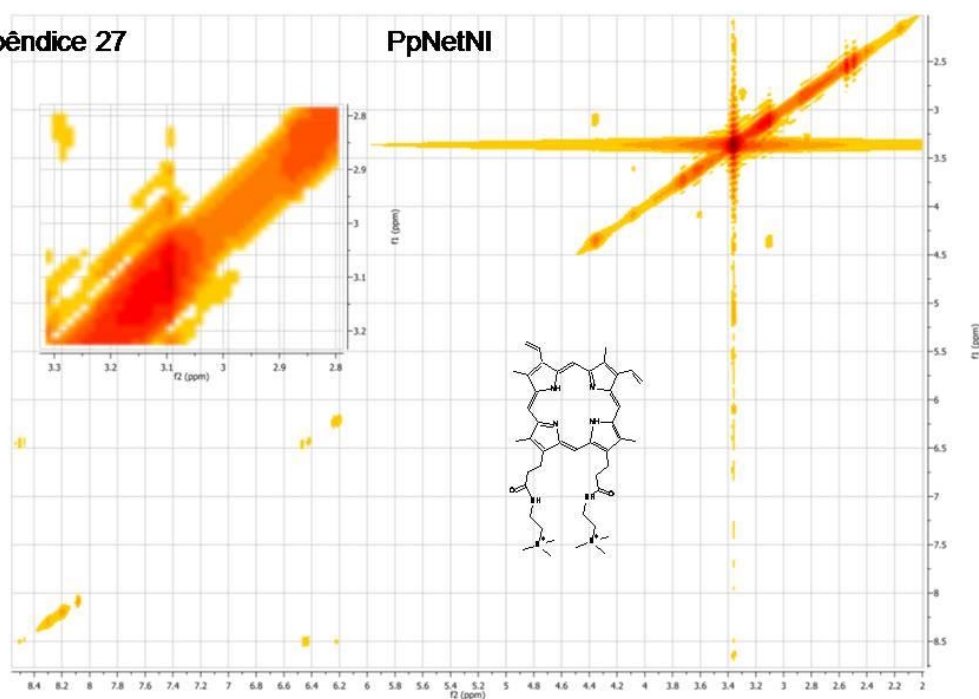
Apêndice 25

PpNetNI



Apêndice 27

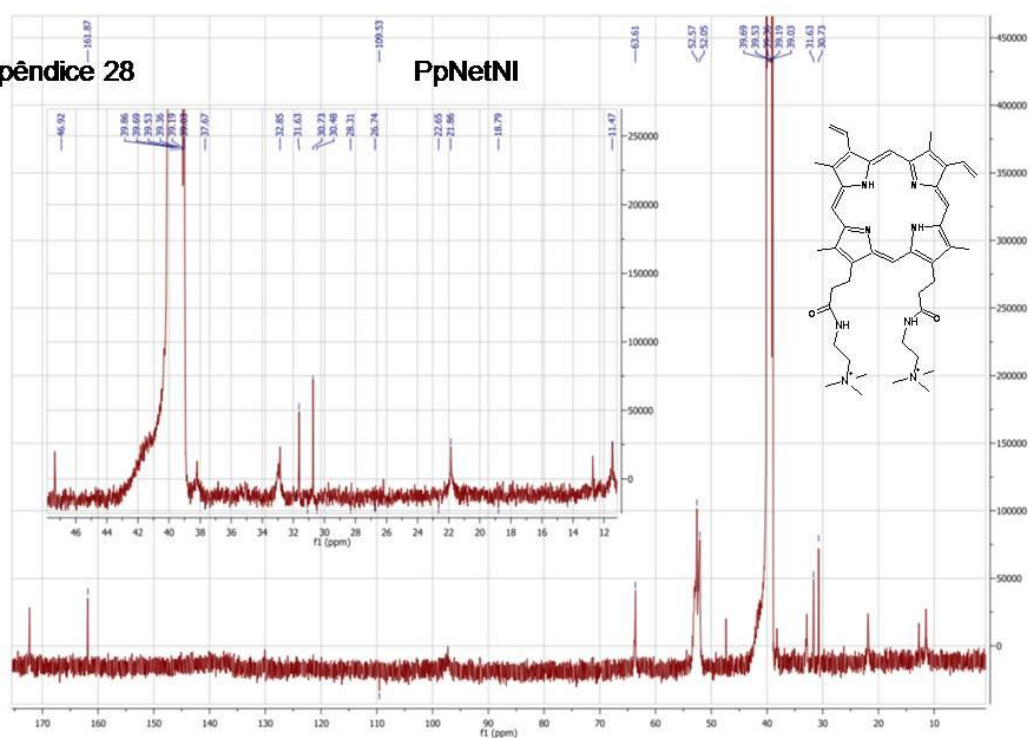
PpNetNI



Espectro de RMN2D cosy, para PpNetNI a 500MHz, DMSO obtido por 120 minutos de aquisição

Apêndice 28

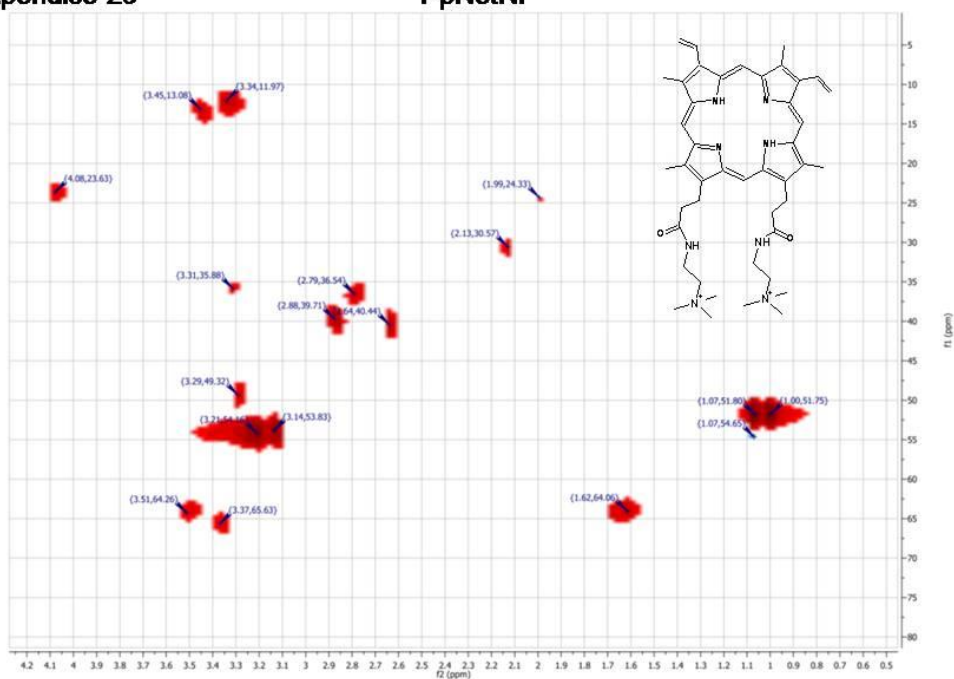
PpNetNI



Espectro de RMN ^{13}C , para PpNetNI a 500MHz, DMSO obtido por 600 minutos de aquisição

Apêndice 29

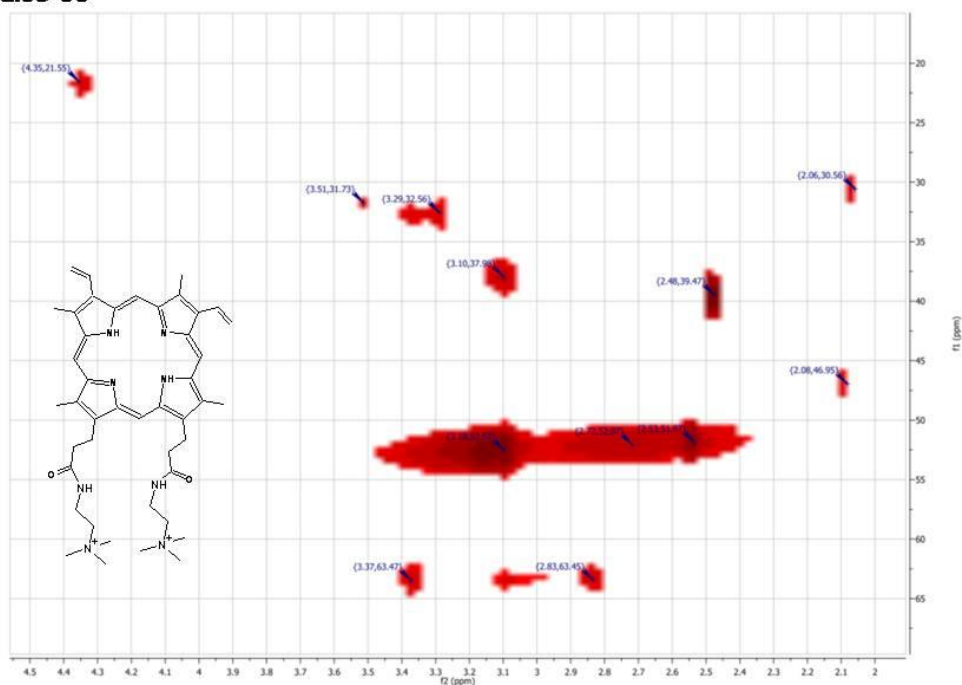
PpNetNI



Espectro de RMN 2D hetcor, para PpNetNI a 500MHz, DMSO obtido por 420 minutos de aquisição (Ampliação)

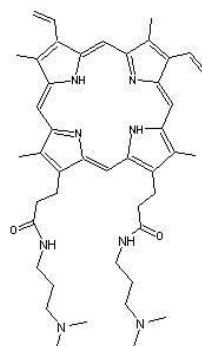
Apêndice 30

PpNetNI

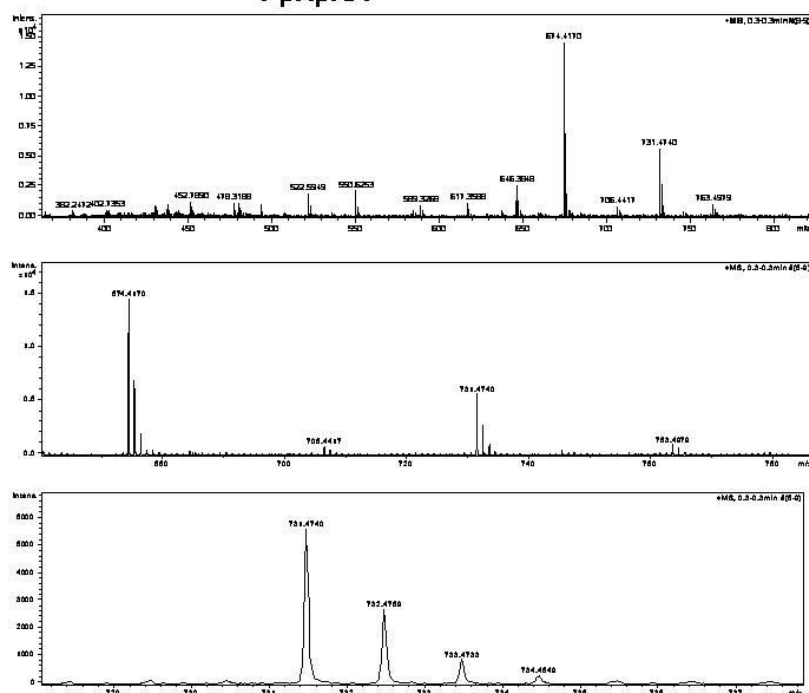


Espectro de RMN 2D hetcor, para PpNetNI a 500MHz, DMSO obtido por 420 minutos de aquisição (Ampliação)

Apêndice 31

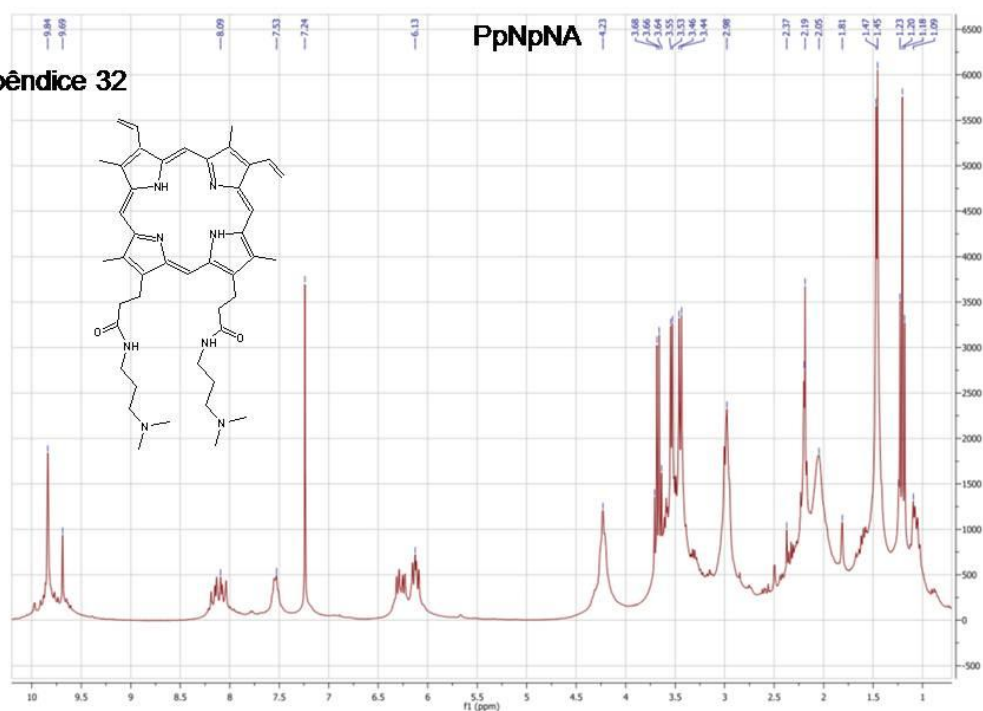


PpNpNA



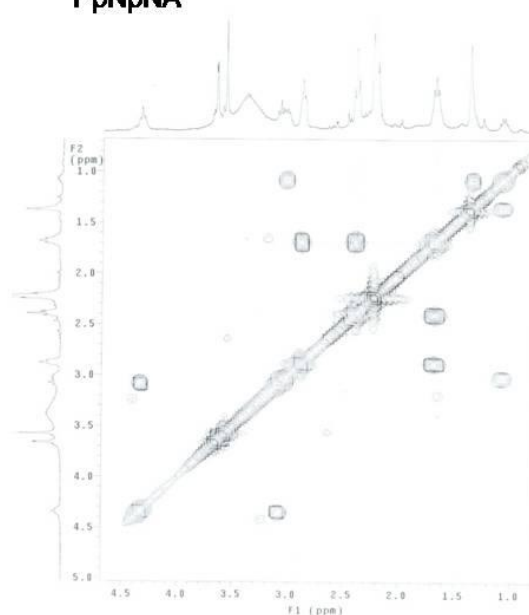
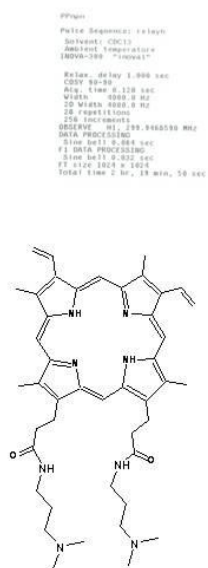
Espectro de massa para PpNpNA obtido por infusão direta

Apêndice 32

Espectro de RMN ^1H , para PpNpNA a 300MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 33

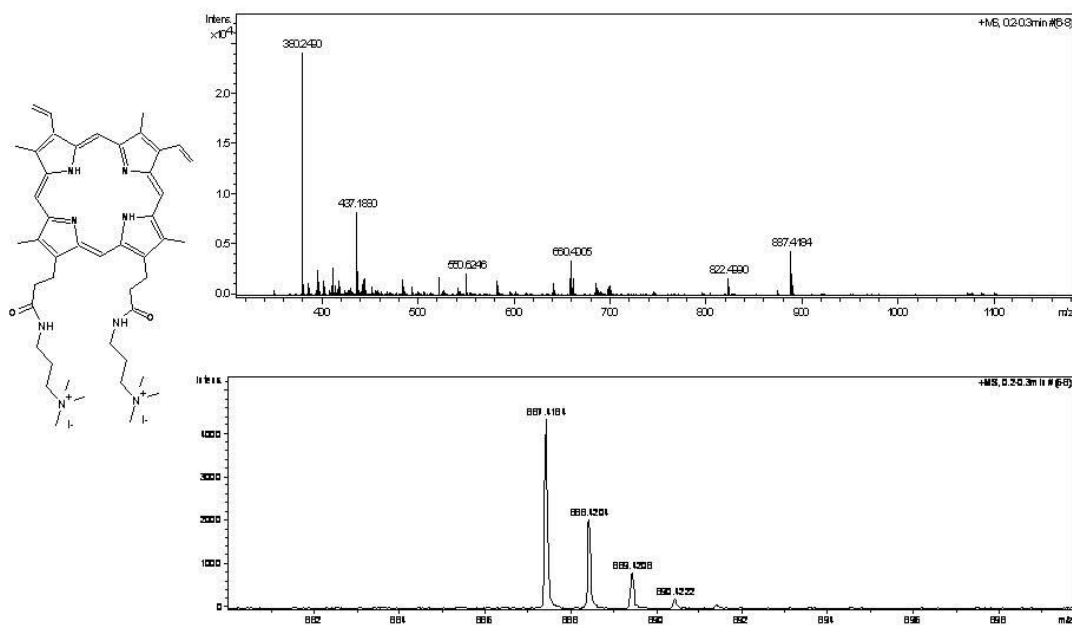
PpNpNA



Espectro de RMN2D cosy, para PpNpNA a 300MHz, CDCl₃ obtido por 120 minutos de aquisição

Apêndice 34

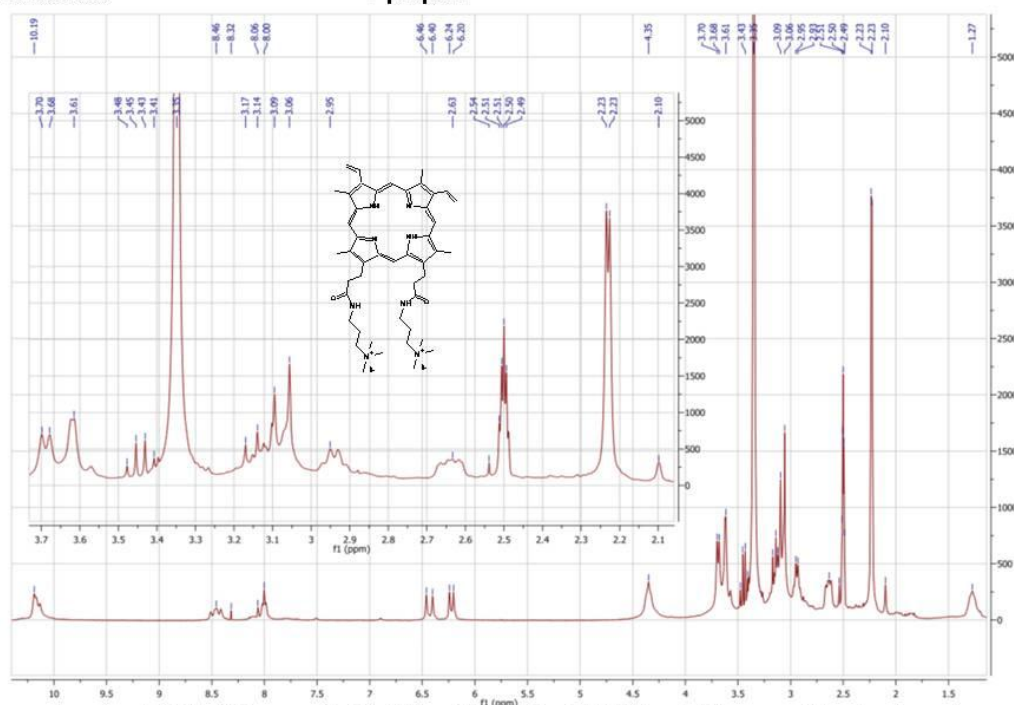
PpNpNI



Espectro de massa Para PpNpNI obtido por infusão direta

Apêndice 35

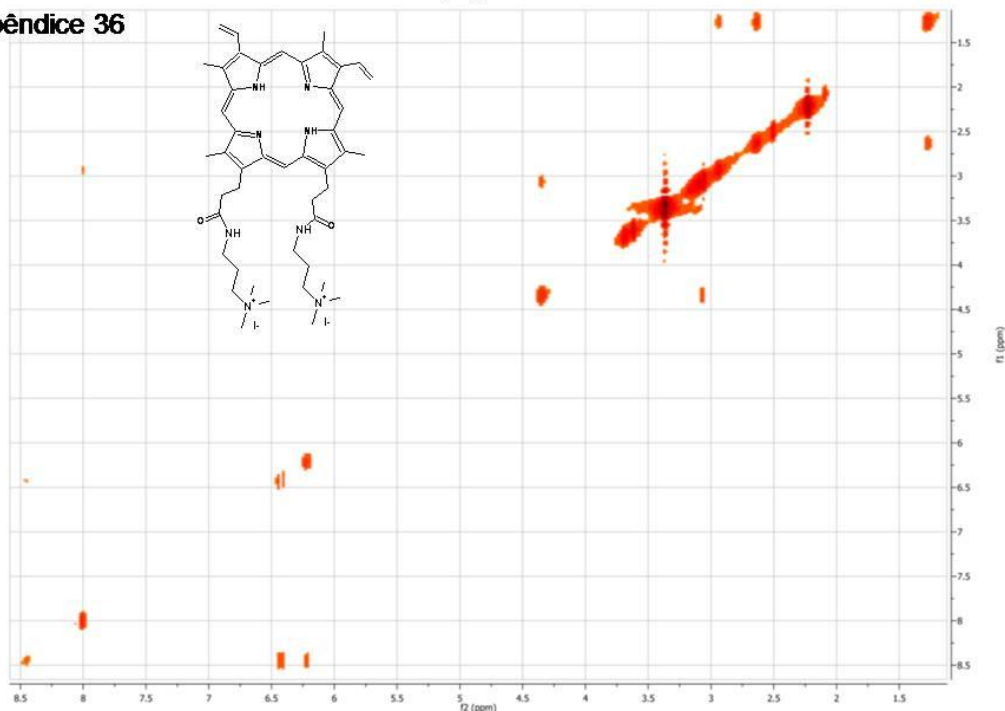
PpNpNI



Espectro de RMN ^1H para PpNpNI a 500MHz, DMSO obtido por 60 minutos de aquisição

PpNpNI

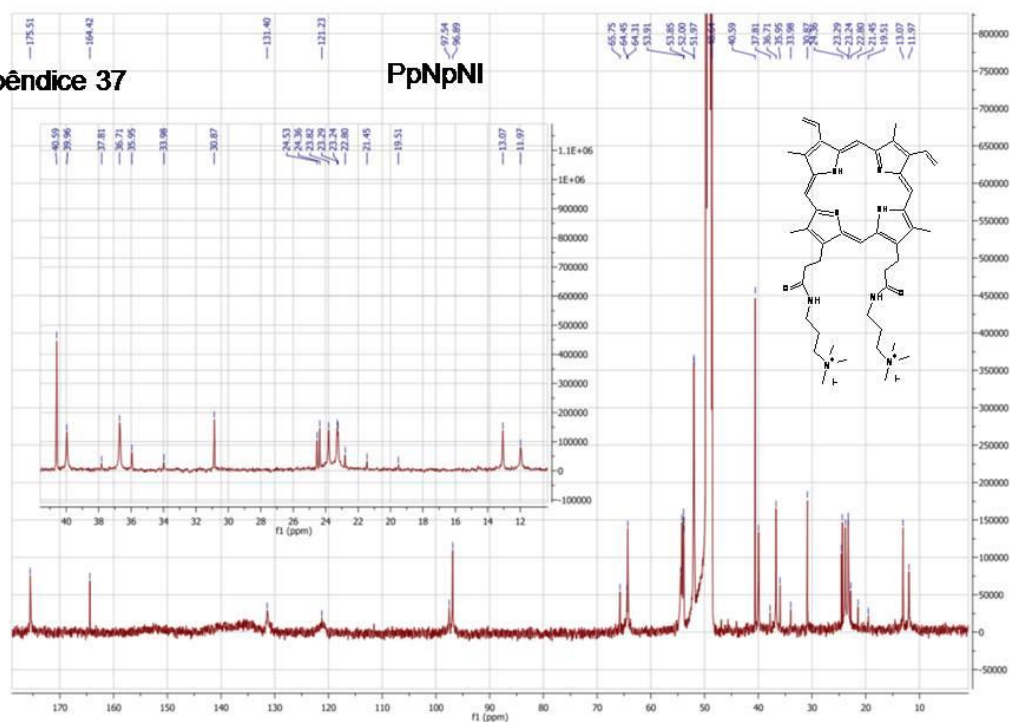
Apêndice 36



Espectro de RMN2D cosy, para PpNpNI a 500MHz, DMSO obtido por 120 minutos de aquisição

Apêndice 37

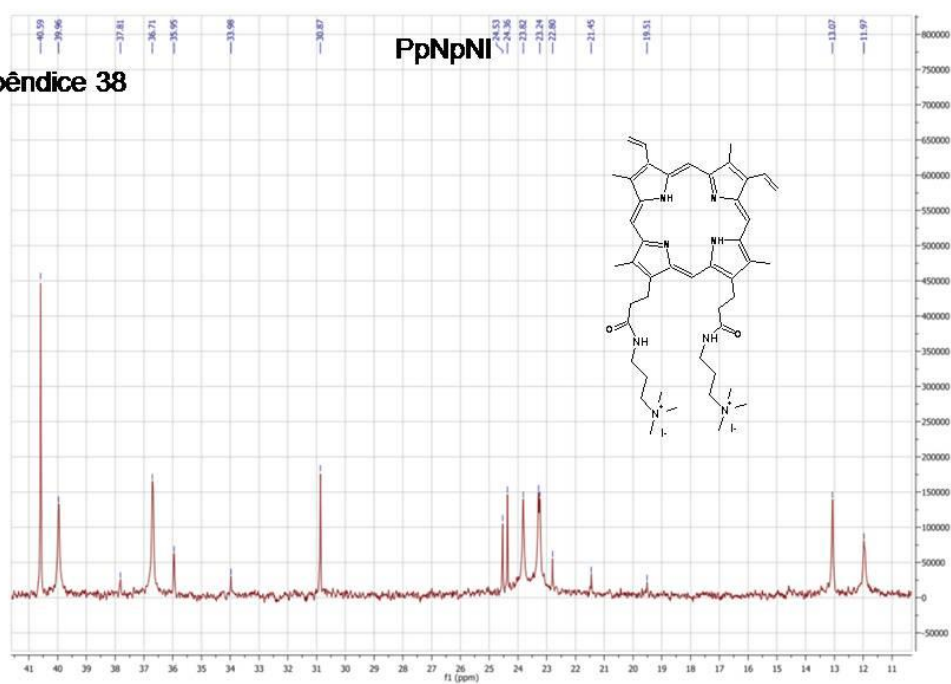
PpNpNI



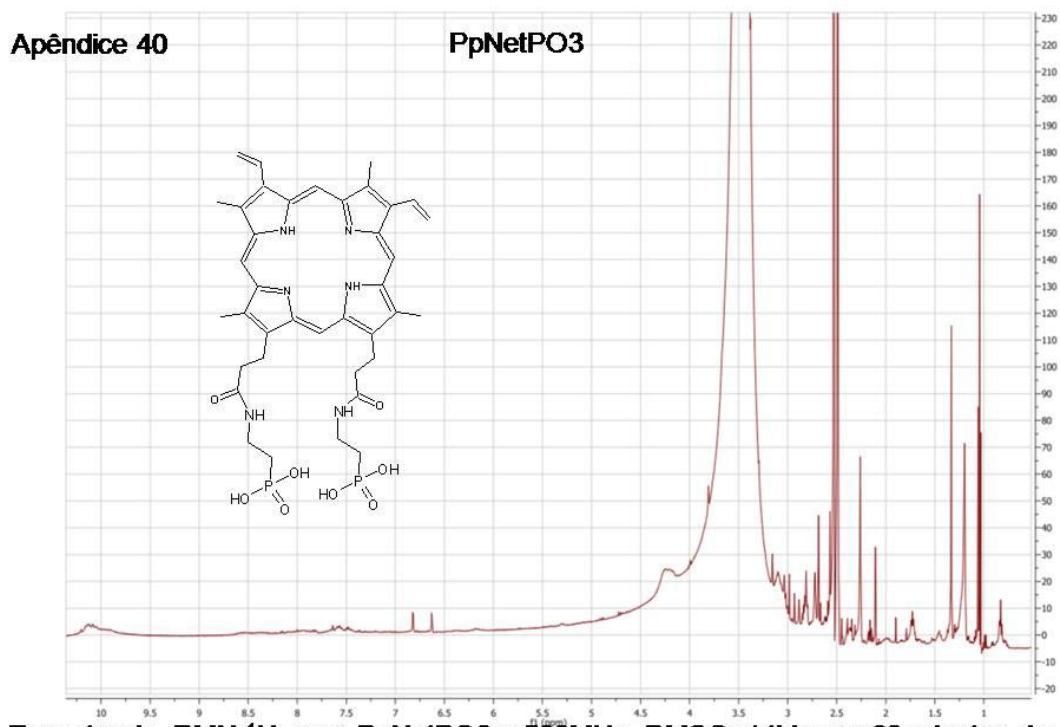
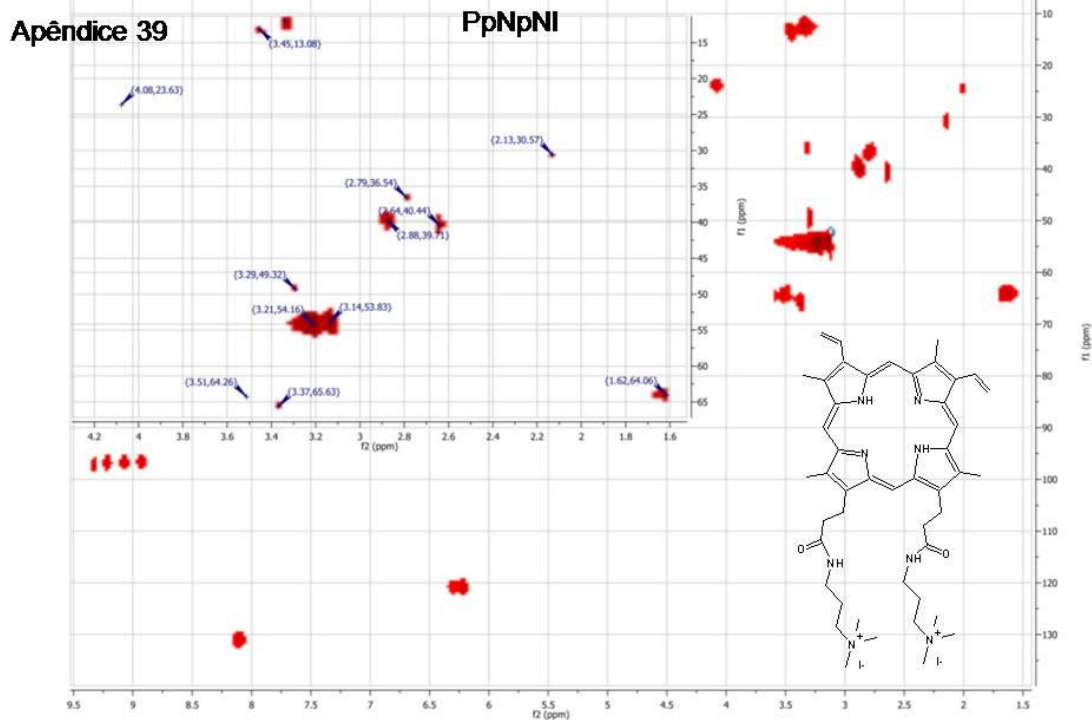
Espectro de RMN ^{13}C , para PpNpNI a 500MHz, DMSO obtido por 600 minutos de aquisição

Apêndice 38

PpNpNI

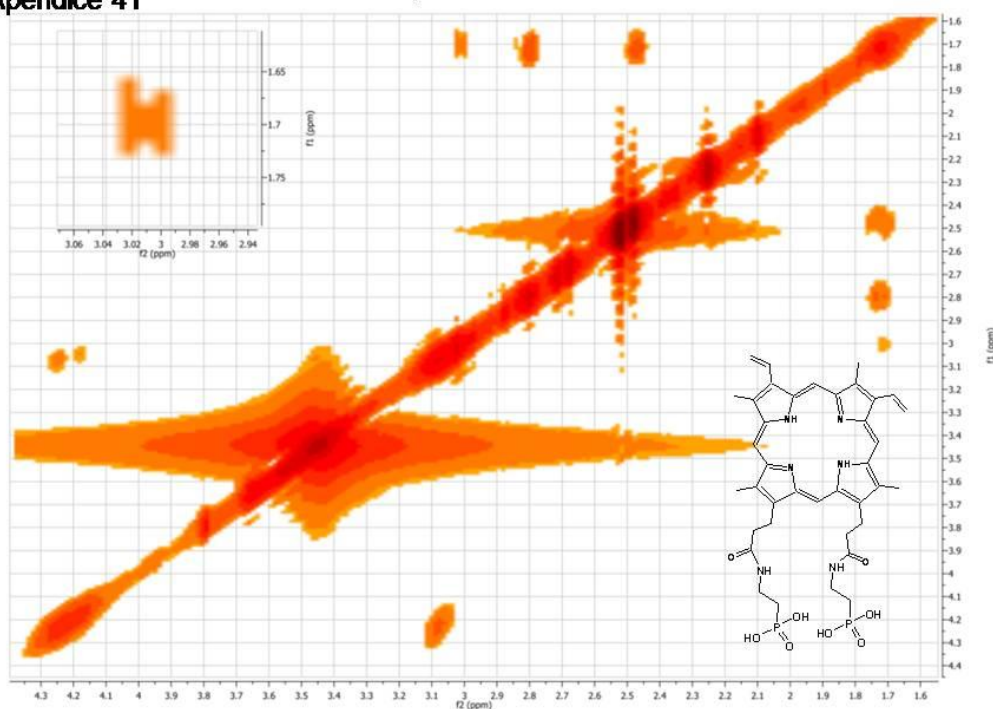


Espectro de RMN ^{13}C , para PpNpNI a 500MHz, DMSO obtido por 600 minutos de aquisição (Ampliação)



Apêndice 41

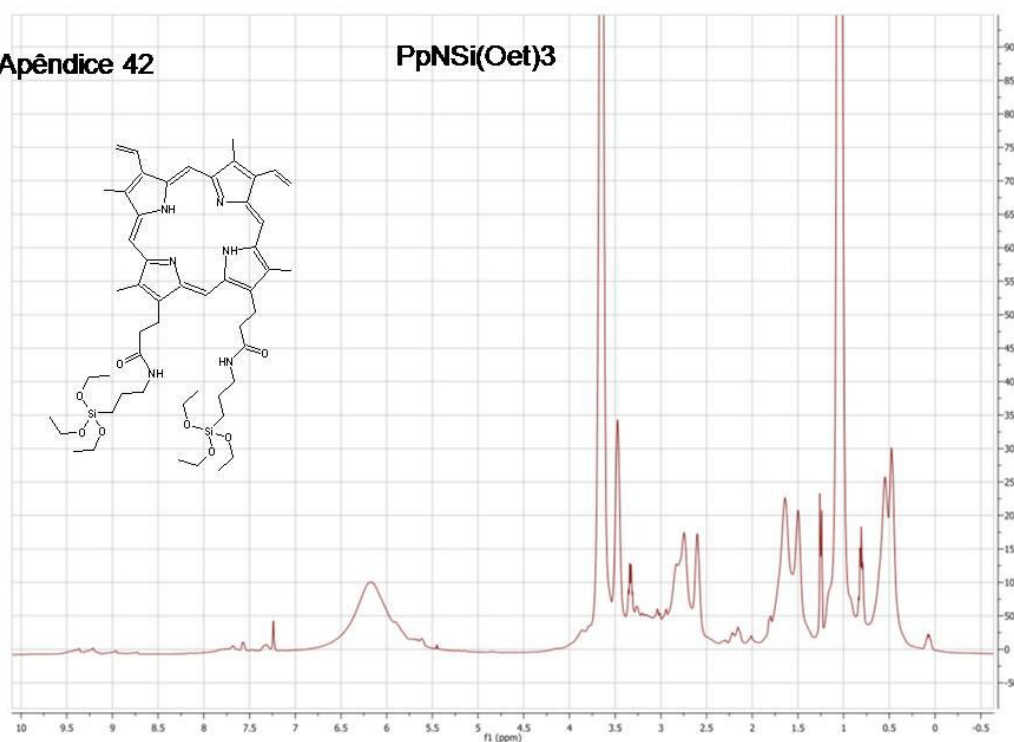
PpNetPO3



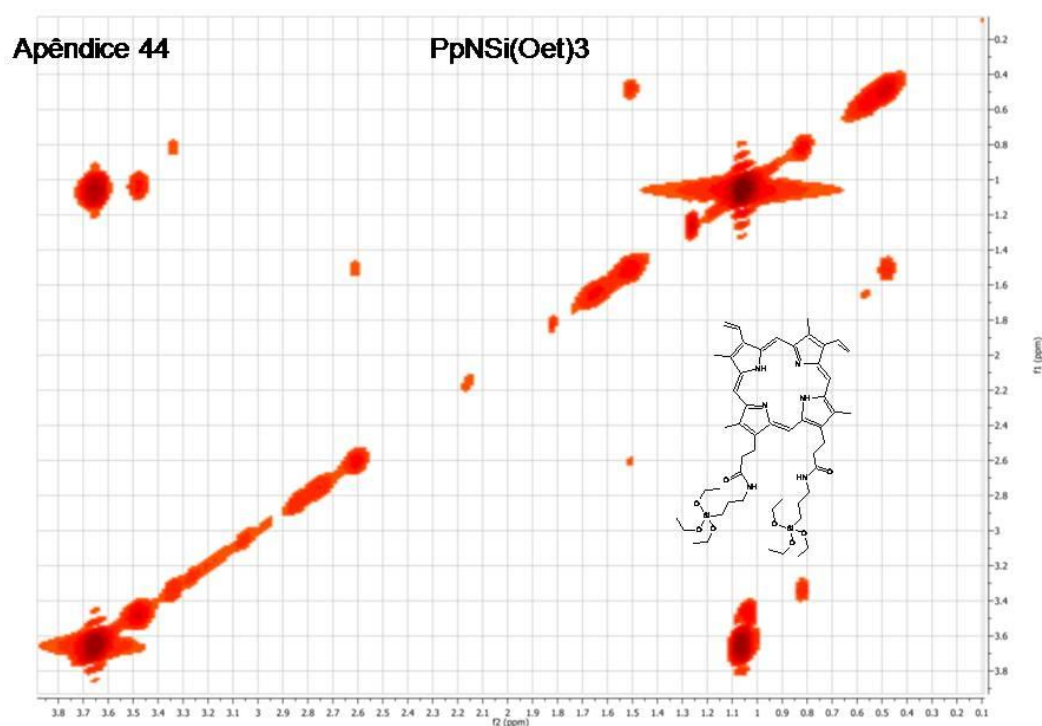
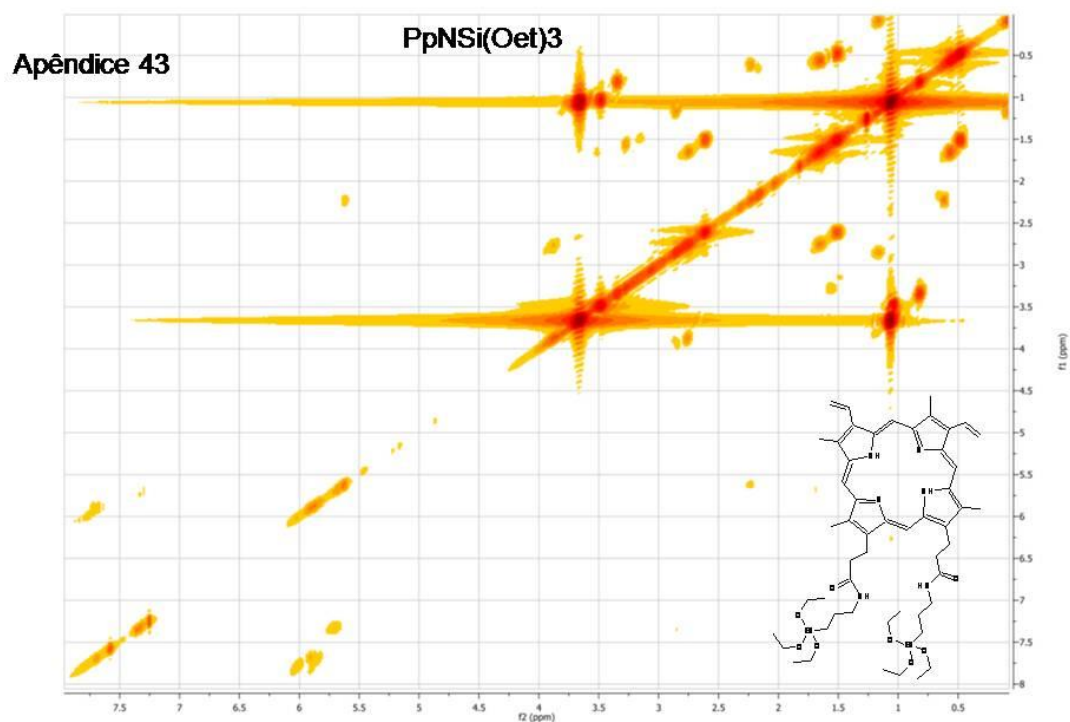
Espectro de RMN 2D cosy, para PpNetNPO3 a 500MHz, DMSO obtido por 60 minutos de aquisição

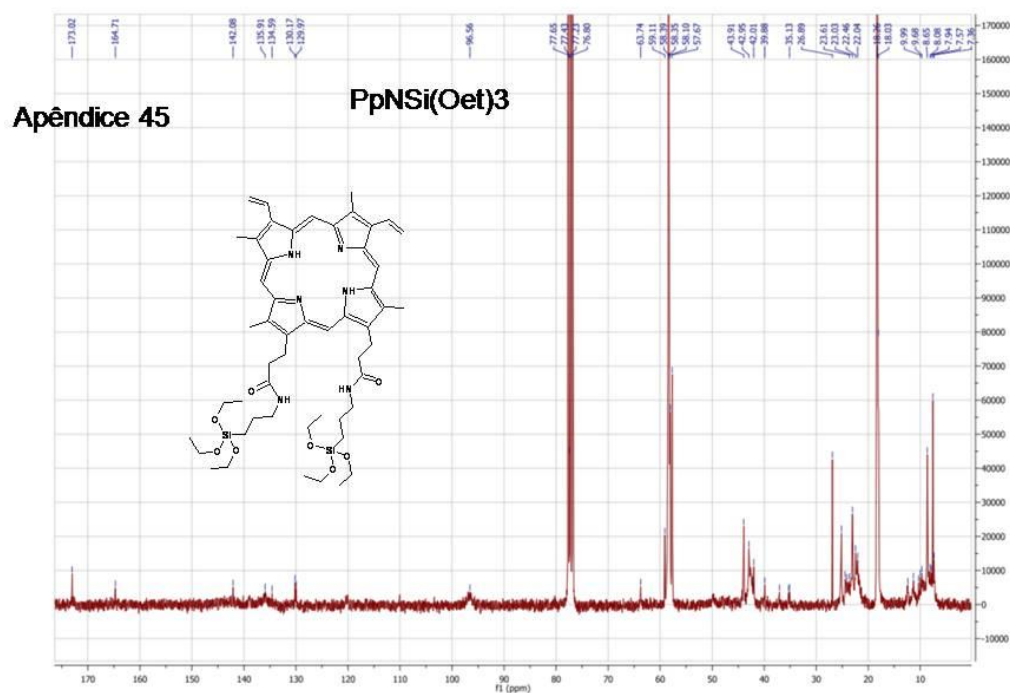
Apêndice 42

PpNSi(Oet)3

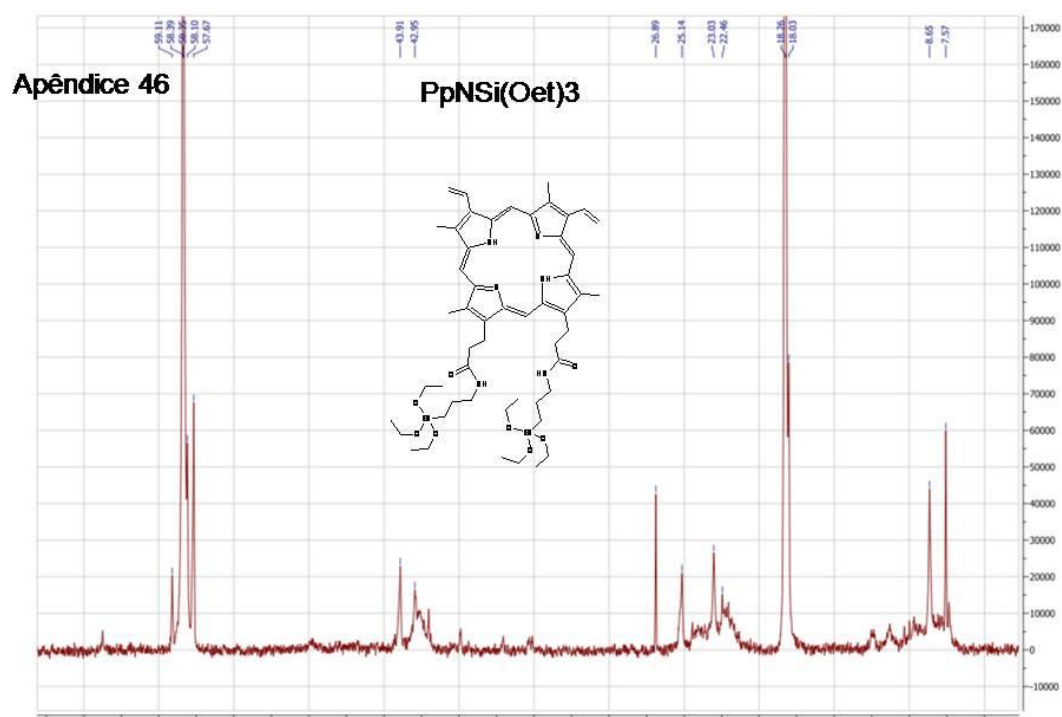


Espectro de RMN ^1H para PpNSi(Oet)3 a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

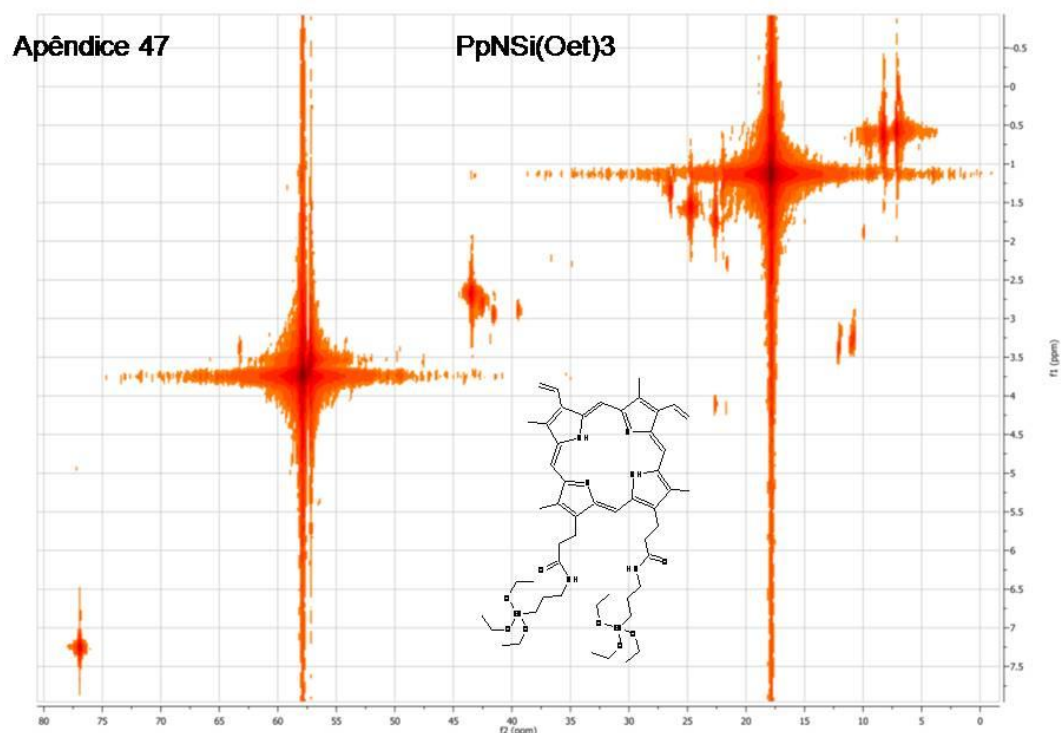




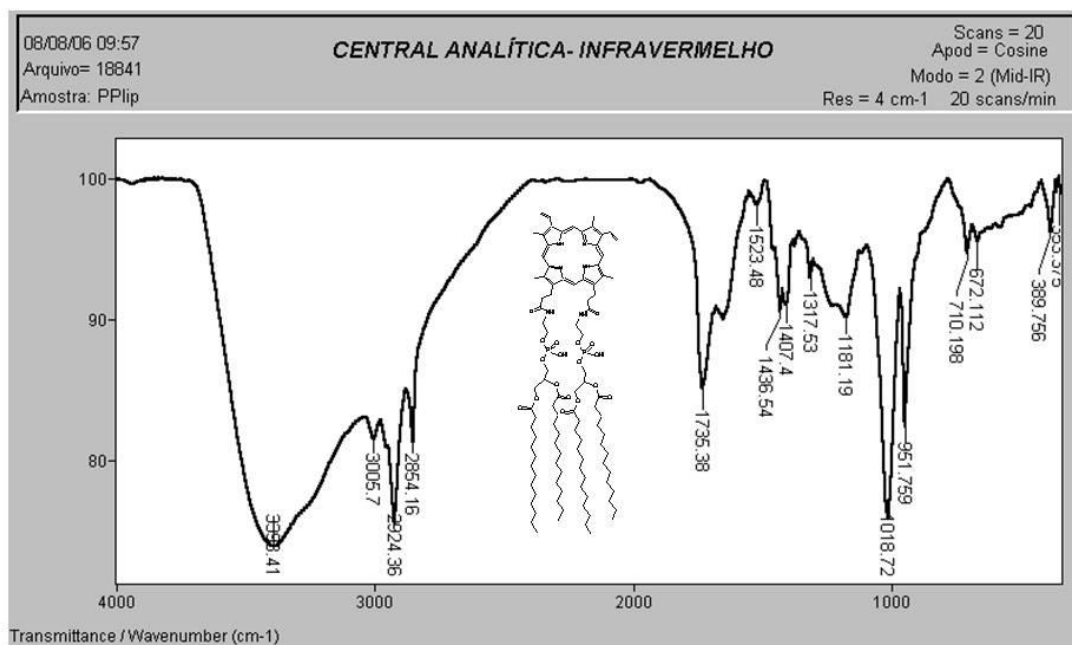
Espectro de RMN ¹³C para PpNSi(Oet)₃ a 500MHz, CDCl₃ obtido por 60 minutos de aquisição



Espectro de RMN ¹³C para PpNSi(Oet)₃ a 500MHz, CDCl₃ obtido por 60 minutos de aquisição (ampliação)



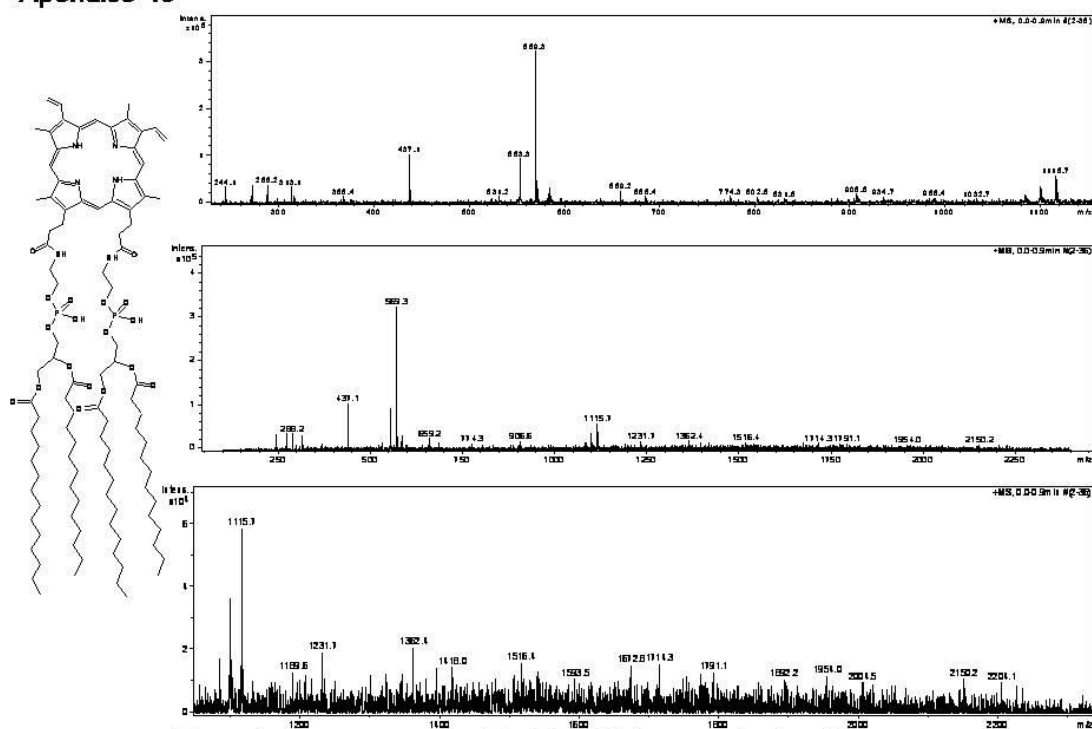
Apêndice 48



Espectro IV em KBr para Pp-PE

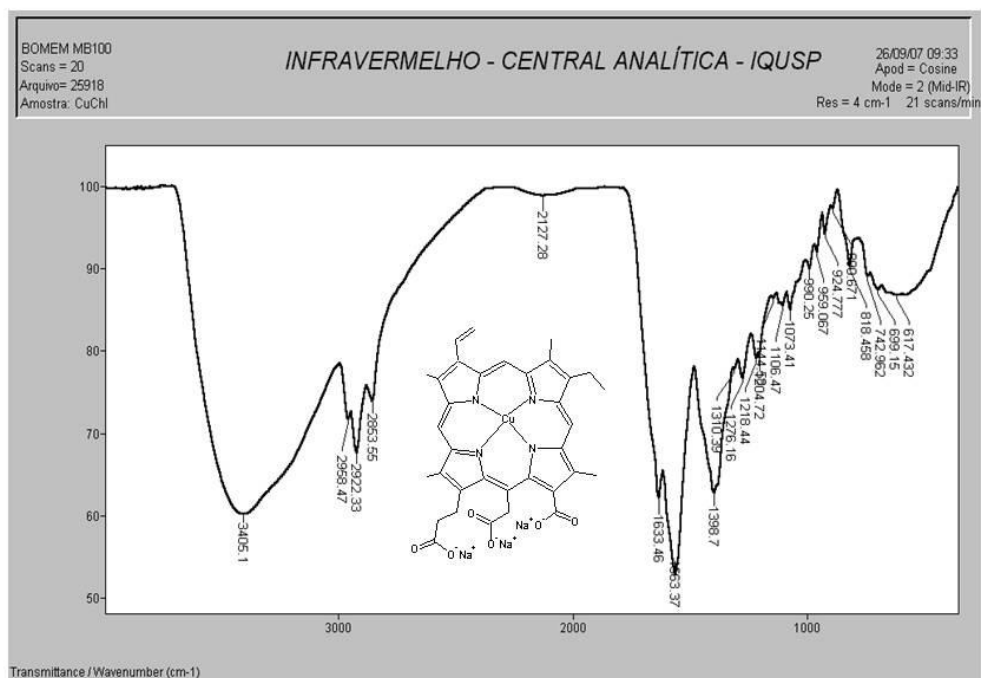
Pp-PE

Apêndice 49



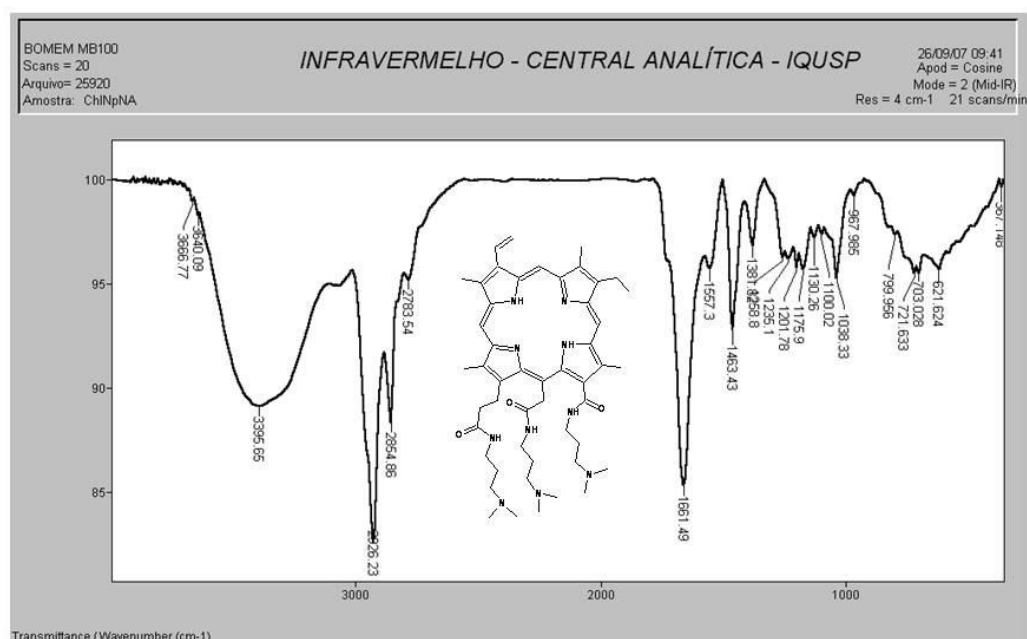
Espectro de massa para Pp-PE obtido por infusão direta

Apêndice 50

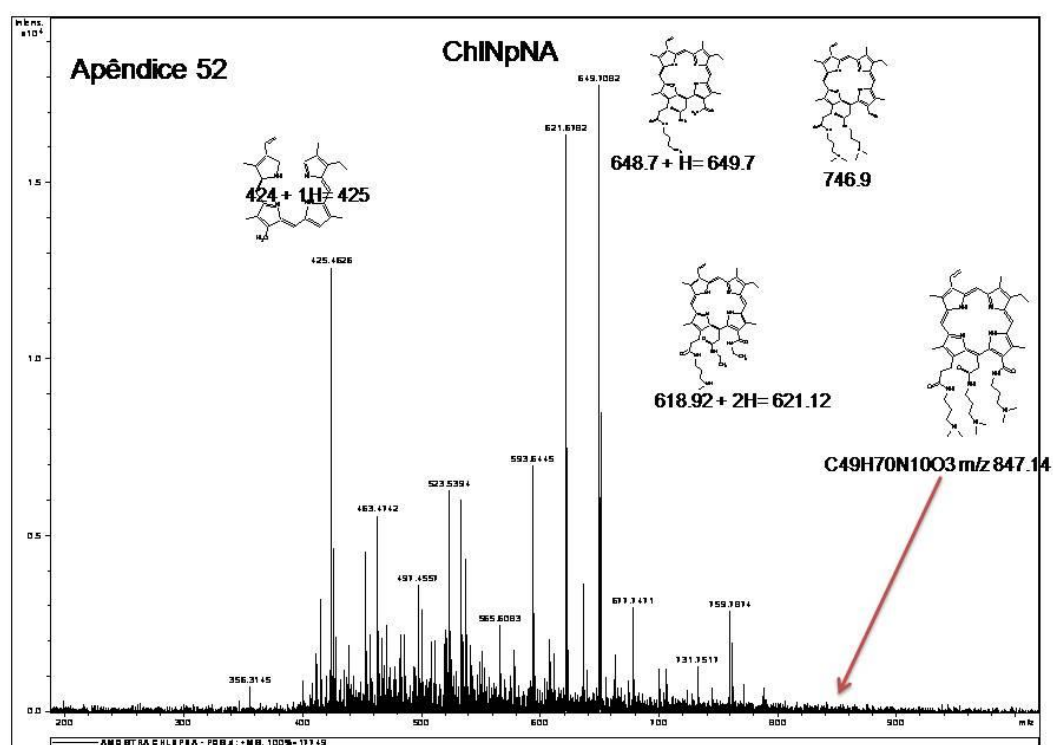


Espectro IV em KBr para CuChl

Apêndice 51



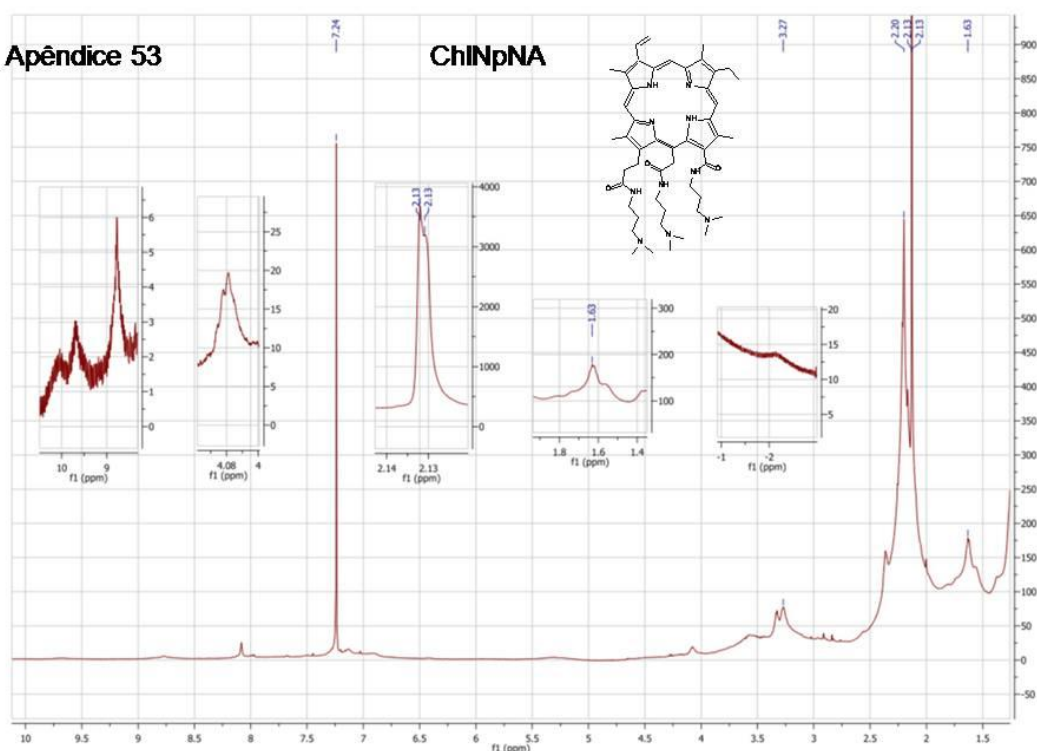
Espectro IV em KBr para ChINpNA



Espectro de massa Para ChINpNA, por de elétron e infusão direta

Apêndice 53

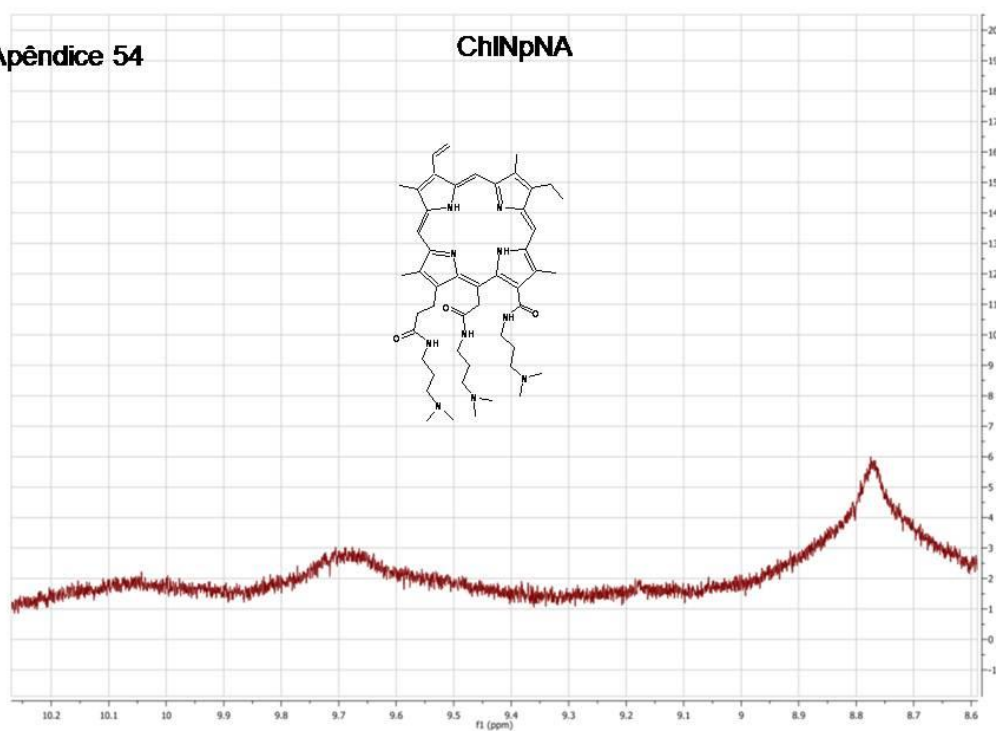
ChINpNA



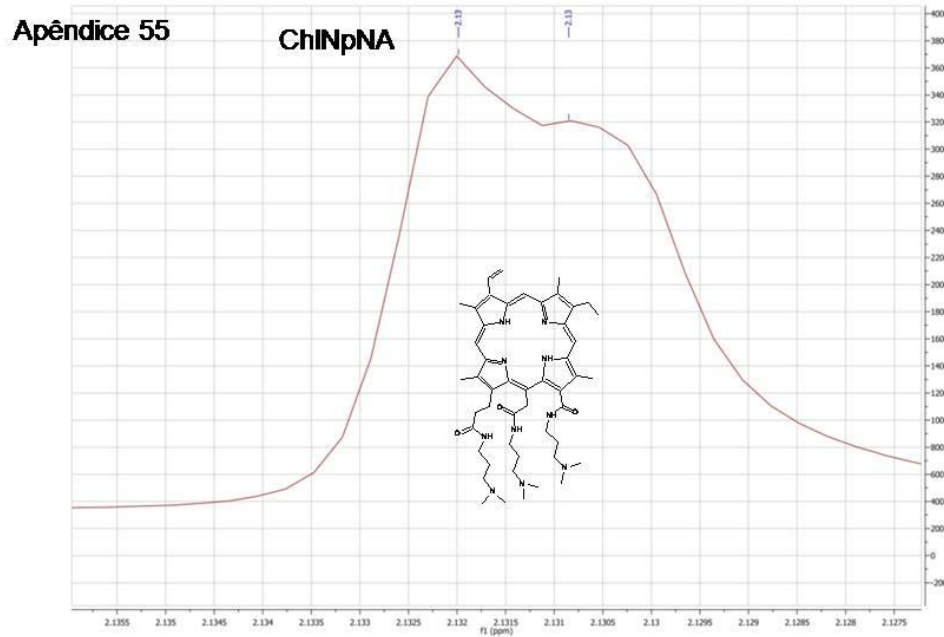
Espectro de RMN ^1H , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

Apêndice 54

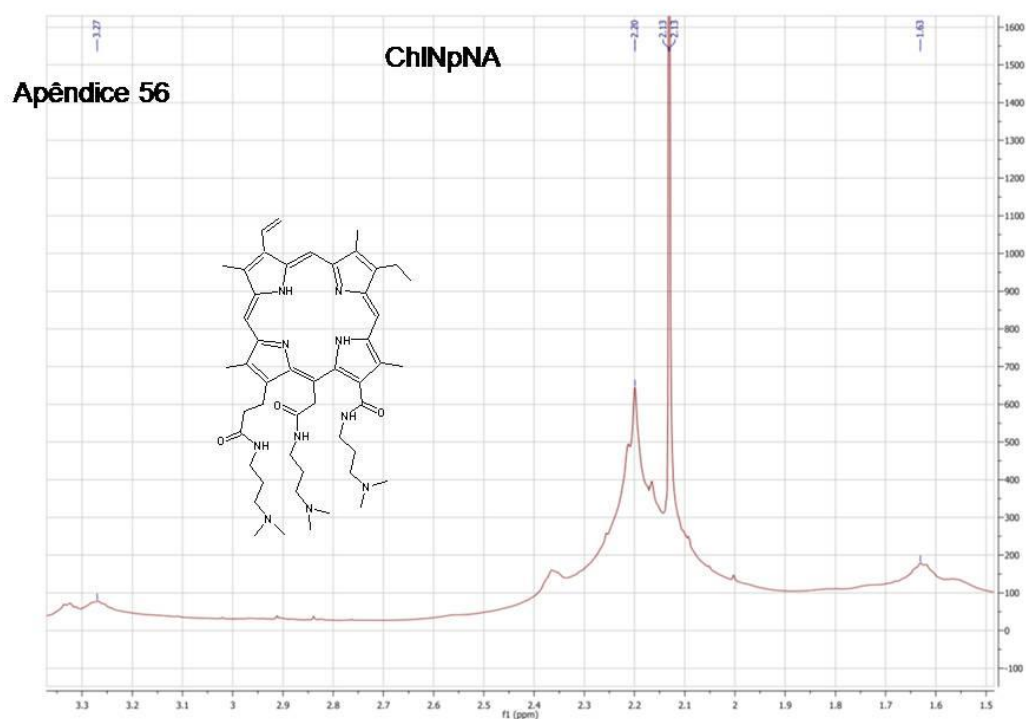
ChINpNA



Espectro de RMN ^1H , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição (Ampliação 1)

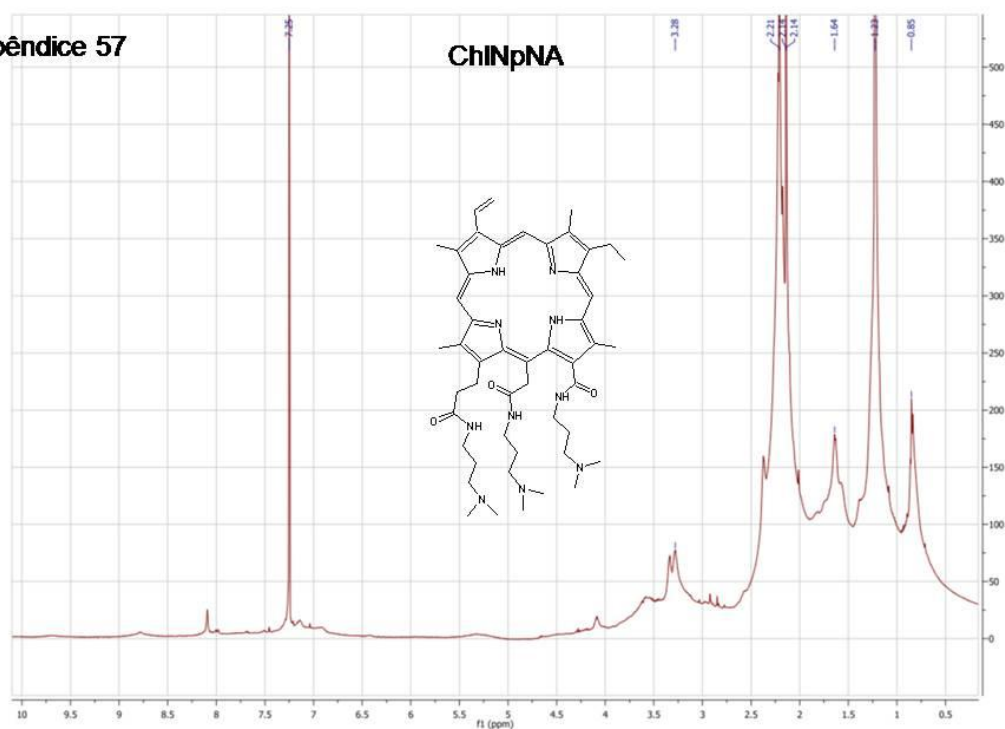


Espectro de RMN ^1H , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição (Ampliação 2)



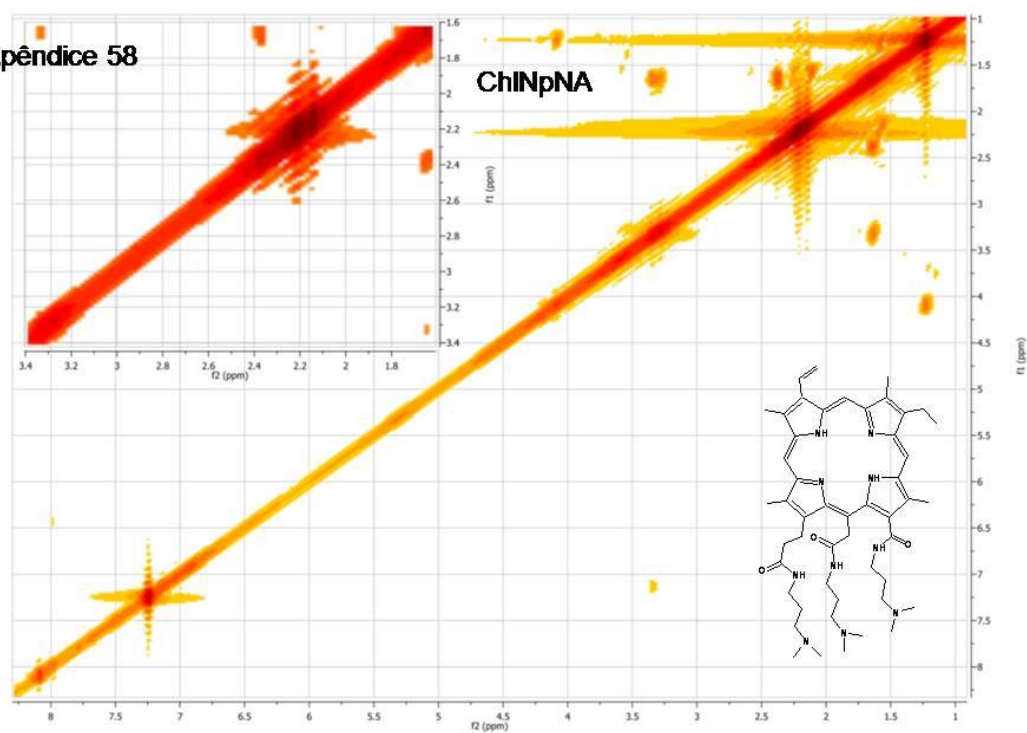
Espectro de RMN ^1H , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição (Ampliação 3)

Apêndice 57

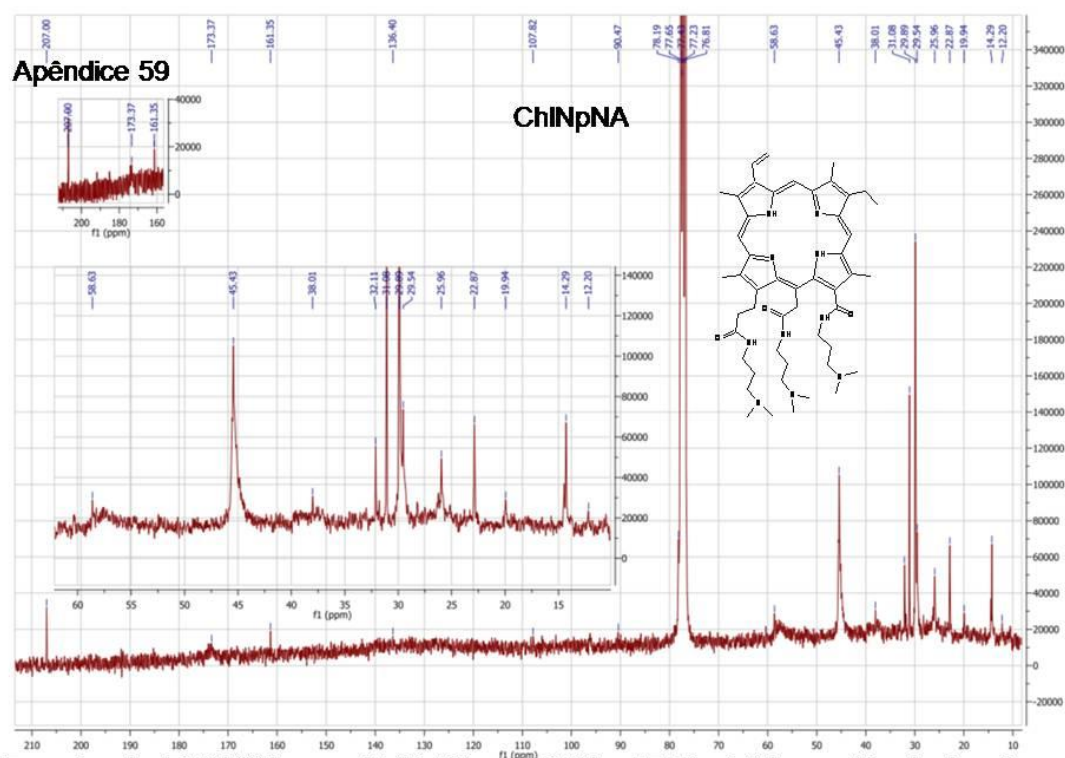


Espectro de RMN ^1H , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição (Ampliação 4)

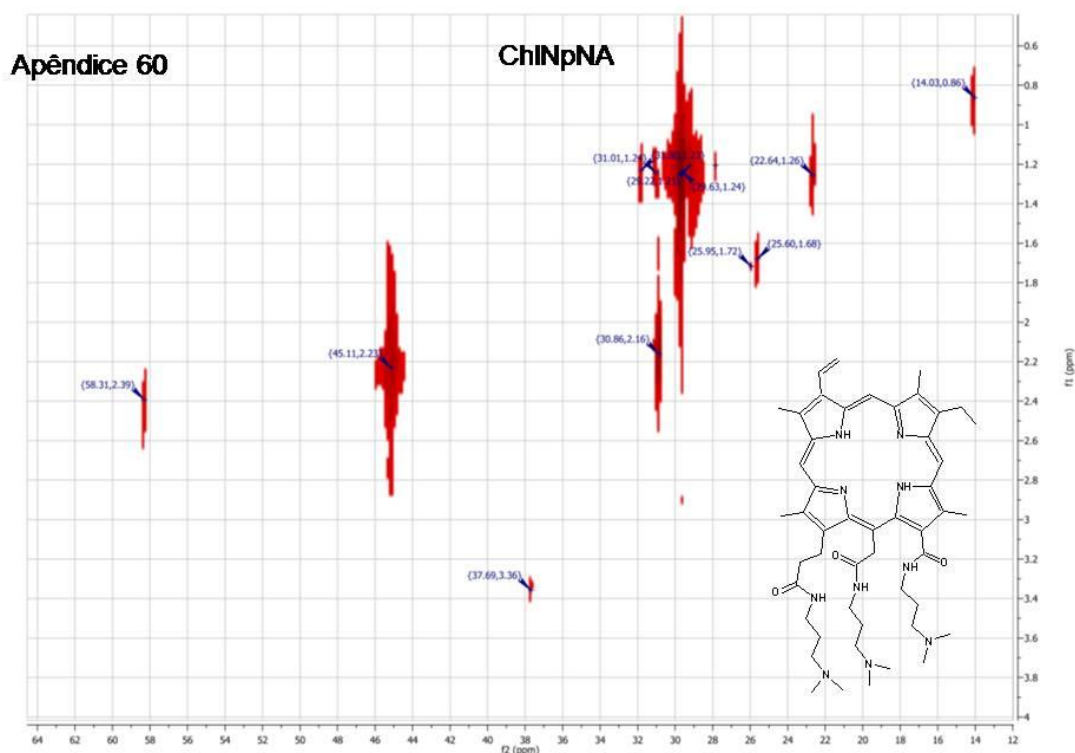
Apêndice 58



Espectro de RMN 2D cosy para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 300 minutos de aquisição

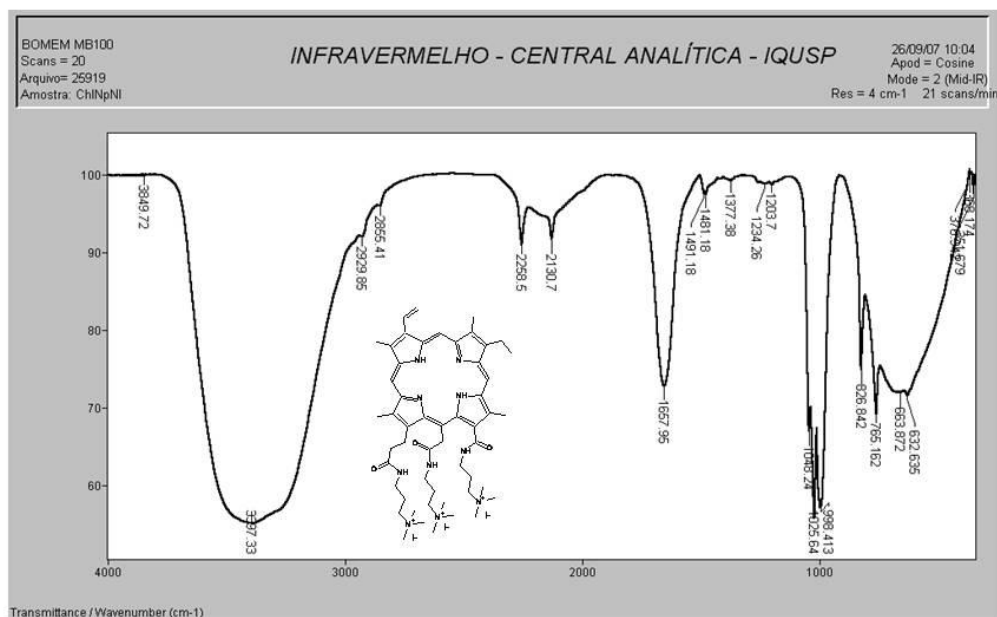


Espectro de RMN ^{13}C , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

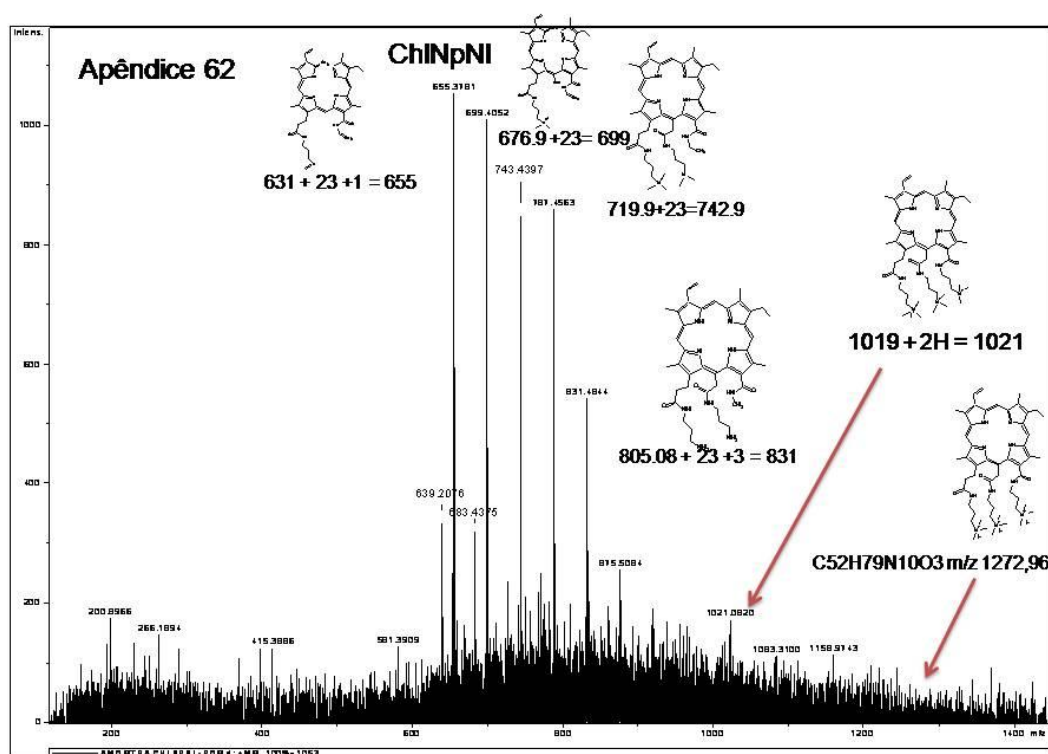


Espectro de RMN 2D hetcor para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição

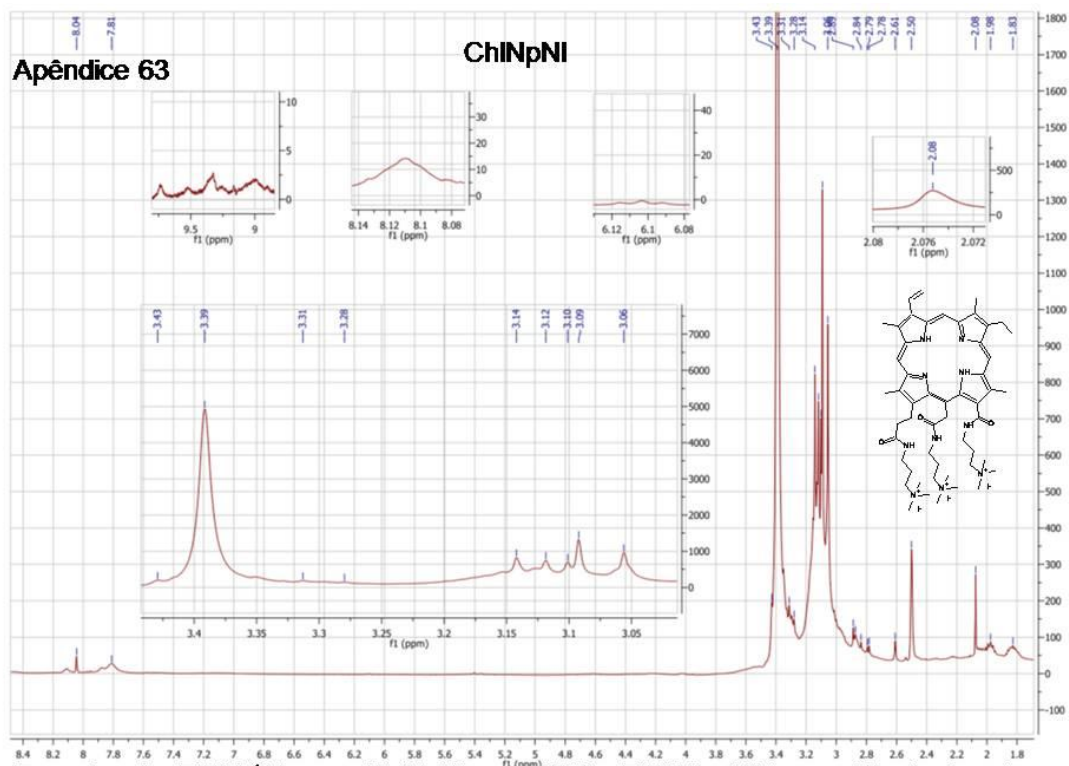
Apêndice 61



Espectro no infravermelho para ChINpNI em KBr

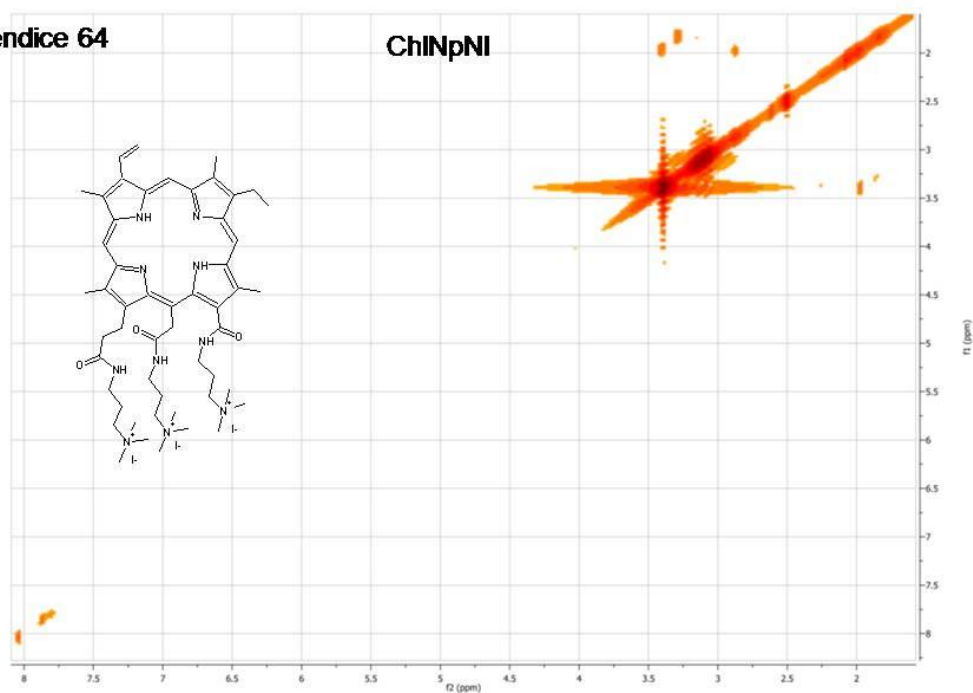


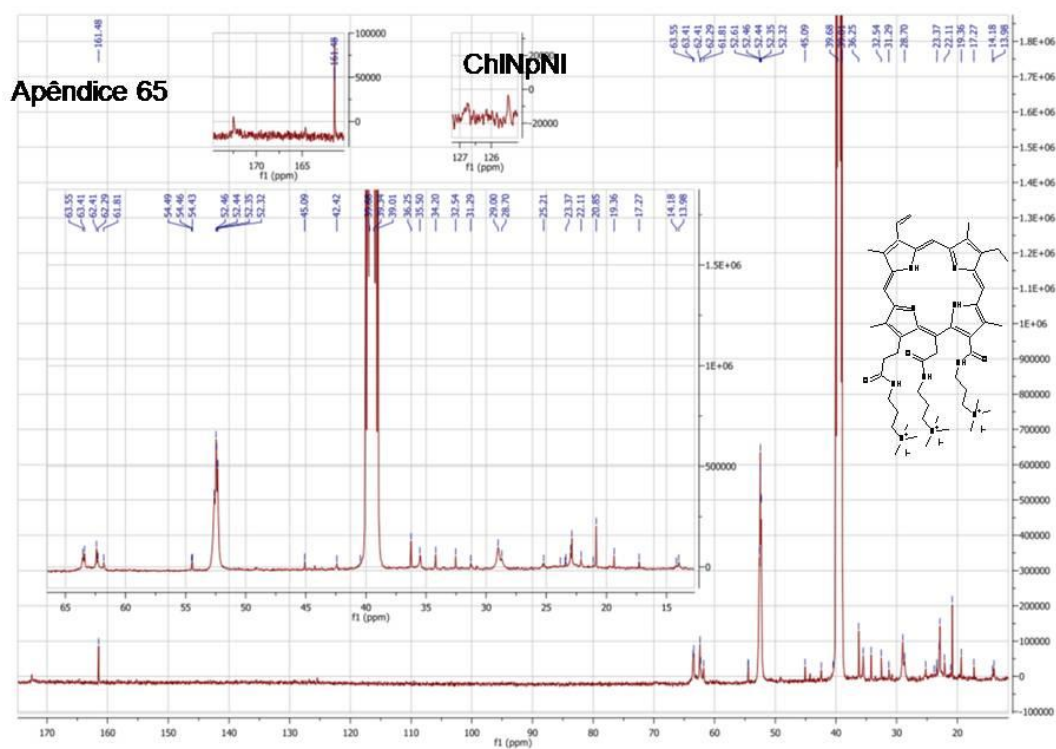
Espectro de massa Para ChINpNI, por de elétron e infusão direta



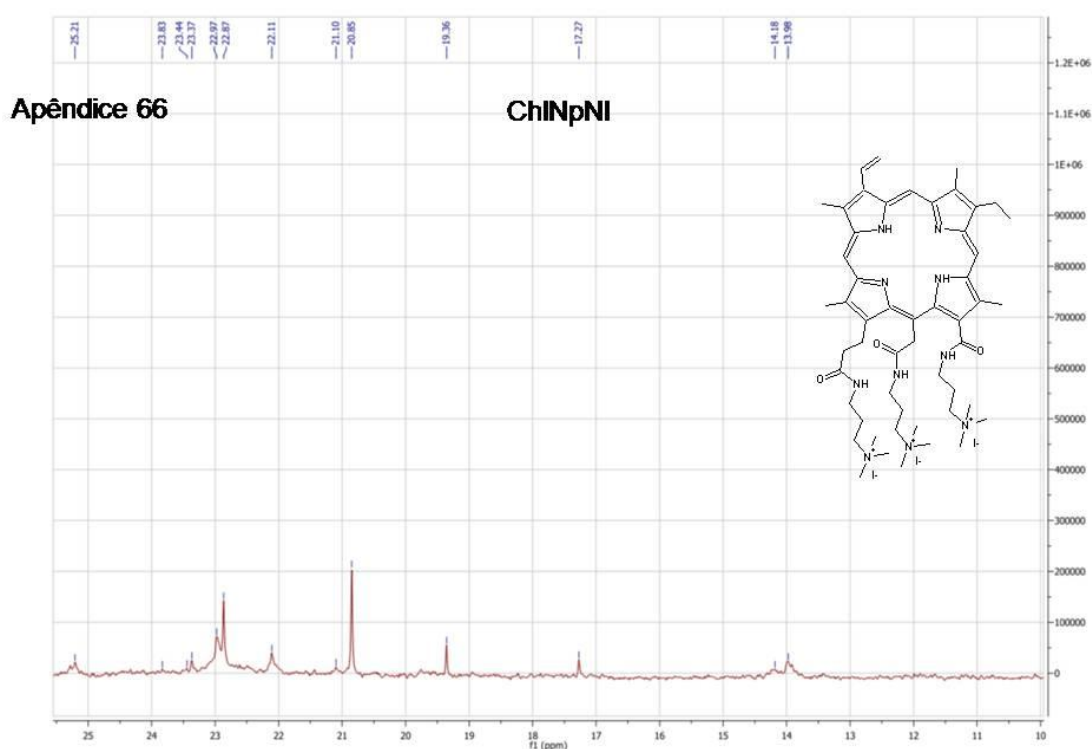
Apêndice 64

ChINpNI

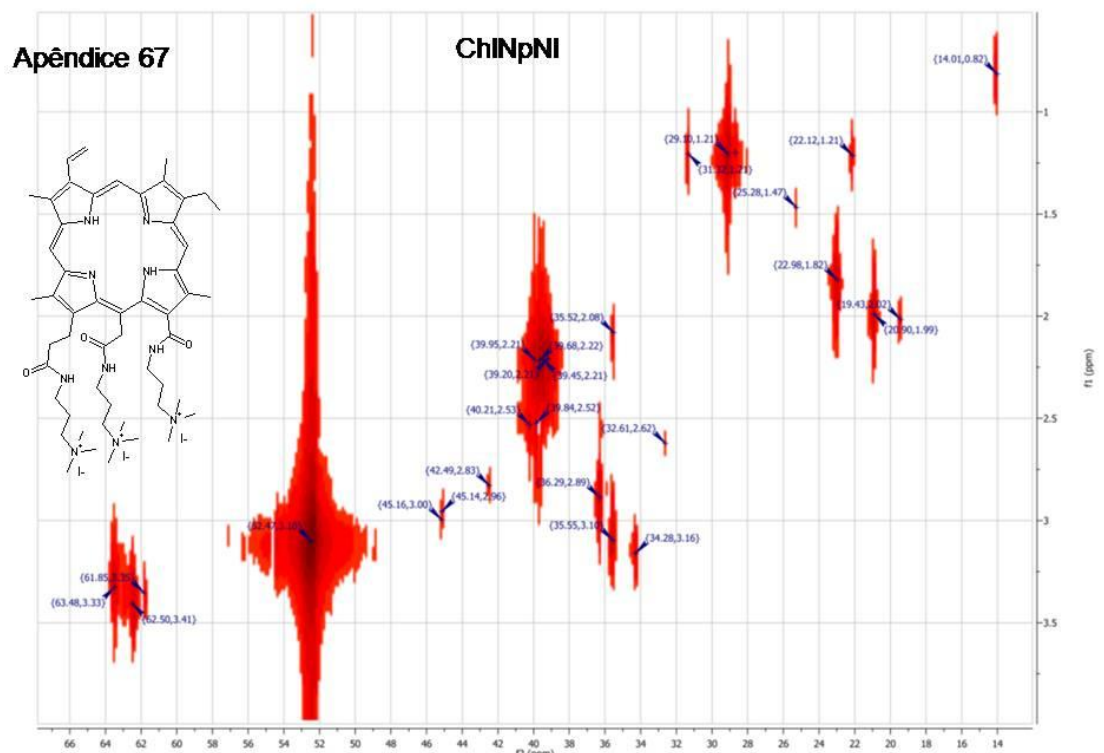




Espectro de RMN ^{13}C , para ChINpNI a 500MHz, DMSO obtido por 60 minutos de aquisição



Espectro de RMN ^{13}C , para ChINpNA a 500MHz, CDCl_3 obtido por 60 minutos de aquisição (ampliação)



Espectro de RMN 2D hetcor para ChINpNI a 500MHz, DMSO obtido por 60 minutos de aquisição

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)