Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: Sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele”

Christiane Pavani

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: **Química**.

Orientadora: Profa. Dra. Yassuko Iamamoto

Ribeirão Preto – SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pavani, Christiane

Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: Sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2009.

164 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Iamamoto, Yassuko.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Porfirinas Catiônicas. 3. Relação estrutura- atividade. 4. Câncer de Pele

Christiane Pavani

“Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: Sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele”

*Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (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: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais, Wagner e Lourdes,
por todo apoio durante estes longos anos.*

Agradecimentos

Hoje sei...

*Quais foram às pessoas que
realmente fizeram a diferença,
e quais realmente fazem parte
desse “eu” que eu me tornei hoje.*

Agradeço à Deus

Agradeço à Deus, que me deu a vida, quem primeiro me amou e fez com que eu trilhasse esse caminho. Agradeço Senhor, por cada dificuldade encontrada no desenvolvimento deste trabalho, pois foram elas que me fizeram crescer e aprender. Agradeço pelas pessoas que colocou em meu caminho nesta longa jornada, e a tudo que cada uma delas acrescentou à minha vida e ao meu trabalho. Agradeço pela saúde e força que me deu para que agora esteja chegando ao final desta etapa. Se eu cheguei até aqui, é porque assim foi sua vontade e seus planos para a minha vida.

*“Tudo que tenho, tudo que sou
e o que vier a ser, vem de ti Senhor”*

Os meus pais

De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Já por isso seria infinitamente grata. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável e consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperanças, não bastaria um muito obrigado. Pela longa espera e compreensão durante as longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Os meus irmãos e familiares

Obrigada pelo apoio e incentivo em todos os momentos durante todos esses anos. Vocês foram essenciais!

“É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. [...] Um homem sozinho pode ser vencido, mas dois conseguem defender-se.”

Eclesiastes 4.9,12

Do meu amor

Rafa, agradeço à Deus a cada momento que passo com você,
por ter conhecido a melhor pessoa do mundo,

Agradeço a Deus por nossos sonhos e
por ser a pessoa mais feliz do mundo,

Pois tenho VOCÊ ao meu lado...

Agradeço muito a você, meu amor, que esteve comigo nestes
momentos finais de muito stress...

Te amo e te agradeço por tudo:

Agradeço sua compreensão,
sua paciência e sua proteção.

Agradeço o carinho que você me dedica,
e toda ternura que de você aflora.

Agradeço seu ânimo, sua coragem e sua força
que me alicerçam muito também!

Agradeço seus mimos, sua delicadeza, e seu primor.

*“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e
conheça todos os mistérios e toda a ciência:*

*ainda que eu tenha tamanha fé,
a ponto de transportar montes,
se não tiver amor, nada serei”*

1 Coríntios 13.2

Outros Agradecimentos

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só.

Mas um sonho se que sonha junto vira realidade”

Carlos Drummond de Andrade

Agradeço à Prof. Yassuko pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas oportunidades de crescimento que me proporcionou desde a iniciação científica, pela confiança, apoio, amizade e incentivo.

Ao Prof. Maurício por ter me acolhido em seu laboratório, pela sua paciência, orientação e apoio no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Serra pelas discussões e contribuições no decorrer do trabalho, pelo apoio e amizade.

À Prof. Bete e à Ana Paula pela amizade e excelente colaboração nos estudos dos filmes finos.

Ao Prof. Beto pela realização e discussão dos espectros de massa.

À Prof. Maria Vitória Bentley, pelo apoio nos experimentos de permeação cutâneos.

Aos colegas do laboratório de Bioinorgânica e Terras Raras: Anderson, Aninha Pires, Ana Cecília, Ariane, Chico, Cláudio, Daniel, Edimar, Fábio (cuzido), Heide, Janaína, Juliana, Kleber, Lucas, Manes, PC, Renata e Rodrigo. Especialmente às minhas queridas amigas, a mulherada do meu coração: Lívia (Bulla), Fer (Neusa), Maria Elisa, Lu Baggini, Pri (Juca), Beca, Simone, Tati (Juka); vocês tornaram estes anos mais que especiais.

Aos colegas do laboratório de Processos Fotoinduzidos: Adjaci, Alan, Ale, Alice, Carla Pedriali, Carla Oliveira, Cíntia, Dani, Day, Daiana, Dino, Divino, Elisa, Fernando, Helena, Gui, Mandela, Michelle, Path, Rhaisa, Roberta, Rodrigo, Suellen, Sushi, Thati, Vinícius e Vivi, por terem me recebido tão bem, pelos cafezinhos, os momentos descontraídos (e viva as novelas mexicanas!) e por muitas vezes terem cuidado das células por mim quando eu retornava para Ribeirão. Em especial à Helena pelos milhões de socorros nos experimentos, pelo vício compartilhado no café e grande amizade, à Carla Oliveira por sua paciência e dedicação nas várias tentativas de obtermos imagens no confocal, ao Dino e ao Adjaci por contribuírem com o “trabalho sujo” de assassinato do rato.

Aos funcionários e docentes do Departamento de Química que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Aos técnicos do laboratório de Farmacotécnica: José Orestes e Henrique. Aos técnicos do IQ-SP: Décio, Edson e Adriana (sua paciência no

confocal foi fundamental). À Thais do laboratório do Prof. Rui do ICB à quem devo muito de tudo que aprendi sobre FACS.

À amiga Ana Paula Maestrin, por tudo que me ensinou como profissional durante a iniciação científica e que se reflete neste trabalho.

À querida amiga Pri pela sua grande amizade e companheirismo desde o primeiro dia de aula e todos os momentos (inesquecíveis... rs eu tinha que eternizar isso!) durante todos estes anos.

Aos meus amigos de república em sampa: Vini, Ale, Day, Ro (meu Nhinho predileto) e agora na etapa final, Tati, minha Jukinha do coração, vocês foram essenciais. Em especial agradeço ao Rodrigo por ter me cedido seu quarto por tantos meses e por não ter me deixado morrer de fome me proporcionado inúmeras vezes aquela maravilhosa iguaria – vulgo “seu macarrão” - e à Day, que mesmo com a distância física sempre se manteve uma amiga presente. Agradeço a Deus por ter me dado a vocês como amigos, pois com vocês eu aprendi que há amigos mais chegados que irmãos.

À todos meus amigos/irmãos da PIB pelo apoio e companheirismo, em especial à Paulinha, Samira, Fred, Niltinho, Vini, Thaya, Alberto, Paty, Felipe, Carlinhos, Nádia, Naiara, Nariane, Leonárrdo Vaz e às minhas filhotas: Lice e Lary. Ah, e à Tilla, de Brasília!

Às minhas amigas Camila e Eliane que acompanharam este último ano de perto e que fazem os finais de semana em aula na Racine muito mais divertidos!

À toda a minha família por sempre acreditar em mim. Aos meus pais, Wagner e Lourdes, e irmãos, Luizinho, Lu e Walmir, pelo imenso apoio. Obrigado à vocês que compartilharam os prazeres e dificuldades desta jornada.

Ao Rafa por sua paciência, carinho, atenção e amor.

À FAPESP pelo financiamento.

Enfim, agradeço à todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Resumo

Uma série de porfirinas meso-substituídas tetracatiônicas foi sintetizada e caracterizada, com o objetivo de estudar o papel da anfifilicidade e a presença de zinco em propriedades que podem influenciar na eficácia dos mesmos como FSs na terapia fotodinâmica.

Observamos que as propriedades fotofísicas dos compostos são semelhantes (máximos de absorção na mesma região, $\Phi_F \leq 0,02$; $\Phi_{\Delta} \sim 0,8$). O aumento na lipofilicidade e a presença de zinco no centro do anel porfirínico aumentam a incorporação dos FSs em vesículas e células, uma vez que a presença de zinco possibilita a coordenação pelos grupos fosfato dos fosfolípidos (os resultados os estudos das monocamadas de Langmuir e dos filmes de Langmuir-Blodgett corroboram com esta afirmação). A incorporação em mitocôndrias é também dependente da lipofilicidade do FS e é influenciada pelo potencial eletroquímico de membrana. A presença do zinco mostrou diminuir a incorporação em mitocôndrias isoladas e em mitocôndrias nas células HeLa, devido às características particulares da membrana mitocondrial interna.

A fototoxicidade aumenta proporcionalmente ao aumento da eficiência da incorporação em membranas, que é atribuída às interações favoráveis entre os FSs e as membranas, permitindo a fotooxidação mais eficiente das mesmas. Para esta série de compostos, a eficiência fotodinâmica é diretamente proporcional à ligação em membranas e incorporação em células, mas não está totalmente relacionada ao acúmulo seletivo em mitocôndrias.

Os resultados preliminares de permeação e retenção cutâneos mostram que apesar destes FSs apresentarem baixa penetração e retenção na pele, quando adequadamente formuladas passam a apresentar penetração e retenção cutâneas adequadas de maneira que poderiam ser utilizados na TFD tópica no tratamento de câncer de pele.

Abstract

A series of photosensitizers (PS), which are meso-substituted tetra-cationic porphyrins, was synthesized and characterized in order to study the role of amphiphilicity and zinc insertion in PDT efficacy.

The photophysical properties of all compounds are quite similar (absorption maxima in the same region of the spectra, $\Phi_f \leq 0.02$; $\Phi_{\Delta} \sim 0.8$). An increase in lipophilicity and the presence of zinc in the porphyrin ring result in higher vesicle and cell uptake, because zinc can be complexed by the phosphate groups of the phospholipids. The results from the study of Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett mixed films corroborate this affirmation. Binding in mitochondria is dependent on the PS lipophilicity and on the electrochemical membrane potential. Zinc insertion was also shown to decrease the interaction with isolated mitochondria and with the mitochondria of HeLa cells, an effect that has been explained by the particular characteristics of the mitochondrial internal membrane.

Phototoxicity was shown to increase proportionally with membrane binding efficiency, which is attributed to favorable membrane interactions between FSs and membranes, which allow for more efficient membrane photooxidation. For this series of compounds, photodynamic efficiency is directly proportional to membrane binding and cell uptake, but it is not totally related to mitochondrial targeting.

Preliminary results of skin permeation and retention show that besides presenting low permeation and retention when suitably formulated, FSs can cross the EC barrier and accumulate in deeper regions, thus being applicable to topical PDT in the treatment of skin cancer.

Símbolos e Abreviaturas

ACT	Acetona
CCCP	Carbonilciano m-clorofenilhidrazona
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMPA	Sal de sódio do ácido dimiristoil-sn-glicero-fosfatídico
DMPC	Dimiristoil-sn-glicero-fosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoil -Fosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
EC	Estrato Córneo
EGTA	Ácido etilenoglicoltetra-acético
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EtOH	Etanol
FS	Fotossensibilizador
HOMO	Orbitais de maior energia ocupados
HP	Hematoporfirina
HPD	Derivado de Hematoporfirina
LUMO	Orbitais de menor energia desocupados
ME	Microemulsão
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
PBS	Tampão fosfato, pH=7,2

PG	L- α -Fosfatidilglicerol
S₀	Estado Fundamental - singlete
S₁	Primeiro estado excitado singlete
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T₁	Primeiro estado excitado triplete
TFD	Terapia Fotodinâmica
TBzPyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-benzil-4-piridil)porfirina
TC8PyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-1-octil-4-piridil)porfirina
TC14PyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-1-tetradecil-4-piridil)porfirina
TMePyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-metil-4-piridil)porfirina
TPyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (4-N-piridil)porfirina
TSPP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (4-sulfonatofenil)porfirina
ZnTC8PyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-1-octil-4-piridil)porfirinato de zinco
ZnTC14PyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-1-tetradecil-4-piridil)porfirinato de zinco
ZnTPyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (4-N-piridil)porfirinato de zinco
ZnTMePyP	5,10,15,20- <i>tetrakis</i> (N-metil-4-piridil)porfirinato de zinco
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete
ϕ_f	Rendimento quântico de fluorescência

Sumário

Capítulo 1: Introdução	16
1.1) A Pele e o Câncer	16
1.2) Terapia Fotodinâmica	20
1.2.a) História da Terapia Fotodinâmica (TFD)	21
1.2.b) Fotoquímica da Terapia fotodinâmica	26
1.2.c) Fotossensibilizadores	30
1.3) Aspectos Gerais de Porphirinas e Derivados	32
1.3.a) Síntese e Caracterização de Porphirinas	33
1.3.b) Espectroscopia UV-Visível	36
1.4) Interações dos FSs com tecidos	40
Objetivos	47
Capítulo 2: Parte Experimental	48
2.I) Princípio das Técnicas Utilizadas	48
2.I.1) Espectroscopia eletrônica de absorção e emissão	48
2.I.2) Oxigênio Singlete	48
2.I.4) Citometria de Fluxo	49
2.I.5) Monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett	51
2.I.6) Espalhamento dinâmico de luz (EDL)	53
2.II) Metodologias:	54
2.II.1) Síntese da TMePyP	54
2.II.2) Inserção de zinco na TPyP	55
2.II.3) Metilação da ZnTPyP	55
2.II.4) Síntese da TC8PyP	56
2.II.5) Inserção de zinco na TC8PyP	57
2.II.6) Síntese da TC14PyP	57
2.II.7) Inserção de zinco na TC14PyP	58
2.II.8) Espectroscopia eletrônica de absorção e coeficientes de absorvidade molar (ϵ)	58
2.II.9) Espectroscopia eletrônica de emissão e determinação do rendimento quântico fluorescência (ϕ_f)	59
2.II.10) Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ($\phi\Delta$)	60
2.II.11) Incorporação das porfirinas em lipossomas	61
2.II.12) Incorporação das porfirinas em células HeLa	62
2.II.13) Incorporação das porfirinas em mitocôndrias isoladas	64

2.II.14) Toxicidade e Fototoxicidade em células HeLa	65
2.II.15) Sublocalização Celular	66
2.II.16) Quantificação de núcleos sub-diplóides	67
2.II.17) Isotermas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett	68
2.II.18) Permeação e Retenção Cutânea	69
Capítulo 3: Resultados e Discussão	73
3.1) Síntese da TMePyP	73
3.2) Inserção de zinco na TPyP	74
3.3) Metilação da ZnTPyP	76
3.4) Síntese da TC8PyP	78
3.5) Inserção de zinco na TC8PyP	81
3.6) Síntese da TC14PyP	82
3.7) Inserção de zinco na TC14PyP	86
3.8) Espectroscopia eletrônica de absorção e coeficientes de absorvidade molar (ϵ)	87
3.9) Espectroscopia eletrônica de emissão e determinação do rendimento quântico fluorescência (ϕ_f)	88
3.10) Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ($\phi\Delta$)	92
3.11) Incorporação das porfirinas em lipossomas	94
3.12) Incorporação das porfirinas em células HeLa	96
3.13) Incorporação das porfirinas em mitocôndrias isoladas	98
3.14) Toxicidade e Fototoxicidade em células HeLa	100
3.15) Sublocalização Celular	105
3.16) Quantificação de núcleos sub-diplóides	108
3.17) Isotermas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett	111
3.18) Permeação e Retenção Cutânea	122
3.18.a) Caracterização da Formulação	122
3.18.b) Permeação e Retenção Cutâneos	124
Conclusões	127
Referências	131
Apêndice	150
Súmula Curricular	160

Capítulo 1: Introdução

1.1) A Pele e o Câncer

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano. A função natural da pele é proteger o corpo contra a perda de substâncias endógenas e a entrada de substâncias estranhas. Além disso, atua no controle da temperatura corpórea, absorção da radiação ultravioleta, síntese de vitamina D, absorção e eliminação de substâncias químicas, tem função sensorial e estética (RIBEIRO 2006).

Ela é constituída principalmente por duas camadas: a epiderme, mais externa, e a derme, mais interna. A derme é um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente a agressões mecânicas e abriga os apêndices cutâneos: rica em capilares, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A epiderme é composta de diversas camadas, formadas por células em diferentes estágios de diferenciação, que ocorrem desde a membrana basal, entre a derme e a epiderme, até a superfície da pele (**Figura 1**) (SUHODEN *et al.* 1999). As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa e córnea (RIBEIRO 2006).

O estrato córneo (EC) constitui a principal barreira à passagem de substâncias através da pele e pode ser comparada à estrutura de um muro de tijolos. Os tijolos são células (corneócitos) compostas principalmente por queratina insolúvel (ASBILL e MICHNIAK 2000) e o

cimento é uma matriz lipídica na forma de bicamadas compostas por ceramidas (41%), ácidos graxos (9%), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%) e pequena quantidade de sulfato de colesterol (2%) (SUHODEN *et al.* 1999).

Figura 1: Estrutura da Pele.

No desenvolvimento de formulações tópicas e transdérmicas é importante que se conheça a estrutura da pele e o modo como substâncias podem penetrá-la. De maneira geral, a absorção de fármacos através da pele ocorre passivamente. Existem três rotas principais pelas quais as substâncias podem penetrar o EC, são elas **(Figura 2)**: a rota intercelular (entre os corneócitos, através da matriz lipídica), a transcelular (através dos corneócitos) e a paracelular (pelos apêndices cutâneos). Sendo que a maioria das substâncias penetra a pele através da rota intercelular, ou seja, através da matriz lipídica (BARRY 2001).

Figura 2: Diagrama simplificado do EC e as rotas de penetração de fármacos (BARRY 2001).

Os efeitos bioquímicos da radiação solar sobre a pele são causados, principalmente, pelas radiações UVA e UVB. Hausser e Vahle mostraram que comprimentos de onda maiores são mais efetivos em promover a pigmentação e menores comprimentos de onda mais eritemogênicos (ANDERSON e PARRISH 1982). O UVA curto e UVB parecem atuar, na maioria das vezes como mutagênico direto, isto é, o DNA absorve a radiação que nele chega e sofre alterações em sua conformação que são reparadas e corrigidas. Se as alterações forem irreparáveis, ainda pode ocorrer apoptose. Quando não ocorre reparo, nem apoptose, há perigo de desenvolvimento de uma célula mutante. A UVA longo, diferentemente das ondas curtas, é pobremente absorvido pelo DNA. No entanto é absorvido por cromóforos

endógenos formando espécies reativas de oxigênio que podem, então, atacar o DNA (RIBEIRO 2006).

Câncer de pele em indivíduos brancos é predominante em áreas geográficas com maior exposição ao sol e nas pessoas mais expostas, isto é, indivíduos que trabalham ao ar livre. Eles são raros em negros e em indivíduos altamente pigmentados que tem maior proteção contra danos causados por UV.

Figura 3: Penetração da radiação na pele (WEB 1).

O câncer induzido pelo UV, dependendo das características de exposição pode ser classificado em carcinomas basocelulares, espinocelulares (ambos do tipo não melanoma) e o melanoma cutâneo maligno (ARMSTRONG e KRICKER 2001; RIBEIRO 2006), sendo o tipo basocelular o mais incidente (71%), quando comparado ao espinocelular (25%) e ao melanoma (4%) (LAUTH *et al.* 2004). Os cânceres de pele do tipo não melanoma são tratados através de cirurgia, eletrodissecação, criocirurgia, radioterapia, entre outros. Estas terapias possuem alto custo e também possuem o inconveniente de

deixarem cicatrizes e hipo ou hiperpigmentação, e terem efeitos colaterais, tais como dor, inflamação aguda, irritação e ferida que podem durar por semanas (PENG *et al.* 1995, Stender e WULF 1996, SZEIMIES e KARRER 1996, WENNERBERG *et al.* 1996). Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica tem se mostrado uma terapia eficaz e com excelentes resultados estéticos (TOUMA e SZEIMIES 2007).

1.2) Terapia Fotodinâmica

Fototerapia é o uso da luz visível ou visível próximo como agente terapêutico (BONNETT 1995). Existem 2 categorias: *Direta*, sem a administração de um fotossensibilizador (FS) (por exemplo, o tratamento de icterícia neonatal com luz azul/branca); e *Indireta* na qual o efeito é obtido através da administração de um FS que absorve a luz incidente, também conhecida como Terapia Fotodinâmica.

A TFD como tratamento para o câncer, apresenta a vantagem, quando comparada aos modos tradicionais de tratamento, de resultar em efeitos colaterais menos intensos e propiciar o acúmulo o fotossensibilizador em tecidos tumorais específicos em detrimento aos tecidos normais (DALLA VIA E MAGNO 2001; PANDEY 2000). Assim, a TFD pode ser utilizada para destruir seletivamente áreas doentes de tecido humano, principalmente muito eficiente no tratamento de câncer de pele, e com excelentes resultados estéticos.

1.2.a) História da Terapia Fotodinâmica (TFD)

As propriedades terapêuticas da luz são conhecidas há mais de 3 mil anos. Antigas civilizações egípcias, indianas e chinesas realizavam a ingestão de plantas (contendo psoralenos) complementadas pela exposição à luz no tratamento do vitiligo, psoríase e câncer de pele, mas apenas no último século que os estudos na área da TFD foram realmente desenvolvidos (SIMPLICIO 2002). No final do século XIX na Dinamarca, Niels Finsen, que conquistou o Prêmio Nobel de 1903, desenvolveu a fototerapia, ou o uso da luz no tratamento de doenças. Ele verificou que a exposição à luz vermelha podia controlar *lupus vulgaris* da pele de pacientes, uma doença comum na época (FINSEN 1901).

Em 1900 Oscar Raab, na Alemanha, relatou que a acridina resultava na morte inexplicável de organismos (incluindo algumas espécies de *Paramecium*) durante o dia, mas não durante os experimentos à noite (RAAB 1900; DOUGHERTY e MACDONALD 2001 e SIBATA 2004). Raab provou sistematicamente a conexão entre a ativação destes corantes com luz e a resposta terapêutica. Tappeiner e Jesionek, em 1903, trataram tumores de pele com eosina, aplicada topicamente, e luz branca. Eles descreveram este fenômeno como ação fotodinâmica (VON TAPPEINER e JESIONEK 1903; VON TAPPEINER e JODLBAUER 1907; DOLMANS et.al 2003). Em 1905, eles descreveram os resultados do tratamento de seis pacientes com câncer de pele facial.

Este tratamento foi realizado usando uma solução de 1% de eosina e

exposição à luz solar. Após um período de 12 meses de tratamento, quatro dos seis pacientes apresentaram remoção total dos tumores, enquanto os outros dois apresentaram remoção parcial (STERNBERG, DOLPHIN e BRÜCKNER 1998).

Em 1908, Hausmann iniciou os experimentos com hematoporfirina (HP), os quais foram realizados mediante administração da droga em camundongos e exposição à luz solar. Os efeitos foram associados à destruição da vasculatura tumoral (HAUSMANN 1910).

Em 1913, Meyer-Betz foi o primeiro a demonstrar que a HP causa fotossensibilidade em humanos (MEYER-BETZ 1913; HYNNINEN e NYMAN 2004). Ele injetou 200 mg da hematoporfirina, dissolvida em solução de hidróxido de sódio e diluída em solução salina, em seu próprio corpo e observou os sintomas de fotossensibilidade em áreas expostas à luz. Além disso, Meyer apresentou fotossensibilidade por vários meses após a administração da HP (STERNBERG, DOLPHIN e BRÜCKNER 1998).

Em 1955, Schwartz demonstrou que o princípio ativo utilizado por Meyer-Betz não correspondia à HP, uma vez que esta molécula não se acumula em tecidos tumorais. Devido ao método de preparação utilizado, Meyer havia injetado no próprio corpo uma mistura de porfirinas. Esta mistura foi amplamente estudada, e na tentativa de isolar a hematoporfirina do restante foi obtida uma substância que ficou conhecida como o derivado de hematoporfirina (HPD). (ACKROYD *et al.* 2001)

Figura 4: Meyer Betz antes da aplicação de HP e 3 dias após a aplicação, com 1 dia de exposição à luz solar (BONNETT 2000).

A tendência das porfirinas se acumularem em tumores foi observada em 1924, quando Policard observou a fluorescência característica da hematoporfirina em um experimento no qual sarcoma em ratos foi iluminado com a luz ultravioleta da lâmpada de Woods. Em 1950, Ronchese tentou ativar moléculas endógenas fluorescentes em tecidos tumorais para delinear seus limites de maneira mais precisa. Lipson e Baldes relataram no início da década de 60 que tecidos neoplásicos de pacientes fluoresciam sob luz ultravioleta após a administração HPD (LIPSON *et al.* 1961 a) e b); KESSEL 2004 a). Quando injetados, certos componentes oligoméricos da HPD se acumulavam em tumores de tal forma que podiam ser visualizados através de endoscopia fluorescente. A pesquisa nos anos 60 focou o uso do HPD na detecção de tumores. Naquele tempo, tratamento de tumores era mencionado apenas superficialmente. Um dos primeiros relatos, no final

da década de 60, demonstra que Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher que apresentava câncer de mama usando HPD e irradiação seletiva do tumor, marcando assim, o início da TFD como terapia clínica para câncer (LIPSON 1966). Neste mesmo sentido, em 1972, Diamond *et al.* publicaram a primeira descrição clara do uso de HPD para tratar um tumor transplantado para um rato (HYNNINEN e NYMAN 2004). Os resultados dos ensaios clínicos mais extensos foram fornecidos em 1978.

Em 1975 Dougherty e colaboradores relataram que a administração de HPD e luz vermelha erradicaram completamente tumor de mama crescido em ratos, enquanto Kelly e colaboradores verificaram a eliminação de câncer de bexiga em ratos. Em um dos primeiros estudos clínicos, que foi realizado por Dougherty e colaboradores, 25 pacientes com um total de 113 tumores de pele primários e secundários foram tratados com HPD. Em 98 deles observou-se resposta completa, em 13, resposta parcial e 2 deles se mostraram resistentes.

Desde então muitos relatos do uso de HPD na TFD tem sido publicados, mas estudos clínicos de fase III iniciaram-se em 1987 quando a forma comercial da HPD, o Photofrin® se tornou acessível. Desde então muitos mecanismos pelos quais a TFD funciona foram elucidados, muitos novos FS tem sido sintetizados, e vários estudos clínicos tem sido realizados, inclusive no Brasil **(Tabela 1)**. Apesar de diversos tipos de fotossensibilizadores terem sido, e ainda continuarem sendo

investigados, poucos são aprovados pelas autoridades da saúde para tratamento por TFD (SIMPLICIO 2002). O primeiro FS aprovado foi um derivado de hematoporfirina (Photofrin®), cuja aprovação é datada de 22 de dezembro de 1998. Posteriormente o medicamento Levulan® Kerastick foi aprovado para lesões na pele. Recentemente outro fármaco, uma benzoporfirina (Visudyne®) obteve liberação de uso.

Tabela 1: Alguns estudos publicados envolvendo tratamento de diferentes tipos de câncer por TFD.

Localização do câncer	Pesquisador/Ano - Referência
Esôfago	MCCAUGHAN 1984
Pulmão	BALCHUM 1984
carcinoma gástrico	HAYATA 1985
câncer de mama	DOUGHERTY 1979
	MANG 1998
	DIMOFTE 2002
tumores ginecológicos	WARD 1982
	HORNUNG 2001
	FEHR 2002
tumores intraoculares	GOMER 1983
	FAVILLA 1995
	LANDAU 2002
Cérebro	SANDEMAN 1986
	HILL 1990
	POPOVIC 1996
cabeça e pescoço	SCHWEITZER 1990
	BIEL 1998
câncer colorctal	BARR 1990
	MLKVY 1998
Intraperitoneal	DeLANEY 1993
Pâncreas	BOWN 2002

1.2.6) Fotoquímica da Terapia fotodinâmica

A TFD é uma modalidade de terapia que envolve 3 componentes: um FS, luz visível e oxigênio (OSEROFF e MORGAN 2001). A idéia principal é encontrar um bom FS que mostre seletividade ao tecido tumoral, administrar este composto no paciente, esperar um determinado período de tempo (que depende do FS utilizado e do tipo de tumor) para distribuição do FS no organismo de maneira a obter a máxima diferenciação entre os tecidos normais e tumorais e, por fim, irradiar o tumor com luz visível (BONNETT 1995).

Figura 5: Esquema da aplicação na TFD (web 2).

Os princípios fotofísicos envolvidos na Terapia Fotodinâmica estão ilustrados na **Figura 6** (HYNNINEN e NYMAN 2004). O estado fundamental do FS é um estado singlete (S_0). Com a absorção da luz em comprimento de onda apropriado, o FS é excitado ao primeiro estado excitado singlete (S_1), de curto tempo de vida. O FS pode retornar ao

estado S_0 emitindo a energia absorvida como fluorescência ou por conversão interna, liberando calor. Alternativamente, o FS no estado S_1 pode se converter ao primeiro estado excitado triplete (T_1) através de cruzamento intersistema. Esta transição é proibida por spin, todavia um bom FS tem um alto rendimento de formação do estado triplete. O estado T_1 apresenta um tempo de vida suficientemente maior para participar de reações químicas e portanto, a ação fotodinâmica é na sua maior parte mediada pelo estado T_1 .

Figura 6: Diagrama de Jablonsky (HYNNINEN e NYMAN 2004).

Existem 2 tipos de processos fotodinâmicos que levam à formação das espécies reativas de oxigênio (EROs). O processo do Tipo I envolve reações de transferência de elétrons ou hidrogênios entre o FS (T_1) e outras moléculas. Estes processos produzem intermediários reativos que são nocivos às células, tais como os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($\bullet OH$), bem como peróxido de hidrogênio. O processo Tipo II envolve

transferência de energia entre o FS (T_1) e o 3O_2 , levando à formação do oxigênio singlete que é citotóxico e o FS retorna ao estado fundamental (S_0). Tanto as reações do Tipo I quanto as do Tipo II resultam na oxidação de biomoléculas na célula.

A energia necessária para a transição do oxigênio no estado triplete para o singlete é de 22 Kcal.mol⁻¹ ou 94,5 KJ.mol⁻¹, que corresponde ao comprimento de onda de 1274 nm. Portanto, a diferença de energia entre o estado T_1 e S_0 do FS deve estar acima deste valor para que ocorra a formação do oxigênio singlete. Percebe-se que é necessária uma energia relativamente baixa para produzi-lo (DOUGHERTY e MACDONALD 2001; SPILLER *et al.* 1998).

O oxigênio singlete é um oxidante poderoso, portanto muito eletrofílico, reagindo rapidamente com ligações carbono-carbono insaturadas, nucleófilos neutros como sulfetos e aminas, bem como com ânions (DeROSA E CRUTCHLEY 2002). Assim, o oxigênio singlete pode reagir com muitos tipos de biomoléculas, tais como: triacilgliceróis insaturados, colesterol, fosfolípidos, amino ácidos como triptofano, histidina e metionina e bases nitrogenadas como guanina.

O oxigênio singlete é a única das espécies reativas de oxigênio que é um estado excitado. As EROs também incluem radicais livres (hidroxila e superóxido); e outras moléculas oxidantes (peróxido de hidrogênio). As EROs podem prontamente interconverter-se, tornando difícil verificar qual ERO é responsável por uma resposta celular particular (REDMOND E KOICHEVAR 2006). Algumas EROs são muito

reativas frente a biomoléculas e portanto apresentam curtos tempos de vida (por exemplo, $\bullet\text{OH}$ $10^8 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 10 ns). Em contraste, outras reagem lentamente com biomoléculas e existem tempos suficientes para difundirem-se. O tempo de vida de uma ERO limita a distância que a mesma pode difundir na célula. Portanto, a reação direta de uma ERO de curto tempo de vida é restrita a um volume subcelular ao redor do seu sítio de produção.

Figura 7: Tendências em tempo de vida, reatividade com biomoléculas e distância de difusão de algumas EROs nas células (REDMOND E KOICHEVAR 2006).

O tempo de vida do $^1\text{O}_2$, que é altamente reativo, varia de 10-100 μs em solventes orgânicos, sendo que em ambiente aquoso o tempo de vida do oxigênio é reduzido à aproximadamente 2 μs porque a energia do estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio nas moléculas de água é aproximadamente igual à energia do estado excitado singlete e, desta forma a energia é dissipada como calor do estiramento e movimentos vibracionais das moléculas de água (DOUGHERTY e MACDONALD 2001). Em ambiente celular o tempo de vida também é curto e, desta forma, ele restringe sua atividade em um volume esférico

de 10 nm de diâmetro, centrado no ponto de sua formação. Os sítios de dano dependem do tipo de FS utilizado, uma vez que diferentes FS acumulam em diferentes compartimentos celulares (HYNNINEN e NYMAN 2004).

Alguns parâmetros fotofísicos são essenciais na determinação da capacidade fotossensibilizante de um composto. Dentre eles podemos citar o rendimento quântico da produção de triplete que é a probabilidade do FS, após absorver um quanta de energia, se converter ao estado T_1 e o rendimento quântico da produção de oxigênio singlete (ϕ_Δ) que é a probabilidade de um FS, após absorver luz, se converter ao estado T_1 e então transferir esta energia ao 3O_2 (levando à formação do 1O_2). A habilidade do composto fluorescer é quantificada como seu rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f).

1.2.c) Fotossensibilizadores

A busca por novos fotossensibilizadores com propriedades mais adequadas é intensa. Um bom fotossensibilizador deve: Ser uma substância simples, de composição definida de síntese fácil, envolvendo poucas etapas para que a produção em larga escala seja viável; apresentar propriedades fotofísicas adequadas como elevada absorção na região da janela terapêutica (600-800 nm), onde ocorre maior penetração da luz nos tecidos, sem a ocorrência de efeitos térmicos indesejados; elevado rendimento quântico de triplete, com tempo de vida e energia adequados além de elevado rendimento

quântico de produção de oxigênio singlete; apresentar propriedades físico-químicas adequadas sendo preferencialmente anfifílico, não agregar em meio fisiológico, uma vez que a agregação reduz a eficiência fotoquímica, apresentar baixa toxicidade no escuro e farmacocinética favorável de maneira que ocorra acumulação seletiva nos tecidos alvo e relativamente rápida (em detrimento do tecido saudável). (BONNETT 1995; CASTANO 2004; SIMPLICIO 2002)

A porfina geralmente conhecida como FS de primeira geração é a PHOTOFRIN®. Os primeiros FS desenvolvidos no final dos anos 70 e início dos anos 80 eram porfirinas. A segunda geração de FS se refere mais à derivados porfirínicos (clorinas, ftalocianinas, etc.), obtidos a partir do final dos anos 80. A terceira geração de FS envolve o uso dos FS já desenvolvidos, mas modificados ou conjugados com anticorpos ou outras biomoléculas de modo a aumentar a seletividade e especificidade do FS (SIBATA 2004).

Novos FS tem sido desenvolvidos na busca de compostos mais eficientes. Inúmeras alterações estruturais podem ser feitas nos cromóforos e, neste sentido, o estabelecimento de relações estrutura-atividade que têm sido realizados com algumas séries de moléculas é de extrema importância para se identificar características estruturais que afetam a atividade biológica. Compostos como porfirinas catiônicas (RICCHELLI *et al.* 2005); derivados de benzoporfirinas (GRAHAM *et al.* 2003), pheophorbide-a (HENDERSON *et al.* 1997) purpurinimidas (CHEN *et al.* 2002; ZHENG *et al.* 2001) têm exibido

relações entre hidrofobicidade e atividade fotodinâmica. A presença de metais, como zinco e alumínio, coordenados aos macrociclos também mostram influência na atividade fotodinâmica final através da ligação às membranas biológicas (PASHKOVSKAYA *et al.* 2007).

Sabe-se hoje, que derivados porfíricos como clorinas e ftalocianinas apresentam propriedades fotofísicas mais interessantes que suas precursoras para uso como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. Por outro lado, ainda existem muitos aspectos a serem elucidados a respeito dos mecanismos envolvidos, principalmente as relações entre estrutura dos fotossensibilizadores, atividade, localização e mecanismo de morte celular. Neste sentido, a utilização de porfirinas alquiladas é muito mais viável, uma vez que a síntese de análogos clorínicos, por exemplo, seria extremamente trabalhosa e a diferença entre as estruturas da porfina e clorina não influenciaria de maneira significativa as propriedades biológicas das mesmas.

1.3) Aspectos Gerais de Porphirinas e Derivados

As porfirinas são macromoléculas de geometria quadrada planar, possuindo onze duplas ligações alternadas, formando assim um sistema altamente conjugado (**Figura 8**) (FALK 1964). A nomenclatura utilizada para nomear as porfirinas foi estabelecida por Smith (SMITH 1975) e Falk (FALK 1964) na qual as posições metínicas do anel porfírico são denominadas de α, β, γ e δ , ou também por meso ou ainda 5,10,15,20.

Figura 8: Esquema da estrutura de meso-arilporfirinas.

A introdução de substituintes periféricos leva a diferentes propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade química e fotoquímica, coeficiente de extinção molar, etc.

1.3.a) Síntese e Caracterização de Porfirinas

O primeiro método desenvolvido para a síntese de porfirinas foi desenvolvido por Rothmund (ROTHEMUND 1935, 1936, 1939). Segundo esta metodologia a porfirina é obtida através da condensação de pirrol e o aldeído de interesse, em meio de metanol contendo piridina, sob temperaturas elevadas (150-220 °C) por longos períodos de tempo (24-48 horas), em meio fechado sob condições anaeróbias. Poucas porfirinas foram sintetizadas segundo esta metodologia uma vez que as condições severas permitiam que poucos benzaldeídos substituídos fossem convertidos a porfirinas. Os rendimentos obtidos são da ordem de 5% e a porfirina obtida apresenta contaminação com a respectiva clorina.

Adler e colaboradores, como resultado dos estudos mecanísticos da síntese de porfirinas (ADLER, LONGO e SHERGALIS 1964), desenvolveram uma metodologia modificada na qual o pirrol e o aldeído são refluxados por meia hora em meio ácido (acético ou propiônico) e condições aeróbicas, obtendo-se rendimentos da ordem de 20%, mas ainda obtendo-se a clorina como impureza (aproximadamente 3%). Essas condições mais brandas, quando comparadas às condições do método de Rothmund, permitiu a utilização de uma variedade maior de benzaldeídos (ADLER *et al.* 1967).

Em 1987, Lindsey e colaboradores (Lindsey *et al.* 1987), baseados estudos biomiméticos de biossíntese de porfirinas e equilíbrio de ciclizações, desenvolveram uma metodologia para síntese de porfirinas em condições muito mais brandas e obtendo rendimentos de até 50%. Este método consiste no pré-equilíbrio do pirrol e benzaldeído em diclorometano anidro e atmosfera inerte, na presença de um catalisador ácido, para formar o porfirinogênio. Numa segunda etapa utiliza-se um oxidante, geralmente o p-cloranil (tetracloro-1,4-benzoquinona) ou DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona), para oxidar o porfirinogênio à porfirina (**Figura 9**).

Figura 9: Síntese de mesotetrafenilporfirinas, metodologia descrita por Lindsey.

Alguns anos depois, Gonsalves e colaboradores (GONSALVES, VAREJÃO E PEREIRA 1991) fizeram algumas modificações ao método de Lindsey, de forma a facilitar o isolamento e purificação da porfirim obtida. Segundo esta metodologia modificada, aldeído e pirrol são condensados em meio de nitrobenzeno e ácido propiônico por 1 hora a 120 °C sendo que a porfirim precipita, durante o resfriamento, ao término da reação e pode ser isolada por filtração.

As porfirinas sintéticas substituídas são geralmente derivados das porfirinas mais simples como a meso-*tetrakis*(tetrafenil)porfirim e a meso-*tetrakis*(4-N-piridil)porfirim (TPyP). Os derivados podem ser neutros, catiônicos e aniônicos e vêm sendo estudadas como possíveis FS para TFD seja na área fotofísica, fotoquímica e fotobiológica. Dentre eles podem ser citados a meso-*tetrakis*(4-sulfonatofenil)porfirim (TSPP) e seus metalocomplexos (KÚBAT e MOSINGER 1996), porfirinas anfífilas contendo grupos piridis alquilados (ELANGO VAN e KRISHNAN 1992; HE *et al.* 1998 e 1999; REDDI *et al.* 2002), porfirinas substituídas com açúcares

(Di STASIO *et al.* 2005; OBATA *et al.* 2007; TOMÉ *et al.* 2005) e mais recentemente, porfirinas contendo substituintes que são reconhecidos nas células por receptores específicos para otimizar a acumulação seletiva dos FSs em tumores (SCHNEIDER *et al.* 2005 e SOL *et al.* 2006).

A caracterização das porfirinas pode ser feita por várias técnicas, como: espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia de absorção no infravermelho, análise elementar, ressonância magnética nuclear de próton e espectrometria de massas.

1.3.6) Espectroscopia UV-Visível

Devido à conjugação cíclica, as porfirinas apresentam uma intensa absorção de energia conhecida como Banda Soret ou banda B (400-420 nm, $\epsilon \sim 10^5$) e usualmente quatro bandas Q de menor absorção na região do visível (510-660 nm, $\epsilon \sim 10^4$) (GOUTERMAN 1978). A intensidade relativa destas bandas é alterada devido à perturbação dos níveis de energia eletrônicos pela presença de substituintes na periferia da porfirina.

Figura 10: Espectro UV-Visível de uma Porfirina (WEB 3).

As bandas do espectro de absorção eletrônico das porfirinas são devido a transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas transições eletrônicas foram inicialmente interpretadas por Simpson (SIMPSON 1949) e Platt e colaboradores (LONGUET-HIGGINS, RECTOR e PLATT 1950). Simpson utilizou um modelo baseado em um polieno cíclico de 18 membros enquanto Platt utilizou orbitais moleculares gerados pela combinação linear de orbitais atômicos.

Baseado nos trabalhos de Platt, Simpson e vários outros trabalhos relevantes da época, Gouterman (GOUTERMAN 1959 e 1978) desenvolveu o modelo dos quatro orbitais de fronteira para elucidar os espectros de porfirinas e derivados. Segundo este modelo a existência das bandas é explicada supondo que os estados excitados resultam da promoção de um elétron dos orbitais de maior energia ocupados (HOMO), designados por a_{2u} e a_{1u} na notação apropriada para a simetria (D_{4h} - para as metaloporfirinas), e os dois orbitais vazios de menor energia (LUMO), que são de simetria e_g .

Cálculos das densidades eletrônicas sobre todos os átomos do anel porfirínico (SPANGLER *et al.* 1977) tornaram possíveis uma representação esquemática da distribuição da nuvem eletrônica, nos quatro orbitais envolvidos (Figura 11). Estes mapas de densidade demonstram um acúmulo de elétrons π sobre os átomos de nitrogênio pirrólicos. Isto sugere que a estabilidade da porfirimina está relacionada à presença destes átomos, em pontos do esqueleto onde, por razões geométricas, os elétrons π tendem a congregar-se.

Figura 11: Esquema dos 4 orbitais de Gouterman.

Estas representações em diagrama indicam que as transições HOMO-LUMO envolvem o deslocamento das densidades eletrônicas centradas principalmente sobre os átomos de nitrogênio eletronegativos para a periferia do anel porfirínico.

As transições $a_{2u} \rightarrow e_g$ e $a_{1u} \rightarrow e_g$ nas metaloporfirinas resultariam em dois estados excitados de simetria E_u , com energias próximas. Esta degenerescência é consequência da equivalência dos dipolos nas direções x e y no plano da molécula (GOUTERMAN 1959). Gouterman considerou que interações de configuração entre estes estados eram de suma importância para o entendimento dos espectros eletrônicos de porfirinas. Assim, interação de configuração resulta em bandas de comprimentos de onda e intensidades diferentes. *Interação construtiva* leva à banda intensa em menor comprimento de onda (banda B ou

Soret), enquanto que a banda fraca em maior comprimento de onda (banda Q) resulta da *interação destrutiva* (Figura 12).

Figura 12: Transições eletrônicas no modelo dos quatro orbitais de Gouterman (GOUTERMAN 1959, 1978)

Nas metaloporfirinas (simetria D_{4h}) são observadas 2 bandas Q, sendo uma delas a transição para o estado singlete excitado de menor energia e a outra, atribuída à transição envolvendo o nível vibracional ν_0 do estado fundamental e o nível ν_1 do estado singlete excitado.

Nas porfirinas base livre, com a diminuição da simetria de D_{4h} para D_{2h} , os estados E_u passam a ser não degenerados e desdobrando os dipolos de transição nas direções x e y. Consequentemente surgem duas transições. A combinação vibrônica destas duas transições resultam nas bandas $Q_y(1,0)$, $Q_y(0,0)$, $Q_x(1,0)$ e $Q_x(0,0)$ em ordem decrescente de energia e intensidade, explicando assim, o aparecimento das quatro bandas Q observadas nas porfirinas base-livre.

1.4) Interações dos FSs com tecidos

A interação dos FSs com células, sua capacidade de se incorporar e permear membranas, bem como sua habilidade em produzir espécies citotóxicas são fatores que influenciam na eficiência em causar a morte celular. Estas propriedades estão intimamente relacionadas à estrutura do FS (BRONSHTEIN *et al.* 2006).

Os grupos periféricos influenciam de maneira direta na acumulação do FS em células bem como atividade fotodinâmica final. A presença de uma cadeia de 6 átomos de carbono na Protoporfirina IX (PPIX) aumenta em quase 70% a eficiência de morte celular por TFD em relação ao seu precursor, devido à inserção mais profunda na membrana plasmática ou membranas de organelas intracelulares (BRONSHTEIN *et al.* 2006). A inserção mais profunda do FS na membrana está relacionada à sua estrutura, presença de cargas elétricas bem como sua distribuição (ENGELMANN 2007). A assimetria na distribuição de grupos polares também mostrou ser um fator importante na eficiência em causar morte celular de porfirinas glicosiladas, (Di STASIO *et al.* 2005) bem como a presença de substituintes fluorados nas posições *meso* do anel porfirínico (YOU, GIBSON E DETTY 2005) enquanto, a inserção de grupos volumosos como *meso*-substituintes levou à obtenção de FSs inefetivos (YOU, GIBSON E DETTY 2005). A presença de metais no centro do anel porfirínico (ou de seus derivados) também influencia a atividade fotodinâmica final sendo que diferentes metais

levam a maiores ou menores atividades. Zinco e alumínio têm se mostrado metais adequados para aumentar a eficiência do FS em causar a morte celular (HUANG *et al.* 2006; PASHKOVSKAYA *et al.* 2007).

Pequenas diferenças em propriedades físico-químicas alteram as afinidades dos FSs por sítios de ligação (específicos ou não) alterando a ligação em membranas e distribuição dos FSs em organelas (MORGAN E OSEROFF 2001). Hidrofobicidade, carga elétrica bem como a distribuição das regiões polares e apolares ao redor do macrociclo são fatores importantes na ligação dos FS em organelas específicas. Por exemplo, a presença de grupos periféricos específicos em derivados da bacterioclorina *p* cicloimida levaram à acumulação preferencial do FS nos complexos de Golgi, corpos lipídicos, lisossomos ou mitocôndrias (SHARONOV *et al.* 2006). A distribuição das cargas elétricas é igualmente importante: Kessel, Luguya e Vicente (KESSEL, LUGUYA E VICENTE 2003) mostraram que a presença de 2 grupos positivamente carregados (em “cis” ou “trans”) na tetrafenilporfirina levam à diferentes respostas celulares, bem como, diferentes localizações celulares, de modo que a porfirina substituída em “cis”, que se localiza em mitocôndrias, é mais citotóxica que a porfirina substituída em “trans” que se localiza em lisossomos. Da mesma forma, porfirinas substituídas nas posições *orto* e *para* dos grupos fenis mostraram atividades significativamente diferentes, sendo os FSs funcionalizados em *orto* os mais fototóxicos (SOL *et al.* 2006).

Além disso, o desenvolvimento de FSs contendo grupos que sejam reconhecidos por receptores específicos também é uma estratégia que tem se mostrado efetiva em se obter FSs mais eficientes (SCHNEIDER *et al.* 2005; SOL *et al.* 2006).

FS catiônicos são considerados interessantes uma vez que podem acumular em mitocôndrias, dirigidos pelo potencial da membrana mitocondrial interna (CERNAY e ZIMMERMANN 1996; ENGELMANN *et al.* 2007; GABRIELLI *et al.* 2004; KESSEL *et al.* 1997; MORGAN e OSEROFF 2001, RICCHELLI *et al.* 2005). Por causa de suas propriedades os FSs catiônicos são fortes candidatos à causarem toxicidade celular pelo dano direto à mitocôndria ao invés de induzirem efeitos vasculares que parecem ser a causa primária de morte celular no caso de FSs aniônicos (MORGAN e OSEROFF 2001).

A localização dos FSs em diferentes organelas ou outras estruturas celulares está relacionada à sua eficiência em causar a morte celular bem como, com o mecanismo de morte (BONNEAU, MORLIÈRE e BRAULT 2004).

A morte celular através de necrose ocorre após danos severos e descontrolados em várias estruturas celulares, causando rápida perda da capacidade em manter a homeostase celular (FOGLIENI, MEONI e DAVALLI 2001). Morfologicamente, ocorrem alterações drásticas na permeabilidade da membrana plasmática, que levam ao aumento do volume celular seguido da interrupção da função mitocondrial e

liberação do conteúdo intracelular. Desta forma, este tipo de morte celular é acompanhado de intensa inflamação (MACHADO *et al.* 2007).

Figura 13: Mudanças morfológicas e bioquímicas durante os processos de morte celular por necrose e apoptose. Adaptado de Darzynkiewicz *et al.* 1997.

A morte celular por apoptose é desejável quando se realiza um tratamento através de TFD. Apoptose é um processo de morte celular programada caracterizado pela diminuição do volume celular e condensação nuclear com conseqüente formação de corpos apoptóticos, impedindo o vazamento do conteúdo intracelular. A ativação de endonucleases que preferencialmente clivam o DNA em fragmentos menores é outro evento característico de apoptose, (DARZYNKIEWICZ *et al.* 1997) além da supressão do potencial eletroquímico mitocondrial e consumo de energia (processo ativo).

Mortes celulares por necrose ou apoptose são distintas em um ponto de vista mecanístico, uma vez que necrose é meramente um resultado passivo de um dano celular e apoptose é parte integral de um processo fisiológico celular normal (VERMES, HAANEN e REUTELINGSPERGER 2000).

As várias alterações biológicas celulares que ocorrem durante o processo de apoptose ocorrem numa seqüência ordenada. Algumas delas podem ser exploradas para discriminar células vivas e em processo de morte e também para analisar a extensão e o tipo de morte celular (KLAUS 2004). Se uma população de células diplóides é corada com uma substância fluorescente que se liga às moléculas de DNA, é possível verificar a existência de células com quantidade relativa de DNA característicos das fases G1, síntese, G2, e mitose do ciclo celular. O processo de divisão celular propriamente dito é a fase M do ciclo celular (mitose). A replicação do DNA nuclear é conhecida como a fase S (síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é conhecido como a fase G1 (gap ou lacuna) e G2 é o intervalo entre o final de síntese de DNA e o início da mitose. G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (duplicação da massa antes da divisão celular). Se forem encontrados pedaços de DNA menores que os característicos de G1, esses pedaços serão considerados sub-diplóides, por seu menor tamanho e são característicos de apoptose. Assim, a porcentagem de DNA sub-G1 é um indicativo da quantidade de células que morreram por apoptose.

Figura 14: Fases do ciclo celular: mitose- fase M/replicação - fase S/ intervalo entre M e S - fase G1/ intervalo entre S e M – fase G2. (WEB 4)

FSs que se localizam em mitocôndrias têm sido considerados particularmente importantes para uma terapia anti-câncer efetiva, uma vez que, a inibição de funções mitocondriais e o dano à componentes mitocondriais seria crítico para sobrevivência celular e capaz induzir uma rápida resposta apoptótica (BERLANDA *et al.* 2006; KESSEL *et al.* 1997; KESSEL E LUO 1998; RICCHELLI *et al.* 2005; OLEINICK, MORRIS E BELICHENKO 2002).

A localização de FSs no retículo endoplasmático tem mostrado promover danos oxidativos à proteína anti-apoptótica Bcl-2. FSs como: ftalocianina de silício, 9-caproniloxi-tetrakis(metoxietil)porfíceno, meso-tetra(3-hidroxifenil)clorina e etiopurpurina de estanho que mostram diferentes graus de localização no retículo endoplasmático causaram destruição da Bcl-2 e uma conseqüente resposta apoptótica (KESSEL 2004 b).

A relação entre localização de FSs em lisossomos e morte celular por apoptose ainda não é bem estabelecida. FSs que se localizam em lisossomos podem se redistribuir após a irradiação uma vez que os lisossomos podem ser rompidos e liberar o seu conteúdo no citosol. Dependendo da estrutura da molécula, o FS pode se realocar em sítios mais sensíveis, como mitocôndrias, ou sítios menos sensíveis (MORGAN E OSEROFF 2001). Para uma série de FSs com diferentes localizações celulares observou-se que o dano celular ao lisossomo ou lisossomo/membrana leva a um número reduzido de células em apoptose quando comparado a FSs que se localizam apenas em mitocôndrias (KESSEL E LUO 2001). Por outro lado, também existem relatos que o dano celular em lisossomos levaria à liberação de citocromo-c e conseqüente morte celular por apoptose (REINERS *et al.* 2002).

Além de estudos envolvendo localização de FSs em organelas específicas, de maneira a estabelecer o sítio de dano causado pelas espécies reativas geradas no tratamento por TFD também foi relatado que é possível iniciar o processo apoptótico através de reações de foto-oxidação próximas à membrana plasmática (LIN, LYNCH E KOICHEVAR 2000). Desta forma, moléculas inseridas e próximas à membrana plasmática seriam oxidadas e os produtos destas reações iniciariam o processo apoptótico.

Frente a estes resultados, percebe-se que o estabelecimento de relações entre estrutura do FS, atividade, citolocalização e mecanismo

de morte celular se mostra extremamente interessante no estudo de novos FSs.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar novos fotossensibilizadores porfirínicos para uso em terapia fotodinâmica, estudando propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas dos mesmos, além de estabelecer relações entre estrutura molecular do FS, fotoatividade, localização celular e mecanismo de morte celular por meio alterações estruturais nas porfirinas através de alquilação e inserção de zinco no anel. Também espera-se verificar a viabilidade de utilização destes compostos na terapia fotodinâmica tópica para o tratamento do câncer de pele.

Capítulo 2: Parte Experimental

2.1) Princípio das Técnicas Utilizadas:

2.1.1) Espectroscopia eletrônica de absorção e emissão

A técnica de absorção baseia-se na capacidade de um cromóforo absorver radiação em um comprimento de onda definido enquanto a espectroscopia de emissão baseia-se na emissão de radiação após a absorção. Medidas espectroscópicas de absorção e emissão são úteis como formas de caracterizar o fotossensibilizador em questão e utilizar essas características para quantificar sua presença e efeito em sistemas biológicos.

2.1.2) Oxigênio Singlete

Diferentes métodos têm sido utilizados para a determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete, os quais podem ser divididos em métodos fotofísicos ou fotoquímicos. No caso dos métodos fotoquímicos acompanha-se espectroscopicamente o decaimento de uma sonda quando irradia-se uma solução contendo oxigênio, o FS e a sonda. Dos métodos fotofísicos, o mais utilizado é a medida da luminescência do oxigênio singlete na região de 1270 nm (SPILLER *et al.* 1998).

Neste trabalho, foi utilizado o método fotofísico. Para detecção do oxigênio singlete foi determinado o espectro de emissão (com

máximo em 1270 nm) registrado de 1200 a 1320 nm. Foi utilizado um sistema constituído de um laser Nd:YAG Continuum Surelite III em 532 nm, pulsado (10 Hz); uma fotomultiplicadora Hamamatsu modelo R5509 resfriada a - 80 °C; um sistema de detecção da Edinburg Analytical Instruments com o software de aquisição LP900 (DeROSA E CRUTCHLEY 2002; PAVANI *et al.* 2009).

Figura 15: Esquema do sistema para detecção do oxigênio singlete. (PMT-fotomultiplicadora)

2.1.4) Citometria de Fluxo (FACS- Fluorescence Activated Cell Sorting)

Citometria de fluxo é uma tecnologia que simultaneamente mede e analisa múltiplas características físicas de células em suspensão. São medidas propriedades como: tamanho relativo de partícula, granulosidade (ou complexidade interna), e intensidade relativa de fluorescência.

O citômetro consiste de 3 sistemas principais: fluídico, ótico e eletrônico. O sistema fluídico transporta as partículas em fluxo até o feixe de laser para a análise; o sistema ótico consiste de lasers para

iluminar as partículas na amostra e filtros óticos para direcionar os sinais de luz resultante para os detectores e, finalmente, o sistema eletrônico que converte os sinais detectados em sinais eletrônicos que podem ser processados pelo computador.

Um feixe de luz laser ilumina cada célula em movimento e a luz é espalhada em todas as direções. A medida da luz difratada - FSC (forward-scattered light) - é proporcional à área superficial da célula ou tamanho. A medida da luz refratada ou refletida - SSC (Side-scattered light) - é proporcional à granulosidade ou complexidade interna, e é detectada à 90° do feixe de laser. A quantidade total detectada de luz espalhada depende do tamanho da célula e índice de refração, mas é estritamente relacionada à área da célula vista pelo laser, enquanto que a quantidade lateral de luz espalhada pode indicar a forma nuclear e a granulosidade celular.

Outras propriedades celulares, como moléculas superficiais e constituintes intracelulares, também podem ser detectadas se um constituinte de interesse for marcado com uma molécula fluorescente (como DNA com iodeto de propídeo, por exemplo). Em termos de fluorescência, o laser de argônio é comumente utilizado (488 nm), uma vez que o mesmo pode excitar uma variada gama de fluoróforos. Existem detectores de fluorescência (em diferentes regiões), de maneira que podem ser usados simultaneamente mais de um marcador (desde a emissão dos mesmos apresente um intervalo de comprimento de onda adequado).

2.1.5) Monocamadas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett

Moléculas anfifílicas podem orientar-se na interface ar-água de maneira que expõem as cabeças polares para a fase aquosa e posicionam a cadeia hidrocarbônica (hidrofóbica) para contato com o ar, orientando-se desta forma na interface por ser a situação energeticamente mais favorável, (SHAW 1975) conforme esquematizado na Figura 16.

Figura 16: Formação de monocamada na interface ar-água.

Se uma substância anfifílica for espalhada sobre uma interface líquida, as moléculas podem ser convenientemente orientadas por compressão mecânica formando uma camada monomolecular, chamada de monocamada de Langmuir. À medida que a monocamada vai sendo comprimida, a área disponível para as moléculas vai sendo reduzida e a interface sofre modificações associadas a uma redução crescente na tensão superficial e conseqüentemente aumento na pressão superficial. Para isso, usa-se a balança de superfície ou cuba de Langmuir, que é um sistema que

permite a preparação de monocamadas e a realização de medidas de pressão superficial, bem como a transferência de monocamadas orgânicas para substratos sólidos.

A cuba de Langmuir (**Figura 17**) é um compartimento retangular revestido internamente de um material como o teflon (poli(tetrafluoroetileno) - de modo a eliminar os efeitos resultantes da interface líquido-sólido) e contém uma barreira móvel. Este compartimento é preenchido com água ou alguma solução aquosa, sobre a qual se espalha a substância tensoativa em pequenas concentrações ($1,0 \cdot 10^{-4}$ a $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹) dissolvida em solvente orgânico volátil. Após a evaporação do solvente orgânico, coloca-se a barreira móvel para varrer a superfície e comprimir as moléculas formando um filme de espessura monomolecular. Conforme a monocamada vai sendo comprimida, a pressão superficial vai sendo modificada (ATKINS 1998). As medidas de tensão superficial são realizadas com um dispositivo de placa de Wilhelmy suspenso a uma microbalança acoplada a um microcomputador. O princípio da medida está relacionado com a identificação da força agindo por unidade de perímetro da placa quando a mesma é colocada em contato com a interface líquida, como a tensão superficial.

Figura 17: Foto da cuba de Langmuir utilizada; identificados: barreira móvel, motor para deposição dos filmes e sensor de pressão.

2.1.6) Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL):

O espalhamento dinâmico de luz é uma técnica amplamente utilizada para a caracterização de microemulsões. Trata-se de uma técnica para a medição do tamanho de partículas tipicamente com tamanho menor que $1\ \mu\text{m}$.

Partículas em suspensão apresentam movimento Browniano. Se essas partículas são iluminadas com um feixe de luz laser, ocorre o espalhamento da luz. A intensidade da luz espalhada, detectada num ângulo determinado, varia numa taxa dependente da velocidade de difusão da partícula, a qual, por sua vez, é governada pelo seu tamanho. Dados do tamanho da partícula podem ser gerados a partir

da análise da variação na intensidade da luz espalhada (PECORA 1985).

Em equipamentos convencionais de espalhamento dinâmico de luz, a luz é espalhada pelas partículas em todos os ângulos, porém é detectada apenas em 90°. As variações na medição da intensidade da luz espalhada são convertidas em pulsos elétricos, os quais são armazenados. Informações sobre o tamanho das partículas são geradas a partir destes dados.

2.II) Metodologias:

2.II.1) Síntese da TMePyP

A síntese foi realizada segundo a metodologia descrita por Meunier (MEUNIER *et al.* 1993) na qual desaeira-se 100 mg ($1,6 \times 10^{-4}$ mols) da TPyP a ser metilada por 2 horas. Adiciona-se 20 mL de DMF e desaeira-se por mais 30 minutos. Adiciona-se 5 mL ($8,0 \times 10^{-2}$ mols) de iodeto de metila, agita-se magneticamente por aproximadamente 5 horas a 40° C e ao abrigo da luz. A reação é monitorada por CCD uma vez que o produto final não migra quando se utiliza a sílica gel como fase estacionária e como eluente uma mistura de DCM e EtOH (95:5).

Ao término da reação adiciona-se éter etílico à mistura para promover a precipitação da porfirina. Filtra-se o sólido e lava-se com éter etílico. A porfirina catiônica é solubilizada em ACT e água (1:1) e após evaporação parcial do solvente é precipitada por adição de ACT.

O produto é filtrado e lavado com ACT. Obteve-se 135 mg do produto puro, um rendimento de 65%.

2.II.2) Inserção de zinco na TPyP

Realizou-se a metalação da TPyP através do método descrito por Buchler (BUCHLER e PALMER 1978), no qual 306 mg ($4,94 \times 10^{-4}$ mol) desta porfirina foram refluxados em uma mistura de diclorometano e metanol na proporção de 1:1, adicionando-se posteriormente 108 mg ($4,94 \times 10^{-4}$ mol) de acetato de zinco ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) e mantendo-se sob refluxo por 90 minutos. Acompanhou-se o desenvolvimento da reação por espectroscopia na região UV-Vis. Lavou-se o produto obtido com acetona, obtendo-se a 5,10,15,20-tetrakis(4-N-piridil)porfirinato zinco (II) (ZnTPyP). Obteve-se 317,6 mg da ZnTPyP, um rendimento de 96%.

2.II.3) Metilação da ZnTPyP

Utilizou-se a metodologia descrita por Meunier (MEUNIER *et al.* 1993). Des aerou-se 50,0 mg ($7,3 \times 10^{-5}$ mol) da ZnTPyP em 25 mL de DMF por 2 horas.

Adicionou-se 2,2 mL ($3,5 \times 10^{-2}$ mol) do iodeto de metila e agitou-se a mistura, magneticamente, por aproximadamente 3 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada, uma vez que o produto final não apresenta migração. O solvente foi eliminado em um evaporador rotatório, solubilizou-se o sólido em MeOH e realizou-se a precipitação

em éter etílico. Foram obtidos 50 mg da ZnTMePyP um rendimento de 77 %.

2.II.4) Síntese da TC8PyP

Método de Calvin (CALVIN *et al.* 1980) 50 mg ($8,08 \times 10^{-5}$ mols) da TPyP foi mantida em refluxo sob atmosfera inerte, por 3 horas, em uma solução de DMF contendo 2,00 ml ($1,14 \times 10^{-3}$ mols) de 1-bromooctano. Foram adicionadas mais duas porções de 1,00 mL do brometo alquílico, uma após 1 e outra após 2 horas de reação. A reação foi acompanhada por espectroscopia na região UV-Vis.

O solvente foi eliminado utilizando-se bomba de alto vácuo. O sólido obtido foi dissolvido com éter etílico e adsorvido em celite e posteriormente lavado com este solvente para remover o excesso do brometo utilizado. O produto foi então extraído da celite com metanol aquecido. O extrato foi levado para o evaporador rotatório e o solvente eliminado.

Realizou-se a purificação através de cromatografia de adsorção em coluna, utilizando alumina neutra como fase estacionária e uma mistura de DCM/MeOH (9:1) como eluente.

Foram obtidos 83,0 mg (rendimento 74%). Realizou-se a caracterização estrutural através de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e análise elementar.

2.II.5) Inserção de zinco na TC8PyP

Realizou-se a metalação utilizando a metodologia que faz uso do sal de acetato (SMITH 1975 e KADISH 2001). Manteve-se sob refluxo em metanol 78,0 mg ($5,6 \times 10^{-5}$ mols) da TC8PyP e 123 mg ($5,6 \times 10^{-4}$ mols) de acetato de zinco durante 2 horas. Realizou-se a purificação através de cromatografia de adsorção em coluna, utilizando como fase estacionária óxido de alumínio neutro e como fase móvel uma mistura água/DCM/ACT (1:10:29 v/v/v). Foram obtidas 81 mg da ZnTC8PyP (99% de rendimento) e a caracterização foi realizada por análise elementar.

2.II.6) Síntese da TC14PyP

Utilizou-se a metodologia descrita por Calvin (CALVIN *et al.* 1980) na qual 50 mg ($8,1 \times 10^{-5}$ mols) de TPyP foram mantidos em refluxo em 2 mL de DMF e 4 mL ($1,3 \times 10^{-2}$ mols, excesso de 40 vezes) de brometo de tetradecila adicionado em porções de 1 mL durante as 4 horas de reação em atmosfera inerte. A reação foi acompanhada através de espectroscopia na região UV-vis.

Parte do solvente foi retirada utilizando-se bomba de alto vácuo. Adicionou-se celite à mistura e lavou-se com éter etílico. Extraiu-se a porfirina da celite com MeOH à quente. Evaporou-se o solvente em evaporador rotatório.

Realizou-se a purificação através de sucessivas colunas de cromatografia de adsorção em alumina neutra, utilizando como

eluente uma mistura de diclorometano/metanol (9:1), realizando continuamente a análise das frações por CCD. Obteve-se 68 mg da porfirina de interesse após purificação, com rendimento de 49%. Foi realizada caracterização através de espectrometria de massas com ionização por eletrospray e análise elementar.

2.II.7) Inserção de zinco na TC14PyP

Realizou-se a metalação utilizando a metodologia que faz uso do sal de acetato (SMITH 1975 e KADISH 2001). Manteve-se sob refluxo em metanol 40,0 mg ($2,3 \times 10^{-5}$ mols) da TC14PyP e 50,5 mg ($2,3 \times 10^{-4}$ mols) de acetato de zinco durante 2 horas. O solvente foi evaporado e realizou-se extração em água/DCM de modo que o excesso do sal de zinco foi retirado na fase aquosa. Foram obtidos 41,0 mg da ZnTC14PyP (rendimento de 99%).

2.II.8) Espectroscopia eletrônica de absorção e coeficientes de absortividade molar (ϵ)

Registraram-se os espectros de absorção das porfirinas de 350 a 800 nm, em um espectrofotômetro diode-array (HP 8452A). O coeficiente de absortividade molar nos máximos de absorção das porfirinas foi calculado através da obtenção de uma reta (absorbância versus concentração) segundo a lei de Lambert-Beer. Preparou-se uma solução estoque de cada um dos compostos em metanol, de concentração aproximadamente 10^{-4} molL⁻¹. A cada adição de

alíquotas do estoque registrou-se os espectros em uma cela de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico.

2.II.9) Espectroscopia eletrônica de emissão e determinação do rendimento quântico fluorescência (ϕ_f)

Os espectros de emissão de 600 a 800 nm foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1934D, em soluções das porfirinas em metanol. O rendimento quântico de fluorescência foi obtido através da relação entre as absorbâncias e o valor resultante da integração do espectro de emissão de um padrão previamente escolhido e da amostra, segundo a equação abaixo (DEMAS e CROSBY 1971; EATON 1988):

$$\phi_{fl} = \frac{Abs_p A_a n_a^2}{Abs_a A_p n_p^2} \phi_p$$

Onde ϕ_p é o rendimento quântico de fluorescência do padrão (obtido na literatura), ϕ_{fl} é rendimento quântico de fluorescência da amostra, A_a é o valor resultante da integração do espectro de emissão da amostra, A_p é o valor obtido da integração do espectro de emissão do padrão, Abs_p é a absorbância do padrão no comprimento de onda de excitação e Abs_a é a absorbância da amostra no comprimento de onda de excitação, n_a é o índice de refração do meio no qual a amostra está contida e n_p o índice de refração do meio no qual o padrão está contido.

Foram utilizadas soluções dos compostos em MeOH, com absorvância abaixo de 0,1 em 515 nm (utilizando-se a cubeta com 1,0 cm de caminho ótico) para evitar interferências de filtro interno e reabsorção de fluorescência. Como padrão utilizou-se uma solução de azul de metileno também em MeOH. Os compostos foram excitados em 515 nm, registrando a emissão de 600 a 750 nm. Foi utilizado filtro na emissão maior que 606 nm e fendas de 10 nm na excitação e de 1 nm na emissão.

2.II.10) Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (ϕ_A)

Utilizou-se o método fotofísico no qual se realiza medida direta da luminescência (1270 nm) do oxigênio singlete gerado. O rendimento quântico da produção de oxigênio singlete foi obtido através da relação entre as absorvâncias e integrais dos espectros de fosforescência do $^1\text{O}_2$ (1200 a 1340 nm) de um padrão previamente escolhido e a amostra, segundo a equação abaixo: (COSA e SCAIANO 2004; TANELIAN e HEINRICH 1995)

$$\phi_A = \frac{I_A A_P}{I_P A_A} \phi_P$$

Onde ϕ_P é o rendimento quântico da produção de oxigênio singlete do padrão (obtido na literatura), ϕ_A é rendimento quântico da produção de oxigênio singlete da amostra, I_P é a integral sob a curva de emissão do $^1\text{O}_2$ produzido pelo padrão, I_A é a integral sob a curva de

emissão do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra, A_P é a absorbância no comprimento de onda de excitação do padrão e A_A é a absorbância no comprimento de onda de excitação da amostra.

Para a determinação do rendimento quântico da produção de oxigênio singlete as amostras foram excitadas com um laser Nd:YAG (Continuum Surelite III) em 532 nm pulsado a 10 Hz, com pulsos de 5 ns. A radiação emitida pelo $^1\text{O}_2$ (em 1270 nm) foi detectada em ângulo reto por uma fotomultiplicadora (Hamamatsu R5509) resfriada com nitrogênio líquido. Foram utilizadas soluções dos compostos em MeOH, em cinco diferentes concentrações. As absorbâncias das amostras e dos padrões foram ajustadas em 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,30 (cubeta com 1,0 cm de caminho ótico) em 532 nm. Como padrão se utilizou uma solução de 5,10,15,20-tetrakis(sulfonatofenil)porfirina em MeOH.

2.II.11) Incorporação das porfirinas em lipossomas

Foram pesados 21,0 mg de DOPC, 9,0 mg de PG e realizou-se a solubilização em clorofórmio. Em seguida, foi realizada uma secagem lenta visando à obtenção do filme lipídico. O filme é rompido através de agitação mecânica em tampão fosfato. A suspensão obtida foi então centrifugada por 3 minutos à 15000 rpm e o sobrenadante descartado. As vesículas foram suspensas e novamente centrifugadas até que o sobrenadante estivesse límpido. Este processo foi realizado visando-se a obtenção de vesículas de tamanhos aproximadamente iguais, retirando-se as menores em suspensão.

Uma alíquota de 50 μL desta suspensão de vesículas foi adicionada a cada uma das soluções de porfirina em tampão fosfato (triplicata). Uma amostra de cada solução de porfirina foi reservada para posterior quantificação. Após a agitação mecânica as misturas de porfirina com vesículas foram mantidas por 1 hora em repouso, centrifugou-se e retirou-se o sobrenadante para quantificação. Por fim adicionou-se 500 μL de solução de ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em todos os frascos já sem solução, visando quantificar as porfirinas que poderiam estar aderidas ao plástico. Mediu-se o valor de absorbância (no comprimento de onda do máximo de absorção) de todas as soluções. Para efeito de cálculo, foram considerados iguais os coeficientes de absorvidade molar da porfirina protonada e não protonada.

Em todos os experimentos que envolvem interação dos FSs com tecidos a porfirina TC14PyP não foi estudada devido à baixa solubilidade da mesma em meio aquoso.

2.II.12) Incorporação das porfirinas em células HeLa

Todos os experimentos com cultura de células foram realizados posteriormente à obtenção das células aderidas às placas seguindo o seguinte protocolo: Após o descongelamento das células e crescimento das mesmas em garrafas, as células são contadas e colocadas em placas em uma concentração de 10^5 células/poço. Após um período de 18 horas (em meio de cultura, estufa à 37°C , em ambiente úmido e na presença de 5% de gás carbônico) os experimentos são, então,

realizados. Para isto, foi utilizada a infra-estrutura do laboratório de processos fotoinduzidos e interfaces, liderado pelo Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista, IQ-USP.

Determinou-se a porcentagem de incorporação das porfirinas adicionando-se 2,0 mL de uma solução da porfirina em meio de cultura ($\sim 15 \mu\text{molL}^{-1}$) em cada poço da placa contendo a cultura de células HeLa (10^5 células/poço). A placa foi mantida em estufa para incubação por 3 horas. Foram retirados 500 μL do sobrenadante de cada poço aos quais são adicionados 500 μL de uma solução de SDS 100 mmolL^{-1} , reservou-se as soluções para quantificação. O restante do sobrenadante de cada poço foi retirado e desprezado. As células remanescentes de cada poço foram lavadas com PBS gelado e adicionou-se 1,0 mL de solução de SDS 50 mmolL^{-1} que promoveu a lise da membrana celular e permitiu a quantificação da porfirina incorporada. Por fim, foram adicionados 1,0 mL de solução de ácido clorídrico $1,0 \text{ molL}^{-1}$ aos poços para quantificar porfirinas que podem ter ficado aderidas à placa de plástico. Determinou-se a absorbância das soluções no comprimento de onda da banda Soret da porfirina correspondente. Para os cálculos considerou-se que o coeficiente de absortividade molar da porfirina protonada e não protonada são aproximadamente iguais.

2.II.13) Incorporação das porfirinas em mitocôndrias isoladas

As mitocôndrias foram isoladas a partir de fígado de ratos utilizando o método de centrifugação diferencial (GABRIELLI *et al.* 2004). Para a extração foi usado tampão Hepes $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$, contendo sacarose 250 mmolL^{-1} e EGTA $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em pH 7,4 (tampão de extração). O fígado foi retirado, triturado e homogeneizado em tampão. Essa suspensão foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos, o precipitado foi desprezado e o sobrenadante centrifugado novamente, por 10 minutos a 10000 rpm para promover a sedimentação das mitocôndrias. O sobrenadante foi descartado e as mitocôndrias foram lavadas mais duas vezes realizando a suspensão e centrifugação das mesmas em tampão de extração. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo para evitar a degradação da amostra de mitocôndrias. A concentração de mitocôndrias expressa neste trabalho refere-se à concentração de proteínas na mitocôndria, dosada pelo método do biureto (GABRIELLI *et al.* 2004 e NETTO *et al.* 2002). Para o experimento foi utilizado tampão Hepes 10 mmolL^{-1} contendo sacarose 250 mmolL^{-1} , EGTA $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$, succinato $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e fosfato de sódio dibásico $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em pH 7,2 (tampão de aplicação). Preparou-se 7,0 mL de solução de cada uma das porfirinas de absorbância aproximadamente 0,8 em tampão de aplicação. Esse volume foi dividido em partes de 1,0 mL. Um deles foi reservado como referência para leitura de absorbância. Em todos os demais foram colocados 1,5

μL de solução de rotenona $20,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ de oligomicina $1,0 \text{ mg/mL}$. Na triplicata de amostras em que seria feito o experimento com mitocôndrias desacopladas foram adicionados $3,0 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de CCCP. Foram adicionados em cada um dos frascos $24 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão de mitocôndrias ($83,0 \text{ mg/mL}$) resultando na incubação com $2,0 \text{ mg/mL}$ em cada frasco. Os frascos foram mantidos em banho de gelo, e assim que a suspensão de mitocôndrias foi adicionada, foi feita uma rápida agitação manual seguida de centrifugação por 2 minutos a 10000 rpm . Os sobrenadantes são retirados e reservados para determinação da taxa de incorporação através da leitura de absorbância no máximo de absorção (banda Soret) de cada porfirina.

2.II.14) Toxicidade e Fototoxicidade em células HeLa

Retirou-se o meio de cultivo das placas contendo a cultura de células, as células foram lavadas com PBS, e colocou-se novo meio de cultivo, contendo o FS. Alguns poços foram mantidos sem FS como controle. Após 3 horas de incubação retirou-se o meio contendo droga e as células foram lavadas com PBS. Nesta etapa, nos experimentos de fototoxicidade, foi realizada a irradiação. Irradiou-se os poços em ciclos de 1 minuto de irradiação e 1 minuto sem irradiação para oxigenação, repetindo-se 7 vezes. Adicionou-se meio de cultura e a placa foi colocada novamente na estufa por mais 48 horas, quando foi feita a incubação com MTT (2 mg/mL em tampão fosfato) por 4 horas. A redução do MTT é considerada indicativa da atividade metabólica

celular e sua medida é comumente utilizada para avaliar proliferação e viabilidade celular (COLLIER E PRITSOS 2003 e TREVISI *et al.* 2006). O MTT é um composto solúvel em solução aquosa que é internalizado pelas células e complexa com enzimas mitocondriais (Succinato Desidrogenase e Citocromo C Oxidase) sendo reduzido a cristais de formazan. Retirou-se a solução de MTT e adicionou-se DMSO. Após 1 hora foi feita a medida de absorção em 550 nm e a porcentagem de células vivas celular foi calculada em relação às células de controle incubadas apenas com meio de cultura. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

2.II.15) Sublocalização Celular

Examinou-se a localização celular dos compostos através das imagens obtidas em um microscópio confocal (Zeiss LSM510) de células HeLa incubadas por 3 horas com as porfirinas ($\sim 10 \mu\text{molL}^{-1}$) e com rodamina 123, 250 nmolL^{-1} (um marcador mitocondrial) por 1 hora. Para obtenção das imagens de fluorescência das porfirinas foram usados filtros em 514 nm na excitação e 600-800 nm na emissão e para o marcador (rodamina 123) foram utilizados 488 nm na excitação e 500-530 nm na emissão. As imagens foram tratadas por técnicas de deconvolução 2D através do software Metamorph 6.3r2 (Molecular Devices, 2005).

2.II.16) Quantificação de núcleos sub-diplóides

As células passaram pelo mesmo protocolo utilizado nos experimentos de toxicidade no escuro e fototoxicidade. 48 horas após a incubação/irradiação, os sobrenadantes foram retirados dos poços e transferidos para tubos de 15 mL. As células foram lavadas com PBS, adicionou-se 300 µL de tripsina e esperou-se 5 minutos, quando, então, foi colocado 1mL de meio DMEM em cada poço. Essa suspensão foi colocada no mesmo tubo do sobrenadante retirado inicialmente. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi suspenso em 1 mL de tampão de ligação (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 1,8 mM de CaCl₂, esterilizado por filtração). Centrifugou-se novamente (mesmo intervalo de tempo e rotação). O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 1mL de meio de cultura (sob agitação) e 3 mL de álcool etílico (70%) à -20 °C. Os tubos foram mantidos no congelador até o dia de realização da leitura das amostras no citômetro (aproximadamente 20 dias), quando então são centrifugados novamente por mesma velocidade e tempo. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado à cada tubo 1 mL de solução de RNase (200 µg/mL). Após 1 hora de incubação a reação foi parada com gelo, as amostras foram centrifugadas (mesma rotação e intervalo de tempo), o sobrenadante desprezado e por fim as células foram suspensas novamente em 185 µL de uma solução de iodeto de propídeo (50 µg/mL), e mantidas no

escuro em temperatura ambiente por 30 minutos até leitura. Após a leitura no citômetro de fluxo os dados foram tratados no software WinMDI 2.8.

2.II.17) Monocamadas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett

Foram utilizadas as porfirinas TC14PyP e a ZnTC14PyP. Dois lipídeos carregados negativamente foram utilizados: DMPA e DMPG, e um zwitterionico DMPC, todos apresentando a mesma cadeia de 14 átomos de carbono. As isothermas área-pressão de superfície (π -A) foram obtidas à $25,0 \pm 0,5$ °C em uma cuba de Langmuir de 216 cm² após espalhar os lipídeos dissolvidos em uma solução clorofórmio/metanol (3:1 v/v) a 1,0 mmol L⁻¹. Nas monocamadas mistas foi utilizada a razão molar 4:1 lipídeo:porfirina. Como subfase foi utilizada água pura ou solução aquosa 0,1 mmolL⁻¹ de ZnCl₂.

Filmes LB: As monocamadas foram depositadas em suportes pelo uso da técnica de Langmuir-Blodgett. Os filmes foram formados através da imersão do substrato sólido na subfase antes do espalhamento da mistura lipídeo/porfirina. Sete camadas das monocamadas mistas foram depositadas através de uma sequência de emersões e imersões da placa à 0,038 mm.s⁻¹. A pressão de superfície foi mantida constante à 40 mN m⁻¹. Estes filmes foram preparados com o objetivo de estudar as propriedades fotofísicas destas misturas.

Fotofísica: Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV-vis diode array Hewlett Packard (mod. 814) e os

espectros de emissão obtidos em um espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1934D.

2.II.18) Permeação e Retenção Cutânea

2.II.18.a) Obtenção das peles

A pele da orelha de porco foi utilizada como modelo nos estudos de permeação/retenção. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente sacrificados foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente na pele. As secções de pele foram dermatomizadas (100 μm) e então congeladas por até um mês antes de serem utilizadas nos ensaios.

2.II.18.b) Preparação e caracterização das microemulsões

A formulação utilizada neste trabalho foi previamente desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof. Dra. Maria Vitória L.B. Bentley (FCFRP-USP). A microemulsão (ME) água em óleo (A/O) utilizada é composta de óleo de canola, dos tensoativos monoleato de sorbitano (Span[®] 80) e monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween[®] 80), propilenoglicol e água (**Tabela 2**). Esta ME foi previamente caracterizada como um líquido isotrópico de condutividade 0,63 $\mu\Omega/\text{cm}$; viscosidade $204,6 \pm 7,1$ cps e diâmetro médio de gotículas 15,7 nm (polidispersidade 0,10) (ROSSETTI 2006).

Os FSs foram incorporados nas MEs numa proporção de 4% em massa. Foram utilizadas as porfirinas base livre (TMePyP e TC8PyP) além da TBzPyP, uma porfirina de estrutura similar às demais, fornecida pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Gianlucca C. Azellini, do IQ-USP. A porfirina TC14PyP não foi utilizada, uma vez que por conter quatro cadeias alquílicas mais longas que as demais, não é solúvel em meio aquoso. As MEs contendo os FSs foram caracterizadas por distribuição do tamanho de partículas.

Tabela 2: Composição da ME.

Componente	% massa
Óleo de Canola	38,25
Span [®] 80	35,06
Tween [®] 80	11,68
Propilenoglicol	11,25
Água	3,75

2.II.18.c) Permeação e Retenção

Foram realizados experimentos de permeação in vitro (n = 5 para a formulação e n=3 para o controle) com peles da região dorsal de orelhas de porcos, empregando célula de difusão vertical Franz modificada.

A pele de orelha de porco foi colocada na célula de difusão, com o lado da derme em contato com a solução receptora: tampão fosfato isotônico pH: 7,2 (0,1M). Cerca de 200 µL de soluções aquosas

dos compostos ou microemulsão, foram colocados sobre toda a área da pele, evitando-se a formação de bolhas entre a preparação e a pele. Os experimentos foram conduzidos a 37°C e a solução receptora foi constantemente agitada a 500 rpm por meio de um agitador magnético. Ao final de 12 horas de experimento as peles foram retiradas das células de difusão, cuidadosamente lavadas com água destilada para retirar o excesso de solução/formulação aplicada e as soluções receptoras foram coletadas e reservadas para quantificação.

Para os estudos de retenção, após a lavagem as peles foram então fixadas em uma superfície lisa com o EC voltado para cima, presas e cobertas, deixando exposta apenas a área de permeação. Foram aplicadas sucessivas fitas adesivas (10 fitas) até total remoção do estrato córneo, a qual foi indicado pelo brilho na face exposta da pele, ou seja, atingiu-se a epiderme viável (LOPEZ *et al.* 2001). As fitas foram unidas e colocadas em tubos de extração contendo 4,0 mL de MeOH agitadas em vortex por 2 minutos. Em seguida, foram deixadas por 30 minutos em banho ultra-som e filtradas em membranas poro 0,45 µm. A concentração do fotossensibilizador foi quantificada no filtrado por fluorimetria.

O tecido cutâneo restante (representado neste trabalho como EP+D) foi picotado, triturado e agitado em homogeneizador de tecidos (turrax) por 2,5 minutos com 4,0 mL de MeOH, seguido de 20 minutos em banho de ultrassom e por fim centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm e filtração em membrana (0,45 µm). A concentração do FS foi dosado

através de fluorimetria. A área de permeação das células de Franz utilizadas foi de 0,78 cm².

Os compostos foram estudados em soluções aquosas (pH=5), em propilenoglicol, polietilenoglicol carbowAX300, tampão fosfato pH=7 e incorporados na formulação apresentada anteriormente (em concentração aproximadamente 250 µg/mL).

Capítulo 3: Resultados e Discussão

3.1) Síntese da TMePyP

A metilação da TPyP foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada utilizando sílica como fase estacionária e eluente uma mistura de DCM e EtOH (95:5), uma vez que o produto tetracatiônico formado adere-se firmemente à sílica, devido à sua interação eletrostática com os grupos silanóis negativamente carregados.

A reação também foi acompanhada por espectroscopia de absorção na região UV-Vis. Como se pode observar na **Figura 18**, com o desenvolvimento da reação as máximos de absorção são deslocados para o vermelho. Uma vez que, segundo o modelo dos quatro orbitais a transição eletrônica envolve um deslocamento da densidade eletrônica do centro para a periferia do anel porfirínico (GOUTERMAN 1961) e, com a alquilação os átomos de nitrogênio dos grupos piridis, se tornam mais eletrofílicos, ocorre uma diminuição na diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO de forma que a banda Soret é deslocada para maiores comprimentos de onda.

Além disso, este deslocamento também é causado pelo aumento na polaridade da molécula, aumentando também a interação da mesma com o solvente. Esta interação com o solvente afeta os estados eletrônicos da porfirina sendo que grandes perturbações podem ser causadas por interações de Van der Waals, que incluem forças de dispersão de London, dipolo-dipolo e dipolo induzido-dipolo induzido (ROHATGI-MUKHERJEE 1992).

Figura 18: Espectros UV-Vis de acompanhamento da reação de metilação.

3.2) Inserção de zinco na TPyP

A metalação da TPyP foi caracterizada através de espectroscopia na região UV-Vis (**Figura 19**) (Goddard III *et al.* 1994, van Gisbergen *et al.* 2002). A TPyP base livre apresenta uma banda no ultravioleta, em 413 nm (banda Soret), com um elevado coeficiente de extinção molar ($\sim 10^5$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) e quatro bandas no visível em 512, 544, 587 e 643 nm, (bandas Q), que apresentam coeficientes de extinção menores ($\epsilon \sim 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹). Por outro lado, a ZnTPyP apresenta um espectro típico de metaloporfirina no qual se observa a banda Soret (422 nm) e apenas 2 bandas Q, menos intensas (588, 598 nm).

Figura 19: Espectro de absorção na região UV-Vis da TPyP e da ZnTPyP em metanol.

A diferença observada nos espectros da porfirina base livre e metalada foi interpretada por Gouterman (GOUTERMAN 1959, 1961, 1963 e 1978). Segundo ele, a redução de simetria de D_{4h} da metaloporfirina para D_{2h} na porfirina base livre faz com que os dipolos nas direções x e y no plano da molécula não sejam mais equivalentes (Figura 20), de modo que os estados excitados deixam de ser degenerados como no caso da metaloporfirina desdobrando a transição $a_{2u} \rightarrow e_g$ em duas transições. Uma vez que as duas bandas Q da metaloporfirina ocorrem devido a diferentes estados vibracionais do estado excitado numa mesma transição, o desdobramento desta transição em duas, explica o aparecimento de quatro bandas Q nas porfirinas base-livre.

Figura 20: Esqueleto porfirínico básico.

As metaloporfirinas de zinco estão incluídas na classe das metaloporfirinas de espectro regular uma vez que os espectros de absorção na região UV-Vis são determinados essencialmente pelos elétrons do anel porfirínico (transições $\pi \rightarrow \pi^*$), com o mínimo de perturbação causada pelos elétrons do centro metálico nos elétrons do anel (GOUTERMAN 1978).

3.3) Metilação da ZnTPyP

A metilação da ZnTPyP também foi seguida por espectroscopia de absorção na região UV-Vis. Na **Figura 21** estão apresentados os espectros da porfirina de partida e da porfirina metilada. Podemos observar que tanto a ZnTPyP quanto a ZnTMePyP apresentam espectro eletrônico característico de metaloporfirinas, no qual se observa uma banda intensa na região ultravioleta (422 e 440 nm, respectivamente) e apenas 2 bandas Q, menos intensas (556 e 607; 565, 607 nm, respectivamente). Além disso, é possível

notar o deslocamento para maiores comprimentos de onda da banda Soret após a metilação (de 422 para 440 nm), assim como discutido no item 3.1, devido ao efeito da alquilação sobre o deslocamento dos elétrons do centro para a periferia do anel porfirínico e devido ao efeito solvatocrômico.

Figura 21: Espectro de absorção na região UV-Vis da ZnTPyP e da ZnTMePyP em metanol.

Conforme apresentado e discutido no item 3.2 para as porfirinas não metiladas, podemos comparar os espectros de absorção da TMePyP e da ZnTMePyP (**Figura 22**). Observa-se mais uma vez o efeito da metalação, diminuindo o número de bandas Qs em relação à base-livre e deslocando o comprimento de onda da banda Soret para o vermelho.

Figura 22: Espectros de absorção na região UV-Vis das porfirinas TMePyP e ZnTMePyP.

3.4) Síntese da TC8PyP

A reação foi acompanhada por espectroscopia na região UV-Vis (**Figura 23**). Pode-se observar o deslocamento da banda Soret para maiores comprimentos de onda conforme ocorre a alquilação dos nitrogênios piridínicos, conforme discutido anteriormente.

Figura 23: Espectros UV-Vis de acompanhamento da reação de alquilação com brometo de n-octila em metanol.

A estrutura molecular do produto de síntese foi estudada por espectrometria de massas. No experimento ESI-MS da TC8PyP, apresentado na **Figura 24**, observa-se o sinal em $m/z=267,8$ atribuído à porfirina tetraalquilada. A diferença de massas de 0.25 para a razão isotópica deste sinal indica que o composto tem carga +4. Foi observada contaminação do composto de interesse com o análogo trialquilado ($m/z=319,5$). Além disso, é possível observar sinais em $m/z=356,7$ e $m/z=535,6$ atribuídos à perda de um e dois prótons internos, respectivamente, da porfirina tetraalquilada, resultando no composto com carga +3 e +2. Devido à alquilação esses prótons se tornam ácidos e são liberados com facilidade. Essas perdas de prótons ocorrem para estabilizar a alta densidade de carga positiva. Estes resultados comprovam a obtenção da porfirina de interesse.

Figura 24: Espectro ESI-MS da TC8PyP.

A verificação da pureza de porfirinas é usualmente realizada através de ressonância magnética nuclear de prótons e análise elementar. Neste caso, análise elementar pode não ser muito efetiva uma vez que essas porfirinas catiônicas geralmente retêm quantidades significativas de solvente quando precipitam e a análise por RMN também pode ser complicada pela tendência dessas porfirinas catiônicas agregarem em solução (DIXON *et al.* 1998). Análise elementar desta porfirina evidenciou contaminação com éter etílico (usado na precipitação da porfirina): TC8PyP. 2 C₂H₆O, Calculado (%) C, 61.54; H, 7.20; N, 7.55; Obtido: (%) C, 61.73; H, 7.60; N, 8.01.

3.5) Inserção de zinco na TC8PyP

Pode-se notar, através dos espectros apresentados na Figura 25, que a inserção de zinco também foi eficiente na TC8PyP, uma vez que os espectros da porfirimina base-livre e metalada são característicos de cada classe destes compostos.

Figura 25: Espectros na região UV-Vis da porfirimina base livre e respectiva zinco porfirimina em metanol.

A TC8PyP base livre apresenta uma banda no ultravioleta, em 426 nm (banda Soret), com um elevado coeficiente de extinção molar ($\sim 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e quatro bandas no visível em 517, 551, 592 e 645 nm, (bandas Q), que apresentam coeficientes de extinção menores ($\epsilon \sim 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Por outro lado, a ZnTC8PyP apresenta um espectro típico de metaloporfirimina, no qual se observa a banda Soret intensa (441 nm) e

apenas 2 bandas Q, menos intensas (565, 607 nm). Essas diferenças espectrais entre a porfirina base-livre e o complexo de zinco já foram anteriormente discutidas.

A análise elementar da ZnTC8PyP comprovou a pureza do composto obtido: ZnTC8PyP.2H₂O, Calculado(%) C, 58,02; H, 6,49; N, 7,52; Encontrado (%) C, 58,15; H, 6,69; N, 7,35.

3.6) Síntese da TC14PyP

A reação foi acompanhada por espectroscopia na região UV-vis. Assim como observado nas demais reações de alquilação, nota-se o deslocamento da banda Soret para maiores comprimentos de onda no decorrer da reação, devido ao efeito solvatocrômico (Figura 26).

Figura 26: Espectros UV-Vis para acompanhamento da reação.

Realizou-se a caracterização através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV). Foram apresentados os espectros da TPyP e da TC14PyP de forma a comparar os picos apresentados.

Os espectros apresentados na Figura 27 e na Figura 28 têm em comum os picos na de 1400-1750 cm^{-1} , característicos da deformação axial das ligações C=C do anel porfirínico e da deformação axial das ligações C-C e C-N dos grupos piridis (COLE 1997). Além disso, o estiramento angular da ligação N-H no plano do anel porfirínico apresenta-se na região 960-990 cm^{-1} , (ADLER *et al.* 1973) em 971,5 cm^{-1} para a TPyP e em 969,5 cm^{-1} para a TC14PyP, com fraca intensidade. Observa-se a deformação axial da ligação N-H na região de 3220-3500 cm^{-1} , como uma banda larga de alta intensidade em 3446 cm^{-1} para a TPyP e em 3447 cm^{-1} para a TC14PyP (COLE 1997).

Figura 27: Espectro de absorção na região IV da TPyP.

Figura 28: Espectro de absorção na região IV da TC₁₄PyP.

A principal diferença que pode ser notada é a presença de alguns picos na região de 2800-3000 cm^{-1} , no espectro da porfirina alquilada, característicos da absorção proveniente da deformação axial da ligação C-H nos alcanos. Observa-se a deformação axial assimétrica dos grupamentos metilenos que ocorre na região de 2926 cm^{-1} que, neste caso pode ser observada em 2918 cm^{-1} e, a deformação axial simétrica, que ocorre na região de 2853 cm^{-1} , observada em 2849 cm^{-1} . Além disso, observa-se uma banda em 718 cm^{-1} , proveniente da vibração de deformação angular assimétrica no plano, na qual todos os grupos metileno deformam-se em fase, que aparece a cerca de 720 cm^{-1} em parafinas de cadeia linear de sete ou mais átomos de carbono (COLE 1997).

A caracterização estrutural da porfirina sintetizada foi realizada através de espectrometria de massa de ionização por eletrospray. Para realização

dos experimentos utilizou-se a amostra solubilizada em uma mistura de água e metanol (1:1).

Figura 29: Espectro ESI-MS da TC14PyP.

Observa-se na Figura 29 o experimento ESI-MS da TC₁₄PyP, no qual o sinal em $m/z = 352,1$ foi atribuído à porfirina tetraalquilada. A diferença de massas de 0,25 para a razão isotópica deste sinal indica que o composto tem carga +4. É possível observar um sinal em $m/z = 404$, atribuído a uma pequena contaminação do composto de interesse com seu análogo trialquilado.

Além disso, observa-se sinais de $m/z = 468,8$ e $m/z = 703,2$, atribuídos à perda de um e dois prótons internos, respectivamente, da porfirina tetraalquilada, resultando no composto com carga +3 e +2. Devido à

alquilação esses prótons se tornam ácidos e são liberados com facilidade. Essas perdas de prótons ocorrem para estabilizar a alta densidade de carga positiva.

Foi feita a caracterização da TC14PyP através de análise elementar, obtendo-se: Calculado(%) C, 66,73; H, 8,28; N, 6,49; Encontrado(%) C, 67,01; H 8,89; N 6,49.

3.7) Inserção de zinco na TC14PyP

Observa-se através dos espectros apresentados na Figura 30, que a inserção de zinco na TC14PyP foi eficiente, uma vez que tanto o espectro da porfirina base-livre quanto o da metalada são característicos de cada classe destes compostos.

Figura 30: Espectros na região UV-Vis da porfirina base livre e respectiva zinco porfirina (metanol).

As diferenças espectrais apresentadas já foram anteriormente discutidas. A TC14PyP base livre apresenta a banda em 426 nm (banda Soret), com um elevado coeficiente de extinção molar ($\sim 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e quatro bandas no visível em 516, 552, 592 e 648 nm, (bandas Q), que apresentam coeficientes de extinção menores ($\epsilon \sim 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Por outro lado, a ZnTC14PyP apresenta um espectro típico de metaloporfirina, no qual se observa a banda Soret intensa em 441 nm e apenas 2 bandas Q, menos intensas (566, 610 nm).

3.8) Espectroscopia eletrônica de absorção e coeficientes de absortividade molar

Foram obtidos os espectros de absorção de cada uma das porfirinas em soluções de metanol, bem como, os coeficientes de absortividade molar de cada uma das bandas. Conforme apresentado na Tabela 3.

As porfirinas base-livre apresentam espectro típico desta classe de compostos com a banda Soret mais intensa e quatro bandas Q menos intensas (GOUTERMAN 1961, GOUTERMAN *et al.* 1963). O espectro das porfirinas anfifílicas (TC8PyP e TC14PyP) são similares ao da TMePyP de menor massa molecular, indicando que o aumento no tamanho da cadeia alquílica não afeta o espectro de absorção das porfirinas (HE *et al.* 1998, 1999). Da mesma forma as zincoporfirinas apresentam espectro típico de metaloporfirinas de espectro regular apresentando a banda Soret mais intensa e duas bandas Q menos intensas (ELANGO VAN E KRISHNAN 1992).

Tabela 3: Valores de coeficientes de absorvidade molar nos máximos de absorção de cada uma das porfirinas anfífilas em metanol.

Porfirina	Absorção λ / nm ($\epsilon - \text{L.mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)				
	Banda Soret	Bandas Q			
TMePyP	424 (1,90 10 ⁵)	516 (1,42 10 ⁴)	554 (5,04 10 ³)	592 (4,90 10 ³)	648 (1,24 10 ³)
ZnTMePyP	440 (1,17 10 ⁵)		565 (1,02 10 ⁴)		607 (3,11 10 ³)
TC8PyP	426 (1,78 10 ⁵)	516 (1,33 10 ⁴)	555 (5,41 10 ³)	592 (4,78 10 ³)	648 (1,38 10 ³)
ZnTC8PyP	442 (2,86 10 ⁵)		566 (2,46 10 ⁴)		610 (7,36 10 ³)
TC14PyP	426 (2,10 10 ⁵)	516 (1,48 10 ⁴)	552 (6,20 10 ³)	592 (5,47 10 ³)	648 (1,20 10 ³)

Foram obtidos os valores de coeficiente de absorvidade molar de cada um dos compostos através da construção do gráfico de absorbância versus concentração, cujo valor do coeficiente angular é igual ao coeficiente de absorvidade molar do composto analisado. Obteve-se uma boa relação de linearidade dos pontos ($r^2 \geq 0,999$), indicando que nestas condições e nesta faixa de concentração não se observa agregação dos compostos.

3.9) Espectroscopia eletrônica de emissão e determinação do rendimento quântico fluorescência (Φ_f)

Os espectros de emissão das porfirinas base-livre apresentam dois máximos um em 650 e o outro em 715 nm (Figura 31), enquanto as

zincoporfirinas apresentam os máximos deslocados para o azul quando comparados às respectivas porfirinas base-livre, como observado anteriormente para porfirinas anfífilas similares (Tabela 4) (ELANGO VAN; KRISHNAN 1992, HE *et al.* 1998, 1999).

Figura 31: Espectros de emissão da TC14PyP (acima), da ZnTC8PyP (centro) e do azul de metileno (abaixo) com a área utilizada para integração hachurada.

Tabela 4: Máximos de emissão de fluorescência.

PORFIRINA	Emissão λ / nm	
	Q (0,0)	Q (1,0)
TMePyP	654	715
ZnTMePyP	635	700
TC8PyP	656	716
ZnTC8PyP	635	663
TC14PyP	655	717

Excitação 515 nm, filtro de emissão > 606,
fendas: 10 nm na excitação e 1 nm na emissão.

O cálculo do rendimento quântico de fluorescência foi realizado utilizando o valor resultante da integração dos espectros de emissão (Figura 31) do padrão escolhido (azul de metileno, $A_p=1,13 \times 10^6$), e de cada uma das porfirinas (A_a), como a TC14PyP ($A_a= 2,76 \times 10^6$), bem como as absorbâncias das amostras ($Abs_a = 0,0803$ para a TC14PyP) e do padrão ($Abs_p = 0,0118$) em 532 nm, utilizando o valor de ϕ_{fl} do padrão (0,030) obtido na literatura, (OLMSTED 1979) conforme a equação: (DEMAS e CROSBY 1971; EATON 1988)

$$\phi_{fl} = \frac{Abs_p A_a n_a^2}{Abs_a A_p n_p^2} \phi_p$$

Os valores de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{fl}) obtidos estão apresentados na Tabela 5. Todos os compostos apresentam baixo ϕ_{fl} com valores predominantemente abaixo de 0,02. Comprova-se assim que o decaimento radiativo do primeiro estado singlete excitado tem menor importância dentre os processos de relaxação competitivos e os processos não radiativos (conversão interna e cruzamento intersistemas) apresentam

um papel importante no decaimento do primeiro estado excitado singlete. Estes resultados são consistentes com aqueles obtidos para porfirinas de estrutura similar (SHEN *et al.* 1999), inclusive a TMePyP (NEUMANN-SPALLART; KALYANASUNDARA 1982).

Tabela 5: Rendimentos quânticos de fluorescência.

PORFIRINA	Φ_f^a
TMePyP	0,014
ZnTMePyP	0,012
TC8PyP	0,015
ZnTC8PyP	0,020
TC14PyP	0,011

^aExcitação 515 nm, filtro de emissão > 606, fendas: 10 nm na excitação e 1 nm na emissão.

Observa-se que a inserção de zinco, em alguns casos aumenta o rendimento quântico de fluorescência no caso da TC8PyP (0,015 para a base-livre e 0,020 para a ZnTC8PyP) e reduz, no caso da TMePyP (0,014 e 0,012 para a ZnTMePyP). Relatos da literatura mostram que o efeito causado pela inserção do zinco depende da porfirina estudada. Por um lado, Quimby e Longo (QUIMBY E LONGO 1975) e por Durantini (DURANTINI *et al.* 2001) mostraram que a inserção de zinco em tetraarilporfirinas halogenadas e na mesotetrakis(4-metoxifenil)porfirina resulta em menores rendimentos quânticos de fluorescência. Por outro lado, Mosinger e Kubat, (KÚBAT e MOSINGER 1996) relatam que a inserção de metais de configuração eletrônica d^0 e d^{10} na mesotetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina resulta maiores rendimentos quânticos de fluorescência.

3.10) Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete

O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ($\Phi\Delta$), que foi quantificado pelo método direto, é parâmetro crucial para avaliar a eficiência de um fotossensibilizador (KOCHEVAR *et al.* 2000).

Figura 32: Espectro de emissão do oxigênio singlete produzido pela TMePyP em solução de metanol e absorvância 0,10 em 532 nm.

O cálculo do $\Phi\Delta$ foi realizado utilizando a área sob o espectro de emissão do oxigênio singlete (1200 a 1350 nm – Figura 32) produzido pelo padrão (I_P) e pelas amostras de porfirimina em diferentes concentrações (I_A) bem como as absorvâncias em 532 nm do padrão (A_P) e das amostras (A_A), conforme a equação: (COSA e SCAIANO 2004; TANELIAN e HEINRICH 1995)

$$\phi_A = \frac{I_A A_P}{I_P A_A} \phi_P$$

Por exemplo, para a TMePyP com absorvância 0,145 em 532 nm (A_A), a integral sob a curva de emissão (I_A) é de 34443, e o padrão (meso-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirimina) de absorvância 0,143 apresenta integral sob a curva

(I_F) de 32558 e o valor de $\Phi\Delta$ do padrão, obtido na literatura é de 0,69 (REDMOND e GAMLIN 1999).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6. Observa-se que os valores de ϕ_Δ variam de 0,74 a 0,78 indicando que todos os compostos testados são eficientes geradores de oxigênio singlete. O valor de $\Phi\Delta$ obtido para a TMePyP ($0,78 \pm 0,07$) corrobora com o valor encontrado na literatura ($\Phi\Delta = 0,74$) para esta molécula em meio aquoso, pH=7 (WILKINSON, HELMAN e ROSS 1993).

Tabela 6: Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete das porfirinas sintetizadas.

Porfiringa	$\Phi\Delta^a$
TMePyP	$0,78 \pm 0,07$
ZnTMePyP	$0,78 \pm 0,05$
TC8PyP	$0,74 \pm 0,06$
ZnTC8PyP	$0,76 \pm 0,07$
TC14PyP	$0,77 \pm 0,06$

^a Excitação 532 nm Laser Nd:YAG, 5 ns, 10 Hz.

O fato de estas porfirinas apresentarem valores próximos de rendimentos quânticos de produção de oxigênio singlete indica que o aumento no tamanho da cadeia alquílica não afeta significativamente as propriedades fotofísicas (REDDI *et al.* 2002). Conseqüentemente, através do estudo desta série de porfirinas é possível avaliar outros parâmetros

relacionados à estrutura química e que podem ser relevantes para a eficiência fotodinâmica.

3.11) Incorporação das porfirinas em lipossomas

Preparou-se lipossomos multilamelares com uma proporção DOPC:PG (70:30), para que houvesse uma fração de lipídeos carregados negativamente com o intuito de imitar a carga negativa das membranas biológicas em especial da mitocôndria consequentemente a incorporação das porfirinas deve ser resultado de interações eletrostáticas (entre as cargas positivas das porfirinas e carga negativa do PG) e de interações hidrofóbicas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 33.

Observa-se que a eficiência de incorporação aumenta com o aumento na cadeia alquílica substituinte de um para oito átomos de carbono. Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Ricchelli (RICCHELLI *et al.* 2005) utilizando porfirinas com estruturas análogas, que indicam que o processo de incorporação é fortemente influenciado pelo tamanho das cadeias periféricas.

Figura 33: Incorporação em vesículas (DOPC/PG - 70/30), pH = 7,2; porfirinas $\sim 3 \mu\text{molL}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$.

As interações dos fotossensibilizadores com as membranas podem ocorrer por vários tipos de forças: eletrostática, hidrofóbica, hidratação e coordenação, etc. (BRONSHTEIN *et al.* 2006, ENGELMAN *et al.* 2007, GABRIELLI *et al.* 2004, RICCHELLI *et al.* 2005, SEVERINO *et al.* 2003, ZIMMERMANN; CERNAY 1996). As vesículas sintéticas utilizadas neste trabalho são compostas de certa fração de lipídeos negativamente carregados e, desta forma, a interação inicial entre as porfirinas carregadas positivamente e as membranas ocorre por atração eletrostática, que é supostamente a mesma para todas as porfirinas para um tipo específico de membrana, uma vez que os compostos são igualmente carregados.

O efeito hidrofóbico, que depende da interação hidrofóbica entre porfirinas e membranas, tem início nas vizinhanças da membrana. O aumento na incorporação com o aumento do tamanho da cadeia alquílica pode ser explicado por este efeito, de maneira que os compostos mais

hidrofóbicos (TC8PyP e ZnTC8PyP) apresentam uma maior inclusão nas membranas que seus análogos mais hidrofílicos (TMePyP e ZnTMePyP) o que resultaria em maior eficiência fotodinâmica (BRONSHTEN *et al.* 2006, ENGELMANN *et al.* 2007).

Nota-se também que as zincoporfirinas apresentam maior incorporação que suas respectivas bases-livres (Figura 33). Esta tendência é inesperada, uma vez que sabe-se que a inserção de zinco aumenta a hidrofobicidade de porfirinas (HIROHARA *et al.* 2004). Entretanto, a interação das zincoporfirinas com membranas fosfolipídicas pode ser determinada também pela coordenação metal-fosfato (PASHKOVSKAYA *et al.* 2007). A idéia do envolvimento dos grupos fosfato dos fosfolipídeos na incorporação em membranas das zincoporfirinas é fortalecida pelo fato da formação de compostos de coordenação entre os grupos fosfato do grupo fosfodiéster dos lipídeos ser essencial na ligação de cátions às membranas lipídicas (LAU; MCLAUGHLIN; MCLAUGHLIN 1982; BINDER *et al.* 2001).

3.12) Incorporação das porfirinas em células HeLa

Assim como observado para as vesículas mistas, a incorporação dos FSs em células mostrou influência direta do tamanho da cadeia alquílica e presença de zinco.

Figura 34: Incorporação em células HeLa; porfirinas $\sim 15 \mu\text{molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM.

A incorporação em células é parecida no caso das porfirinas mais hidrofílicas (TMePyP e ZnTMePyP). O efeito do zinco não pode ser observado neste caso, possivelmente pelo fato destas moléculas se localizarem mais superficialmente nas membranas (ENGELMANN *et al.* 2007)

O aumento na incorporação com o aumento da cadeia alquílica pode ser explicado pelo efeito hidrofóbico, de maneira que os compostos mais hidrofóbicos (TC8PyP e ZnTC8PyP) apresentam uma maior inclusão nas membranas que seus análogos mais hidrofílicos (TMePyP e ZnTMePyP) o que resultaria em maior eficiência fotodinâmica (BRONSHTAIN *et al.* 2006, ENGELMANN *et al.* 2007). Na incorporação em Hela não há diferença significativa entre a incorporação da TMePyP e a ZnTMePyP (teste estatístico ANOVA $p < 0,05$). Entretanto, no caso das porfirinas alquiladas a inserção de

zinco resultou em um aumento na incorporação em células HeLa, assim como observado para os lipossomos (Figura 33) devido à coordenação metal fosfato.

Os resultados, utilizando lipossomos como sistema modelo e o estudo em células, mostram uma mesma tendência na incorporação, sugerindo que a incorporação destes compostos em células HeLa não ocorre por interação com sítios específicos, e sim são decorrentes de interações não específicas, exclusivamente pela partição do fotossensibilizador entre o meio e a bicamada lipídica.

3.13) Incorporação das porfirinas em mitocôndrias isoladas

Mitocôndrias têm duas membranas: a membrana externa que permite a passagem de moléculas maiores como pequenas proteínas e, a membrana interna, que tem maior percentagem de proteínas (mais de 50%) e é altamente impermeável a espécies carregadas. A membrana mitocondrial interna é responsável por manter o potencial eletroquímico de membrana por volta de -180 mV em mitocôndrias energizadas. Conseqüentemente, a ligação em mitocôndrias tem um componente eletrostático maior quando comparada à ligação em outras membranas (GABRIELLI *et al.* 2004). Observa-se uma maior incorporação das porfirinas polares em mitocôndrias (TMePyP e ZnTMePyP) em relação aos outros sistemas de membrana investigados, compatível com o maior caráter eletrostático desta interação.

Figura 35: Incorporação em mitocôndrias isoladas pH=7.4; mitocôndria 2.0 mg.mL⁻¹ e porfirinas ~ 5 µmolL⁻¹.

Observa-se na Figura 35 que a incorporação em mitocôndrias isoladas também é influenciada pelo tamanho da cadeia alquílica. O aumento da cadeia de um para oito átomos de carbono resulta em maior incorporação tanto das porfirinas base livre quanto das zincoporfirinas. Este aumento pode ser explicado pelo aumento no efeito hidrofóbico. Interessantemente, a inserção de zinco parece desfavorecer a incorporação em mitocôndrias (compare TMePyP com ZnTMePyP e TC8PyP com ZnTC8PyP) o que indica que a coordenação zinco-fosfato não tem um papel importante na ligação das porfirinas às mitocôndrias, uma vez que a membrana mitocondrial interna é constituída de 50% de proteínas, em contraste com a membrana celular que é constituída quase em sua totalidade de fosfolípidos.

Portanto, a incorporação em mitocôndrias é afetada basicamente pelo efeito hidrofóbico e o componente eletrostático. Como a presença do

zinco aumenta o caráter hidrofílico destas porfirinas e diminui a interação hidrofóbica das mesmas com membranas (HIROHARA *et al.* 2004), a incorporação é reduzida.

Para avaliar se o mecanismo da incorporação é modulado por efeitos de carga, foram realizados experimentos de incorporação após o colapso do potencial de membrana mitocondrial através do uso de um desacoplador, o CCCP.

Quando o CCCP é adicionado, observa-se a redução na incorporação das porfirinas em mitocôndrias sugerindo que a incorporação é estimulada pelo potencial de membrana mitocondrial. A influência do potencial de membrana mitocondrial na incorporação das porfirinas é maior nas mais hidrofílicas (TMePyP 26% - ZnTMePyP 54%) que nas de cadeia longa (TC8PyP 6% - ZnTC8PyP 17%) e mais pronunciado nas zinco porfirinas (17 e 24%) que nas base-livre (6 e 54%).

3.14) Toxicidade e Fototoxicidade em células HeLa

Esses experimentos mostram o quanto cada uma das porfirinas é tóxica no escuro e serve de controle para os experimentos de fototoxicidade apresentados posteriormente.

Observa-se na Figura 36 que o aumento da concentração de TMePyP até 30 μmolL^{-1} não provoca alteração significativa na porcentagem de células vivas, de maneira que nestas concentrações pode-se afirmar que este fotossensibilizador não apresenta toxicidade no escuro.

Figura 36: Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de TMePyP após 3 horas de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as médias são significativamente iguais ao controle segundo o teste estatístico ANOVA ($P < 0,05$).

Observa-se na Figura 37 que o aumento da concentração de ZnTMePyP até $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ não provoca alteração significativa na porcentagem de células vivas. Apesar da porcentagem de células vivas na concentração de $29,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ser significativamente diferente do controle no nível de significância 0,05, uma porcentagem de 94,3% pode ainda ser considerada como não tóxica no escuro.

Figura 37: Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de ZnTMePyP após 3 horas de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. * Média significativamente diferente do controle segundo o teste estatístico ANOVA ($P < 0,05$).

O aumento da concentração de TC8PyP até $29,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ não provoca aumento na porcentagem de morte celular (Figura 38Figura 38:), bem como o aumento da concentração de seu análogo metalado com zinco (ZnTC8PyP) até $30,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 39).

Em resumo pode-se dizer que os experimentos de toxicidade no escuro mostraram que todas estas porfirinas não apresentam toxicidade no escuro em concentrações entre $2,5$ e $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 38: Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de TC8PyP após 3 horas de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as médias são significativamente iguais ao controle segundo o teste estatístico ANOVA ($P < 0,05$).

Figura 39: Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de ZnTC8PyP após 3 horas de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as médias são significativamente iguais ao controle segundo o teste estatístico ANOVA ($P < 0,05$).

Também foram realizados os experimentos de fototoxicidade celular das porfirinas. As células foram incubadas com soluções das porfirinas de aproximadamente $15 \mu\text{molL}^{-1}$, exceto a ZnTC8PyP ($5,8 \mu\text{molL}^{-1}$) e posteriormente irradiadas com laser contínuo apropriado (Laser line INOVA 300 mW, 650 nm para as base-livre ou o Laser Morgotron 20 mW, 532 nm para as zincoporfirinas(ambos na dose final de 0.175 J cm^{-2}).

Figura 40: Fototoxicidade em células HeLa. TMePyP – $13,1 \mu\text{molL}^{-1}$; ZnTMePyP $14,3 \mu\text{molL}^{-1}$; TC8PyP $18,9 \mu\text{molL}^{-1}$; ZnTC8PyP $5,8 \mu\text{molL}^{-1}$. Dose 175 mJcm^{-2} , porfirinas base-livre irradiadas em 650 nm e zincoporfirinas em 532 nm.

Observa-se que o aumento na fototoxicidade (Figura 40) é paralelo ao aumento na incorporação em células (Figura 34), isto é, $\text{ZnTC8PyP} > \text{TC8PyP} > \text{ZnTMePyP} > \text{TMePyP}$. Esta relação direta entre incorporação e fototoxicidade é esperada uma vez que estes compostos apresentam praticamente o mesmo rendimento quântico de produção de oxigênio singlete. A tendência de maior toxicidade em função de maior

concentração intracelular do FS foi anteriormente verificada também para derivados da bacterioclorina *p* cicloimida (SHARONOV *et al.* 2006) e para porfirinas e clorinas glicosiladas (Di STASIO *et al.* 2005).

Dados da literatura indicam que as zincoporfirinas apresentam melhor eficiência em TFD quando comparadas às base-livre (AL-MUTAIRI *et al.* 2006). Este efeito foi reproduzido e foi possível mostrar que ele ocorre devido à favorável interação com membranas que causam maior incorporação em células. Apesar da presença de zinco facilitar a ligação das porfirinas em membranas, os resultados da Figura 35 sugerem que também diminui a interação com mitocôndrias.

Desta forma, pode-se dizer que a acumulação em mitocôndrias apresenta menor importância para a eficiência fotodinâmica final que a incorporação total em células. Entretanto, para chegar a esta conclusão é importante avaliar se o zinco afeta o a incorporação dos FS em mitocôndrias em células intactas.

3.15) Sublocalização celular

Foi avaliada a distribuição da fluorescência das porfirinas e comparada com a distribuição da fluorescência da rodamina 123, que é conhecida por ser um marcador mitocondrial (RICHELLI *et.al* 2005; PANZARINI *et al.* 2006).

Figura 41: Imagens de microscopia confocal: (I): Localização intracelular das porfirinas $10 \mu\text{molL}^{-1}$ em meio de cultura DMEM (fluorescência vermelha, A- TMePyP; B- ZnTMePyP; C - TC8PyP; D- ZnTC8PyP) após 3 horas de incubação à 37°C . (II): Rodamina 123 (fluorescência verde); (III): Sobreposição das imagens de localização da porfirina e rodamina 123.

Observa-se na Figura 41 o padrão de fluorescência apresentado nas micrografias confocais de células HeLa marcadas com porfirinas (coluna I) e rodamina 123 (coluna II). A fluorescência vermelha das porfirinas está distribuída por todo o citoplasma, mas permanece fora do núcleo (coluna I). A marcação das mitocôndrias pode ser observada pelos pontos de fluorescência verde devido à rodamina 123 (coluna II) que é um conhecido marcador desta organela. É possível observar colocalização entre a fluorescência verde (rodamina) e vermelha (porfirinas) devido à presença da coloração amarela proveniente da sobreposição de duas imagens de

fluorescência (coluna III). A presença dos pontos amarelos é mais evidente nas células tratadas com porfirinas base-livre que aquelas tratadas com zincoporfirinas.

A área de colocalização foi calculada (Tabela 7) e mostra a maior acumulação em mitocôndrias das porfirinas base-livre o que é compatível com os resultados obtidos para mitocôndrias isoladas (Figura 35). Portanto, mudando a cadeia hidrocarbônica de um para oito átomos de carbono observa-se um aumento na acumulação em mitocôndrias para as porfirinas base-livre. Por outro lado, a inserção de zinco leva à diminuição da acumulação.

Tabela 7: Porcentagem de colocalização entre as porfirinas e Rodamina 123.

Porfirina	Colocalização (%)
TMePyP	26,7
ZnTMePyP	17,5
TC8PyP	42,8
ZnTC8PyP	11,4

ZnTC8PyP apresenta a menor incorporação em mitocôndrias e maior incorporação em células, indicando que esta molécula se acumula em maior extensão nas bicamadas lipídicas ao invés de concentrar-se somente em mitocôndrias. Acredita-se que este comportamento se dá devido à coordenação zinco-fosfato. O fato do fotossensibilizador mais eficiente ser o que menos se acumula em mitocôndrias sugere que a ligação em mitocôndrias é um fator de menor importância para a eficiência

fotodinâmica total quando comparado à incorporação total do fotossensibilizador.

Desta forma, como as porfirinas base-livre localizam-se em mitocôndrias e as respectivas zincoporfirinas distribuem-se em bicamadas lipídicas pode-se sugerir que as porfirinas base-livre induzem a morte celular através de um mecanismo apoptótico enquanto as zincoporfirinas causariam a morte celular através de um mecanismo necrótico. Portanto, para verificar a veracidade desta suposição foram realizados experimentos para quantificar a formação de núcleos sub-diplóides.

3.16) Quantificação de núcleos sub-diplóides

Após as células passarem pelos mesmos protocolos utilizados nos experimentos de toxicidade no escuro e fototoxicidade as mesmas foram fixadas em álcool etílico e marcadas com iodeto de propídeo. Foram feitas leituras no citômetro de fluxo e os dados tratados no software WinMDI 2.8. Foram obtidos histogramas como os apresentados na Figura 42. Duas regiões foram demarcadas nos histogramas sendo M1 a região contendo fragmentação de DNA e a M2 região contendo os picos característicos das fases celulares (M, G1, S e G2): O pico da esquerda corresponde às células na fase G1, o segundo corresponde às células nas fases G2+M e a região entre os picos corresponde às células na fase S. A fragmentação de DNA (observada nos histogramas como a região M1) é uma das características do processo de morte celular por apoptose (DARZYNKIEWICZ *et al.* 1992; VERMES, HAANEN E REUTELINGSPERGER 2000).

Figura 42: Histogramas de citometria de fluxo de células HeLa tratadas com as porfirinas no escuro (coluna da esquerda) e após a irradiação (coluna da direita) obtidos 48 horas após o tratamento.

De maneira a facilitar a comparação, as porcentagens de M1 dos histogramas das células do grupo controle, tratadas com as porfirinas no escuro ou irradiadas foram apresentadas em forma de gráfico (Figura 43).

Figura 43: Porcentagem de núcleos subdiploides (M1) em células HeLa (controle e tratadas com porfirinas, no escuro ou irradiadas).

Observa-se que nas amostras controle (tanto no escuro quanto irradiadas) existe aproximadamente 15% de núcleos sub G1 (M1) mostrando que apenas a irradiação das células sem a presença de um fotossensibilizador lesiona de maneira pouco intensa as células. A presença dos fotossensibilizadores (sem irradiação) também causa um aumento da porcentagem de fragmentação de DNA em relação ao controle.

Os tratamentos das células com as porfirinas seguidos de irradiação levaram, em todos os casos, a um grande aumento na fragmentação de DNA. Observa-se que as porfirinas alquiladas (TC8PyP e ZnTC8PyP) são mais efetivas em promover a formação de núcleos sub-diploides que as porfirinas metiladas (TMePyP e ZnTMePyP). Este efeito tem relação com a maior eficiência de morte celular e sugerem que uma parcela desta ocorre por um mecanismo apoptótico.

Observa-se uma tendência das zincoporfirinas induzirem de maneira menos efetiva a formação dos núcleos sub-diplóides que suas respectivas base-livre, mas segundo o teste estatístico ANOVA ($p < 0,05$) os resultados não são significativamente diferentes, de forma que dentro do desvio do experimento as porfirinas e seus respectivos zinco complexos apresentaram praticamente a mesma porcentagem de núcleos sub-G1. Essa possível diferença na indução de núcleos sub-diplóides pode estar diretamente ligada à diferente localização das porfirinas base-livre e os complexos de zinco. Nas células, as zincoporfirinas ligam-se mais eficientemente em diversos tipos de membranas podendo favorecer a morte por necrose após a fotossensibilização.

3.17) Isotermas de Langmuir e Filmes Langmuir-Blodgett

Diante dos resultados obtidos que mostram que a presença de zinco no centro do anel porfirínico leva à maior incorporação destes FSs em membranas através da suposta coordenação zinco-fosfato além de influenciar na distribuição dos mesmos em células, tornou-se necessário avaliar as interações das porfirinas com fosfolípidos e verificar a existência desta coordenação.

Para isto, decidiu-se estudar a interação da porfirina TC14PyP e seu complexo de zinco com lípidos de diferentes estruturas químicas (Figura 44): dois deles negativamente carregados, DMPA e DMPG, este último apresentando dois grupos hidroxila terminal e um zwitteriônico, DMPC, todos contendo cadeia carbônica de 14 átomos de carbono) por meio de

monocamadas de Langmuir e filmes de Langmuir-Blodgett (LB). Soluções dos fosfolípeos ou misturas de fosfolípeo com porfina foram espalhadas na cuba de Langmuir com subfases constituídas de água Milli-Q^R ou soluções aquosas 1,0 mmolL⁻¹ de Zn²⁺ à 25±1 °C.

Figura 44: Estrutura dos lipídeos utilizados.

Observa-se na Figura 45 as isotermas de pressão de superfície por área por molécula (π -A) das misturas lipídeos-porfirinas. As isotermas π -A dos lipídeos puros estão inseridas nos gráficos. Nota-se que isotermas π -A de todos os lipídeos (tanto os aniônicos quanto o zwitteriônico) sofreram alterações pela presença das porfirinas (Compare os insertos da Figura 45 e as isotermas apresentadas em A, B e C). Podem ser observadas diferenças nas isotermas obtidas com a ZnTC14PyP e a TC14PyP para todos os fosfolípeos. A presença de zinco no interior do macrociclo reduz a área

mínima ocupada por molécula para todas as misturas porfirina-lipídeo (Figura 45 A, B e C).

Fica claro nos insertos que a presença de íons zinco na subfase não afeta significativamente as isotermas do DMPG e DMPC (Figura 45 A e C), mas afeta consideravelmente as isotermas do DMPA (Figura 45 B). Para o DMPA a presença de íons zinco na subfase também afetou a área mínima ocupada por cada molécula de porfirina nas monocamadas mistas com ZnTC14PyP, mas isto não ocorreu para as monocamadas mistas com os outros lipídeos. Nota-se na Figura 44 que os dois fosfolipídeos negativamente carregados apresentam estruturas diferentes em relação à posição das cargas negativas: enquanto DMPG apresenta o grupo fosfato no interior da região polar da molécula (o que dificulta o acesso pelos íons zinco), DMPA apresenta este grupo na região mais externa da cabeça polar sendo, portanto, mais disponível à ligação dos íons zinco. Desta forma, os íons zinco afetam fortemente as isotermas puras e mistas de DMPA (Figura 45 B) e afetam fracamente as isotermas do DMPG (Figura 45 A).

Figura 45: π -A isothermas (A) TC14PyP/DMPG, (B) TC14PyP/DMPA e (C) TC14PyP/DMPC. ZnTC14PyP em Zn^{2+} (—) e em água pura (—), TC14PyP em água pura (—) e em Zn^{2+} (—). As curvas para os fosfolípides puros estão nos inserts, em água pura (♦) ou em solução aquosa contendo íons Zn^{2+} (◄).

Além disso, o empacotamento na superfície é afetado: Zn^{2+} aumenta o módulo compressional ($C_s^{-1} = -A (dp/dA)_T$) para as monocamadas mistas contendo a metaloporfirina. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de C_s^{-1} para as monocamadas puras e mistas.

A presença de zinco na subfase aumenta C_s^{-1} para as isotermas dos lipídeos puros, sendo que o aumento é muito maior para o DMPA. Estes resultados estão de acordo com as diferenças de acesso dos íons zinco aos grupos fosfato de cada lipídeo. Observa-se também que a presença da porfirina torna a isoterma do DMPA mais expandida, enquanto que para o DMPC, também negativamente carregado, ocorre um efeito de condensação. Como C_s^{-1} é influenciado pela presença de íons zinco nas monocamadas mistas com ZnTC14PyP para DMPA e DMPC, isto deve ser um indício que as moléculas de ZnTC14PyP interagem entre si na interface ar-líquido mesmo para uma razão molar porfirina:fosfolipídeo 1:4.

Tabela 8: Módulo Compressional (C_s^{-1}) calculado para as isotermas mistas e puras

		C_s^{-1} Máximo ($\pm 2 \text{ mN m}^{-1}$)		
Subfase →				
Amostra	Água	Zn^{2+} ($10^{-4} \text{ molL}^{-1}$)	Aumento (%)	
DMPG	73,3	92,4	26	
TC14PyP:DMPG	94,2	98,1	~0	
ZnTC14PyP:DMPG	86,8	86,1	~0	
DMPA	160,3	323,6	102	
TC14PyP:DMPA	117,1	116,7	~0	
ZnTC14PyP: DMPA	108,1	129,4	20	
DMPC	87,0	90,7	~0	
TC14PyP:DMPC	98,0	95,1	~0	
ZnTC14PyP:DMPC	88,7	98,0	10	

Os valores de área ocupada por molécula de porfirina na interface ar/líquido nas monocamadas mistas estão apresentados na Tabela 9. Considerando que a área ocupada pela da cabeça polar da molécula de porfirina é 320 Å², pode-se deduzir que algumas moléculas de fosfolipídeos devem estar sobre o anel porfirínico. Conclusões similares foram obtidas em estudos prévios usando outras moléculas porfirínicas (CASELI *et al.* 2003). Pode-se estimar uma média de 7 moléculas de DMPA interagindo com cada molécula da zincoporfirina, e 4 moléculas de DMPG ou DMPC interagindo com cada molécula de zincoporfirina. Este resultado mostra que o DMPA pode ocupar os espaços livres entre as moléculas de porfirina e também ligar-se ao centro metálico enquanto que o DMPG e o DMPC além de ocupar os interstícios devem interagir com as quatro cargas positivas no anel porfirínico.

Tabela 9: Área ocupada (Å²) por molécula de porfirina nas monocamadas mistas.

	Água	Zinco
TC14PyP:DMPG	18,7	17,5
ZnTC14PyP:DMPG	16,2	15,0
TC14PyP:DMPA	23,8	23,8
ZnTC14PyP: DMPA	18,8	15,0
TC14PyP:DMPC	25,0	21,2
ZnTC14PyP:DMPC	13,2	13,8

Espectros eletrônicos de absorção e de emissão foram obtidos para as monocamadas mistas transferidas para suportes de quartzo através da

técnica de Langmuir-Blodgett. O espectro eletrônico de absorção na região UV-Vis de uma solução em metanol da TC14PyP apresenta a banda Soret em 426 nm e a ZnTC14PyP em 441 nm, como usualmente descrito na literatura (GOUTERMAN 1961, PAVANI *et al.* 2009).

Figura 46: Espectro eletrônico de absorção e emissão dos filmes LB mistos A) porfirinas: DMPG, B) porfirinas: DMPA, C) porfirinas: DMPC; TC14PyP em água pura (—) e, em Zn^{2+} (—), ZnTC14PyP em Zn^{2+} (—) e em água pura (—).

A interação entre porfirinas e lipídeos causa o deslocamento para o vermelho da banda Soret, conforme se pode observar nos espectros

apresentados na Figura 46 e é um resultado da estabilização do estado excitado em relação ao fundamental. Nos espectros apresentados as bandas em 463 nm correspondem à zinco porfirina e as bandas em 443 nm são atribuídos à porfirina base-livre. Todos os espectros de absorção dos filmes mistos (ZnTC14PyP: lipídeos) transferidos de subfases contendo água pura ou íons zinco exibiram apenas a banda em 463 nm (Figura 46 coluna da esquerda). Os espectros dos filmes mistos da TC14PyP:DMPC transferidos de subfases contendo água pura ou íons zinco (Figura 46 C), bem como, os espectros dos filmes mistos de TC14PyP:DMPG (Figura 46 A) e TC14PyP:DMPA (Figura 46 B) transferidos de água pura exibiram apenas a banda atribuída à base livre (~435 nm). Importante é observar nos espectros a existência da banda referente à metaloporfirina (463 nm) para os filmes obtidos a partir das monocamadas mistas de TC14PyP:DMPA (Figura 46 B) e TC14PyP:DMPG (Figura 46 A) transferidos de subfases contendo íons zinco. Estes resultados sugerem que a TC14PyP é metalada na presença de íons Zn^{2+} na subfase somente quando a porfirina está disposta na interface com fosfolipídeos carregados negativamente. Por outro lado, para esta reação ocorrer, é razoável imaginar que o anel porfirínico estaria paralelo à interface ar/líquido. A inserção de metal in-situ é comprovada pelas similaridades entre os espectros eletrônicos de absorção e emissão obtidos dos filmes ZnTC14PyP:DMPA e TC14PyP:DMPA (Figura 46 B) e, ZnTC14PyP:DMPG e TC14PyP:DMPG (Figura 46 A) na presença de íons Zn^{2+} na subfase. Observa-se que os espectros de absorção e emissão da TC14PyP:DMPA transferido da subfase Zn^{2+} e da ZnTC14PyP:DMPA não coincidem totalmente.

Deconvolução do espectro de absorção da TC14PyP:DMPA na subfase Zn^{2+} (Figura 46 B inserto) mostram a presença de 2 bandas, correspondentes à base livre e à zincoporfirina, indicando que neste caso e, para o período de tempo de contato usado neste estudo, a metalação é parcial. Comparando as intensidades (I), da área calculada sob cada banda, foi encontrada a razão de 1,4 para $I_{(\text{TC14PyP})} / I_{(\text{ZnTC14PyP})}$ mostrando que apesar da metalação ter ocorrido, ainda há um favorecimento à espécie base-livre. A banda Soret no espectro do filme de TC14PyP:DMPG transferido da subfase zinco coincide com a banda Soret do espectro da ZnTC14PyP:DMPG (Figura 46 A), mostrando que neste caso a metalação foi completa. Os resultados observados nos espectros de emissão corroboram com esta afirmação. A metalação também é observada no espectro de emissão correspondente.

O espectro de absorção do filme TC14PyP:DMPC (Figura 46 C) transferido de subfase contendo Zn^{2+} é idêntico ao do filme transferido de subfase água, bem como os respectivos espectros de emissão, significando que neste caso a metalação in-situ não ocorre. Novamente, este resultado está relacionado à disponibilidade dos íons Zn^{2+} da subfase na interface líquido-ar. Nas monocamadas de DMPC, os íons zinco devem estar ligados ao grupo fosfato localizado internamente na cabeça polar e a carga positiva externa dificulta a saída do Zn^{2+} para a interface por repulsão eletrostática. Portanto há um controle de reatividade frente à metalação do anel porfirínico baseado na localização da carga negativa na cabeça polar e consequentemente a disponibilidade dos íons metálicos. Na realidade, já foi observado que a velocidade de algumas reações químicas, como

catálise ácida ou equilíbrio ácido-base em micelas zwitteriônicas de *N*-tetradecil-*N,N*-dimetilamônio-1-propanosulfonato (SB3-14) pode ser controlada pela adição de certos ânions (PRIEBE *et al.* 2008). Por exemplo, a adição de NaClO₄ induz o caráter aniônico nestas micelas. Estruturalmente SB3-14 apresenta carga positiva. Neste caso, o ânion ClO₄⁻ é especificamente ligado e tem influência na disponibilidade de prótons. No caso do DMPC a carga negativa é mais interna. Os íons zinco podem se ligar especificamente e a carga positiva influenciar a velocidade de saída do Zn²⁺. Portanto, estes íons não estarão disponíveis para interagir com o anel porfirínico. Para o DMPG os íons zinco também estão ligados à carga negativa, mas a região externa da cabeça polar é composta por dois grupos hidroxila os quais não afetam a saída do zinco para a interface e subsequente inserção no anel porfirínico. No caso do DMPA, o grupo negativo é mais externo e consequentemente os íons zinco ligados são mais acessíveis ao contato com o anel porfirínico.

Comparando os dois lipídeos negativamente carregados DMPA e DMPG a diferença nas reatividades deve estar relacionada com a competição entre a ligação eletrostática do Zn²⁺ nos grupos dos fosfolipídeos carregados negativamente e a disponibilidade do Zn²⁺ para reagir com o anel porfirínico. Portanto, quanto menor a área de ocupação da cabeça polar, maior é a densidade elétrica da superfície, os íons estarão mais fortemente ligados ao fosfolipídeo e consequentemente menor é a disponibilidade dos íons zinco para a metalação do anel porfirínico. Esta tendência explica os resultados obtidos para o DMPA, com a menor área por

molécula ($40 \text{ \AA}^2$) comparada ao DMPG ($80 \text{ \AA}^2$). A Figura 47 mostra uma representação esquemática da interação entre os íons zinco da subfase e as moléculas de fosfolípeos explicada anteriormente.

Figura 47: Representação esquemática da interação entre as moléculas de lipídeo e os íons zinco presentes na interface. A: Na molécula de DMPC a carga negativa localiza-se mais internamente na cabeça polar da molécula, de forma que os íons zinco ficam próximos às cargas negativas e as cargas positivas externas são um obstáculo para sua saída; B: Na molécula de DMPG a carga negativa também se localiza mais internamente na cabeça polar da molécula, de forma que os íons zinco ficam próximos às cargas negativas, mas disponíveis para interagir com o anel porfirínico uma vez que os grupos hidroxila não são obstáculos; C: Na molécula de DMPA a carga negativa localiza-se na região externa da cabeça polar da molécula, de forma que os íons zinco ficam disponíveis para interagir com o anel porfirínico na interface, mas a pequena área por molécula torna a interação Zn/lipídeos mais forte que no caso do DMPG.

Desta forma podemos concluir que as interações dos fosfolípeos com porfirinas anfifílicas dependem da carga dos fosfolípeos bem como da disponibilidade destas cargas. A interação da zincoporfirina é mais efetiva com os lipídeos negativamente carregados e depende da disponibilidade de acesso ao grupo fosfato. Esta observação está de acordo com a maior eficiência de ligação das zincoporfirinas em membranas modelo e células HeLa (Figuras 33 e 34). A presença da porfirina expande a monocamada e diminui o módulo compressional. Ocorre metalação *in-situ* para a porfirina base-livre na subfase zinco e esta é dependente da disponibilidade dos íons zinco. Comparando os lipídeos negativamente carregados, a metalação é

completa para o DMPG que apresenta menor densidade superficial de carga negativa e somente parcial para o DMPA, com alta densidade superficial de carga negativa. No caso do lipídeo zwitteriônico, a metalação não acontece.

Comparando a área ocupada por molécula de porfirina nas monocamadas mistas com a área por molécula da cabeça polar porfirínica pode-se concluir que algumas moléculas de fosfolipídeos se localizam sob o anel porfirínico bem como nos espaços livres entre moléculas de porfirinas. A interação entre o DMPA e as moléculas de porfirina é mais efetiva, devido à facilidade de acesso ao grupo fosfato negativamente carregado, conforme verificado pelo maior número de moléculas de fosfolipídeo que estariam situadas sob o anel porfirínico.

Portanto, utilizando as monocamadas de Langmuir e os filmes de Langmuir-Blodgett foi possível comprovar a coordenação do zinco pelo grupo fosfato do lipídeo e ainda verificar que a extensão desta coordenação depende da localização do grupo negativamente carregado na cabeça polar do lipídeo.

3.18) Permeação e Retenção Cutâneos “in vitro”

3.18.a) Caracterização da Formulação

Foi utilizada uma microemulsão água em óleo (A/O) caracterizada como um líquido isotrópico de condutividade $0,63 \mu\Omega/\text{cm}$; viscosidade $204,6 \pm 7,1$ cps e diâmetro médio de gotículas $15,7 \text{ nm}$ (polidispersidade $0,10$).

O diâmetro médio das gotículas das microemulsões contendo as porfirinas foi determinado por espalhamento de luz (Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments) utilizando as amostras sem diluição. As amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas à temperatura ambiente (25°C), em ângulo de detecção de 173°. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise.

Tabela 10: Diâmetro médio das gotículas e polidispersidade (Pdl) das microemulsões

	Diâmetro médio (nm)	Pdl
TMePyP	25,6	0,201
TC8PyP	38,0	0,163
TBzPyP	52,8	0,090

Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 10 e Figura 48, que os sistemas apresentaram uma distribuição monomodal e homogênea das gotículas, evidenciada pela baixa polidispersidade (Pdl <0,2). As gotículas apresentaram dimensões nanométricas, como esperado para esta formulação.

Figura 48: Distribuição do tamanho das gotículas.

3.18.6) Permeação e Retenção Cutâneos

Vários veículos foram testados sendo que, dentre eles, a água foi escolhida para ser utilizada como controle, uma vez que os compostos ficaram retidos no EC e, no caso dos demais veículos, não foi possível quantificar os FSs em nenhuma das camadas da pele.

No experimento controle (água como veículo) as porfirinas penetraram até o EC, sendo que a quantidade retida no EC aumentou com o aumento da lipofilicidade da molécula, ou seja, $TBzPyP < TMePyP < TC8PyP$, conforme pode-se observar nos resultados apresentados na Tabela 11. Acredita-se que a pequena penetração destas moléculas na pele está relacionada ao tamanho das mesmas. (BABILAS *et al.* 2005)

Com a utilização da ME a penetração dos compostos TMePyP e TBzPyP foi otimizada de forma que os mesmos penetraram até a SR, enquanto, por outro lado, a permeação da TC8PyP foi desfavorecida quando incorporada

à esta formulação. Percebe-se que a microemulsão foi uma formulação adequada para aumentar a penetração das porfirinas hidrofílicas TMePyP e TBzPyP na pele. O aumento na retenção dos FSs no EC e na EP+D e a consequente penetração até a SR demonstra a eficiência da formulação utilizada, que atua como um promotor de permeação. Assim conclui-se que esta ME pode ser utilizada para veicular estes FSs (TMePyP e TBzPyP) para o uso em TFD tópica no tratamento do câncer de pele uma vez que permite o acúmulo dos FSs em regiões mais profundas do tecido cutâneo (nas quais se localizam os tumores), permitindo que a ação fotodinâmica ocorra na região adequada para a redução das células neoplásicas e tratamento da lesão na terapia clínica.

Tabela 11: Resultados de Permeação/Retenção Cutânea (12 horas)

Porfirina	Massa/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) CONTROLE (EC)	Massa/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ME (EC)	Massa/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ME (EP+D)	Massa/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ME (SR)
TMePyP	$3,96 \pm 0,20$	$0,303 \pm 0,089$	$0,253 \pm 0,096$	$16,5 \pm 6,1$
TBzPyP	$0,759 \pm 0,02$	$0,235 \pm 0,077$	$0,166 \pm 0,022$	$10,6 \pm 0,90$
TC8PyP	$5,23 \pm 0,10$	-	-	-

A porfirina TC8PyP, que apresenta um maior caráter lipofílico, quando veiculada na microemulsão sequer ficou retida no estrato córneo. Acredita-se que a partição do FS entre a microemulsão e a pele é desfavorável neste caso. Conclui-se que esta formulação não é adequada para veicular este FS com maior caráter lipofílico.

De maneira geral, verifica-se que estas moléculas apresentam baixa penetração e retenção na pele, mas quando adequadamente formuladas passam a apresentar penetração e retenção cutâneas adequadas de modo que poderiam ser utilizados na TFD tópica no tratamento de câncer de pele.

CONCLUSÕES

Uma série de porfirinas catiônicas, com diferentes graus de lipofilicidade, foi sintetizada com sucesso, isolada e caracterizada. Também foram obtidos os respectivos complexos de zinco.

Os dados de absorção e emissão destes FSs corroboram com as descrições existentes na literatura (ELANGO VAN; KRISHNAN 1992, HE *et al.* 1998, 1999). Todos os FSs estudados apresentam $\Phi_{fl} \leq 0,02$ mostrando que o decaimento radiativo do primeiro estado singlete excitado tem menor importância dentre os processos de relaxação competitivos e por outro lado, apresentam $\Phi_{\Delta} \sim 0,8$ indicando que são eficientes geradores de oxigênio singlete.

O aumento na lipofilicidade e a presença de zinco no centro do anel porfirínico aumentam a incorporação dos FSs em vesículas e células, indicando que o processo de incorporação é fortemente influenciado pelo tamanho das cadeias periféricas resultado que corrobora com os dados obtidos por Ricchelli (RICCHELLI *et al.* 2005). O aumento da incorporação com a presença de zinco é um efeito inesperado uma vez que é conhecido que a inserção de zinco aumenta a hidrofiliabilidade de porfirinas (HIROHARA *et al.* 2004). Entretanto, a interação das zincoporfirinas com membranas fosfolipídicas pode ser determinada também pela coordenação metal-fosfato (PASHKOVSKAYA *et al.* 2007) e este efeito mostrou-se importante

na interação dos FSs com membranas. O estudo das interações das porfirinas com fosfolipídeos de diferentes estruturas através das monocamadas de Langmuir e os filmes de Langmuir-Blodgett comprovou a existência desta coordenação.

A incorporação em lipossomos (utilizados como sistema modelo) e o estudo em células, mostram uma mesma tendência na incorporação, sugerindo que a incorporação destes compostos em células HeLa não ocorre por interação com sítios específicos, e sim são decorrentes de interações não específicas, exclusivamente pela partição do fotossensibilizador entre o meio e a bicamada lipídica.

A incorporação em mitocôndrias isoladas ou nas células HeLa intactas é também dependente da lipofilicidade do FS, sendo influenciada pelo potencial eletroquímico de membrana. A inserção de zinco mostrou diminuir a incorporação em mitocôndrias isoladas e mitocôndrias em células HeLa, devido à composição da membrana mitocondrial interna (50% proteínas).

A fototoxicidade aumenta com o aumento da eficiência da incorporação em membranas, e é atribuída também às interações favoráveis entre os FSs e as membranas, permitindo a fotooxidação mais eficiente das mesmas. A porfirina substituída com grupos octila (TC8PyP) é o composto que mais acumula em mitocôndrias, porém seu complexo de zinco (ZnTC8PyP), que se mostra o mais fototóxico dos FSs estudados, apresenta a maior incorporação global. Portanto, para esta série de compostos, a eficiência fotodinâmica é diretamente

proporcional à ligação em membranas e incorporação em células, mas não está totalmente relacionada ao acúmulo seletivo em mitocôndrias.

A quantificação da formação de núcleos sub-diplóides mostra uma tendência das zincoporfirinas induzirem de maneira menos efetiva à formação dos núcleos sub-G1 que suas respectivas base-livre, mas os resultados não são significativamente diferentes segundo o teste estatístico ANOVA ($p < 0,05$). Essa possível diferença na indução de núcleos sub-diplóides pode estar diretamente ligada à diferente localização das porfirinas base-livre e os complexos de zinco o que levaria a mecanismos distintos de morte celular.

Os resultados preliminares de permeação e retenção cutâneos mostram que apesar destas moléculas apresentam baixa penetração e retenção na pele, quando adequadamente formuladas passam a apresentar penetração e retenção cutâneas adequadas de maneira que poderiam ser utilizados na TFD tópica no tratamento de câncer de pele.

Em resumo, verificamos que a alquilação dos grupos piridis foi uma estratégia eficiente para a obtenção de FS mais eficazes. Apesar desta modificação estrutural não afetar as propriedades fotofísicas dos FSs a interação dos mesmos com membranas (vesículas, células e mitocôndrias) aumentou de maneira significativa. A presença de zinco no centro do macrociclo mostrou ser um fator muito importante em promover um aumento na incorporação dos compostos (em vesículas células) e um conseqüente aumento na fototoxicidade, mas não

promoveu o acúmulo seletivo em mitocôndrias. Apesar dos estudos do mecanismo de morte celular não terem sido totalmente conclusivos, observamos uma tendência das porfirinas base-livre induzirem a formação de núcleos sub-diplóides de maneira mais efetiva mostrando, portanto, que o acúmulo seletivo do FS em mitocôndrias resulta em uma maior extensão de morte celular por apoptose, fazendo da TC8PyP o FS mais promissor dentre os estudados neste trabalho.

Referências

- ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; SHERGALIS, W.; "Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on *ms*-tetraphenylporphin", **Journal of the American Chemical Society**, 86, 3145-3149, 1964.
- ADLER, A.D.; LONGO, F.R.; FINARELLI, J.D.; GOLDMACHER, J.; ASSOUR, J.; KORSAKOFF, L.; "A Simplified Synthesis for *meso*-Tetraphenylporphin" , **Journal of Organic Chemistry** , 32, 476, 1967.
- ADLER, A.D.; ALBEN, J.O.; CHOI, S.S.; CAUGHEY, W.S.; "Infrared Spectroscopy of Porphyrins", **Annals of the New York Academy of Sciences**, 206, 278, 1973.
- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M.; "The history of photodetection and photodynamic therapy", **Photochemistry and Photobiology**, 74 (5), 656-669, 2001.
- ALBEN, J.O.; *The Porphyrins, Physical Chemistry: Part A*, v. III, 7, 323-345, Dolphin, D.; Academic Press, New York, 1978.
- AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L.T.; "Photosensitizing action of isomeric zinc N-methylpyridylporphyrins in human carcinoma cells" **Free Radical Research** 40(5), 477-483.
- ANDERSON, R.R.; PARRISH, J.A.; *The Science of Photomedicine, PHOTOBIOLOGY*, eds. REGAN, J.D.; PARRISH, J.A. (Plenum, New York), 1982.
- ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A.; "The epidemiology of UV induced skin cancer"; **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 63, 8-18, 2001.
- ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B.; "Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity"; **Pharmaceutical Science and Technology Today**, 3, 36-4, 2000.

ATKINS, P.W.; *Physical Chemistry*, chap 23, Oxford, New York, (1998), 706-707.

AUTIER, P.; "Perspectives in melanoma prevention: the case of sunbeds"; **European Journal of Cancer**, 40, 2367-2376, 2004.

BABILAS, P.; KARRER, S.; SIDOROFF, A.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R-M.; "Photodynamic Therapy in dermatology – an update" **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 21, 142-149, 2005.

BALCHUM, O. J., DOIRON, D. R.; HUTH, G. C.; "Photoradiation therapy of endobronchial lung cancers employing the photodynamic action of hematoporphyrin derivative" **Lasers in Surgery and Medicine**, 4, 13–30, 1984.

BARR, H.; KRASNER, N.; BOULOS, P. B.; CHATLANI, P.; BOWN, S. G.; "Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study", **British Journal of Surgery** , 77, 93–96, 1990.

BARRY, B.W.; "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery"; **European Journal of Pharmaceutical Science**, 14, 101-114, 2001.

BERLANDA, J.; KIESSLICH, T.; OBERDANNER, C.B.; OBERMAIR, F.J.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K.; "Characterization of apoptosis induced by photodynamic treatment with hypericin in A431 human epidermoid carcinoma cells", **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology**, 25 (1-2), 173-188, 2006.

BIEL, M. A. "Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia" **Laryngoscope** 108, 1259–1268, 1998.

BINDER, H.; ARNOLD, K.; ULRICH, A.S.; ZSCHÖRNIG, O.; "Interaction of Zn^{2+} with phospholipids membranes", **Biophysical Chemistry**, 90, 57-74, 2001.

BONNEAU, S.; MORLIÈRE, P.; BRAULT, D.; "Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation

with cellular incorporation and subcellular distribution", **Biochemical Pharmacology**, 68, 1443-1452, 2004.

BONNETT, R.; "Photosensitizers of the Porphyrin and Phtalocyanine Series for Photodynamic Therapy", **Chemical Society Reviews**, 19, 19-33, 1995.

BONNETT, R.; *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon And Breach Science Publishers, 2000.

BOWN, S. G.; ROGOWSKA, A.Z.; WHITELAW, D.E.; LEES, W.R.; LOVAT, L.B.; RIPLEY, P.; JONES, L.; WYLD, P.; GILLAMS, A.; HATFIELD, A.W.R.; "Photodynamic therapy for cancer of the pancreas" **Gut** 50, 549-557, 2002.

BRONSHTEIN, I.; AULOVA, S.; JUZENIENE, A.; IANI, V.; MA, L.W.; SMITH, K.M.; MALIK, Z.; MOAN, J.; EHRENBURG, B.; "In vitro and in vivo photosensitization by protoporphyrins possessing different lipophilicities and vertical localization in the membrane"; **Photochemistry and Photobiology**, 82, 1319-1325, 2006.

BUCHLER, J.W. AND PALMER, S.E.; *The porphyrins*, ed. Dolphin D., Academic Press, New York, 485, 1978

CALVIN, M.; OKUNO, Y.; FORD, W.E.; "An improved synthesis of surfactant porphyrins", **Synthesis-Stuttgart** 7, 537-539, 1980.

CASELI, L.; VINHADO, F.S.; IAMAMOTO, Y.; ZANIQUELLI, M.E.D. "Influence of Mn (III)porphyrins with different polarities on dimyristoylphosphatidic acid monolayers" **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, 229, 169-180, 2003.

CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R.; "Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization" **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1, 279-293, 2004.

CHEN, Y.; GRAHAM, A.; POTTER, W.; MORGAN, J.; VAUGHAN, L.; BELLNIER, D.A.; HENDERSON, B.W.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, D.J.; PANDEY, R.K.;

"Bacteriopurpurinimides: highly stable and potent photosensitizers for photodynamic therapy" **Journal of Medicinal Chemistry** 45, 255-258, 2002.

CRENAY, Th.; ZIMMERMANN, H.W.; "Selective photosensitization of mitochondria by the lipophilic cationic porphyrin POR 10", **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 34, 191-196, 1996.

COLE, R.B.; *Electrospray Ionization Mass Spectroscopy*; John Wiley & Sons Inc.:New York, 1997.

COLLIER, A.C; PRITSOS, C.A; "The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay", **Biochemical Pharmacology** 66, 281-287, 2003.

COSA, G.; SCAIANO, J.C.; "Laser techniques in the study of drug photochemistry", **Photochemistry and Photobiology**, 80, 159-174, 2004.

DALLA VIA, L.; MAGNO, S.M.; "Photochemotherapy in the Treatment of Cancer", **Current Medicinal Chemistry**, 8, 1405-1428, 2001.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F.; "Features of apoptotic cells measured by flow citometry" **Citometry** 13, 795-808, 1992.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F.; "Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)" **Cytometry**, 27, 1-20, 1997.

DELANEY, T. F.; SINDELAR, W.F.; TOCHNER, Z.; SMITH, P.D.; FRIAUF, W.S.; THOMAS, G.; DACHOWSKI, L.; COLE, J.W.; STEINBERG, S.M.; GLATSTEIN, E.; "Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors", **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, 25, 445-457, 1993.

DEMAS, J.N.; CROSBY, G.A.; "The measurement of photoluminescence quantum yields. A review." **The Journal of Physical Chemistry**, 75 (6), 991-1024, 1971.

- DeROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J.; "Photosensitized singlet oxygen and its applications", **Coordination Chemistry Reviews**, 233-234, 351-371, 2002.
- DIMOFTE, A., ZHU, T. C., HAHN, S. M. & LUSTIG, R. A.; "In vivo light dosimetry for motexafin lutetium-mediated PDT of breast cancer" **Lasers in Surgery and Medicine**, 31, 305-312, 2002.
- Di STASIO, B.; FROCHOT, C.; DUMAS, D.; EVEN, P.; ZWIER, J.; MÜLLER, A.; DIDELON, J.; GUILLEMIN, F.; VIRIOT, M.L.; BARBERI-HEYOB, M.; "The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin", **European Journal of Medicinal Chemistry**, 40, 1111-1122, 2005.
- DIXON, D.W.; PU, G.; WOJTOWICZ, H.; "Capillary electrophoretic separation of cationic porphyrins", **Journal of Chromatography A**, 802, 367-380, 1998.
- DOLMANS, D. E.J.G.J., FUKUMURA, D.; JAIN, R.K.; "Photodynamic Therapy of Cancer", **Nature Reviews**, 3, 380-387, 2003.
- DOUGHERTY, T. J.; LAWRENCE, G.; KAUFMAN, J.H.; BOYLE, D.; WEISHAUP, K.R.; GOLDFARB, A.; "Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma", **Journal of the National Cancer Institute**, 62 (2), 231-237, 1979.
- DOUGHERTY, T.J.; MACDONALD, I.J.; "Basic Principles of photodynamic therapy", **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 5, 105-129, 2001.
- DURANTINI, E.N.; RIVAROLA V.; SILBER, J.J.; BORSARELLI, C.D.; YSLAS, E.Y.; ALVAREZ, M.G.; MILANESIO, M.E.; "Photodynamic studies of metallo 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl) porphyrin: Photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line", **Photochemistry and Photobiology**, 74(1), 14-21, 2001.
- EATON, D.F.; "Fluorescence Materials for Fluorescence Measurement", **Pure & Applied Chemistry**, 60 (7), 1107-1114, 1988.

ELANGO VAN, T.; KRISHNAN, V.; "Photophysical properties of porphyrin amphiphiles bearing pyridinium groups"; **Chemical Physics Letters**, 194 (1,2), 139-146, 1992.

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**, 39, 175-185, 2007.

FALK, J.E. in *Porphyrins and Metalloporphyrins* ; B.B. Library, London, 1964.

FAVILLA, I.; FAVILLA, M.L.; GOSBELL, A.D.; BARRY, W.R.; ELLIMS, P.; HILL, J.S.; BYRNE, J.R.; "Photodynamic therapy: a 5 year study of its effectiveness in the treatment of posterior uveal melanoma, and evaluation of haematoporphyrin uptake and photocytotoxicity of melanoma cells in tissue culture", **Melanoma Research**, 5 (5), 355–364, (1995).

FEHR, M. K.; HORNING, R.; SCHWARZ, V.A.; SIMEON, R.; HALLER, URS; WYSS, P.; "Photodynamic therapy of vulvar intraepithelial neoplasia III using topically applied 5-aminolevulinic acid" **Gynecologic Oncology**, 80 (1), 62–66 2001.

FINSEN, N. R. ; *Phototherapy* (Edward Arnold), London, 1901.

FOGLIENI, C.; MEONI, C.; DAVALLI, A.M.; "Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions" **Histochemistry and Cell Biology** 115, 223-229, 2001.

GABRIELLI, D.S.; BELISLE, E.; SEVERINO, D.; KOWALTOWSKI, A.J.; BAPTISTA, M.S.; "Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions", **Photochemistry and Photobiology**, 79, 227-232. 2004.

GODDARD III, W.A.; TAKEUCHI, T.; GRAY, H.B.; "Electronic Structures of Halogenated Porphyrins: Spectroscopic Properties of ZnTFPPX8 (TFPPX8 = Octa-.beta.-halotetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin; X = Cl, Br)", **Journal of the American Chemical Society**, 116, 9730, 1994.

GOMER, C. J.; DOIRON, D. R.; JESTER, J. V.; SZIRTH, B. C.; MURPHREE, A. L.; "Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy for the treatment of intraocular tumors: examination of acute normal ocular tissue toxicity", **Cancer Research**, 43, 721-727, 1983.

GONSALVES, A.M.d'A.R.; VAREJÃO, .M.T.B.; PEREIRA, M.M.; "Some new aspects related to the synthesis of meso-substituted porphyrins", **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 28, 635, 1991.

GOUTERMAN, M.; "Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphyrin" **Journal of Chemical Physics** 30(5), 1139-1161, 1959.

GOUTERMAN, M.; "Spectra of porphyrins"; **Journal of Molecular Spectroscopy**, 6, 138-163, 1961.

GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G.H.; SNYDER, L.C.; "Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model"; **Journal of Molecular Spectroscopy**, 11(2), 108-127, 1963.

GOUTERMAN, M.; in " *The Porphyrins*" ed. Dolphin D., vol III, part A, 1, New York, Academic Press, 1978.

GRAHAM, A.; LI, G.; CHEN, Y.; MORGAN, J.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, T.J.; PANDEY, R.K.; "Structure-Activity relationship of new octaethylporphyrin-based benzochlorins as photosensitizers for photodynamic therapy" **Photochemistry and Photobiology**, 77(5), 561-566, 2003.

HAUSMANN, W.H.; "Die sensibilisierende Wirkung des Hamatoporphyrins" **Biochem Z.**, 30, 276-316, 1910.

HAYATA, Y., KATO, H., OKITSU, H., KAWAGUCHI, M. & KONAKA, C.; "Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in cancer of the upper gastrointestinal tract" **Seminars in Surgical Oncology**, 1, 1-11, 1985.

HE, X.; ZHOU, Y.; WANG, L.; LI, T.; ZHANG, M.; SHEN, T.; "Photophysical properties of amphiphilic porphyrins in different media"; **Dyes and Pigments**, 173-182, 1998.

HE, X.; XIA, G.; ZHOU, Y.; ZHANG, M.; SHEN, T.; "Comparative study of photophysical properties of isomeric tetrapyrrolyl- and tetra-(N-hexadecylpyridinium) porphyrins"; **Spectrochimica Acta**, 55, 873-880, 1999.

HENDERSON, B.W.; BELNIER, D.A.; GRACO, W.R.; SHARMA, A.; PANDEY, R.K.; VAUGHAN, L.; WEISHAUP, K.R.; RODGERS, M.A.J.; DOUGHERTY, T.J.; "A quantitative structure-activity relationship for congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy" **Cancer Research** 57, 4000-4007, 1997.

HILL, J. S.; KAYE, A.H.; SAWYER, W.H.; MORSTYN, G.; MEGISON, P.D.; STYLLI, S.S.; "Selective uptake of hematoporphyrin derivative into human cerebral glioma", **Neurosurgery**, 26, 248-254, 1990.

HIROHARA, S.; OBATA, M.; OGURA, S-ICHIRO; OKURA, ; HIGASHIDA, S.; OHTSUKI, C.; OGATA, S-ICHI; NISHIKAWA, Y.; TAKENAKA, M.; ONO, H.; MIKATA, Y.; YANO, S.; "Hydrophobicity parameters (Log P) of glycoconjugated porphyrins for photodynamic therapy evaluated by reversed phase HPLC", **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 8, 1289-1292, 2004.

HORNUNG, R. "Photomedical approaches for the diagnosis and treatment of gynecologic cancers"; **Current Drug Targets: Immune, Endocrine & Metabolic Disorders** 1, 165-177, 2000.

HUANG, Q.; PAN, Z.; WANG, P.; CHEN, Z.; ZHANG, X.; XU, H.; "Zinc (II) and copper (II) complexes of β -substituted hydroxylporphyrins as tumor photosensitizers" **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 16, 3030-3033, 2006.

HYNNINEN, P.H.; NYMAN, E.S.; "Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic Therapy" **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology**, 73, 1-28, 2004.

KADISH, K.M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R.; in: *The porphyrin Handbook III*, Academic Press, 2000, 30-33.

KASZUBA, M.; CONNAH, M.; MATTISON, K.; *High concentration particle size measurements using dynamic light scattering*. Disponível em <<http://www.malvern.co.uk>>. Acesso em: abril, 2006.

a) KESSEL, D.; "Photodynamic Therapy: from the beginning" **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1, 3-7, 2004.

b) KESSEL, D.; "Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy" **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 8, 1009-1014, 2004.

KESSEL, D.; LUO, Y.; "Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis", **Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 42, 89 – 95, 1998.

KESSEL, D.; LUO, Y.; "Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death", **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 5, 181 – 184, 2001.

KESSEL, D.; LUGUYA, R.; VICENTE, M.G.H.; "Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution" **Photochemistry and Photobiology**, 78(5), 431-435, 2003.

KESSEL, D.; LUO, Y.; DENG, Y.; CHANG, C.K.; "The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy", **Photochemistry and Photobiology**, 65, 422 – 426, 1997.

KLAUS, M.D.; "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy" **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 53(3), 153-159, 2004.

KOCHEVAR, I. E.; LYNCH, M.C.; ZHUANG, S.; LAMBERT, C.R.; "Singlet Oxygen, but not Oxidizing Radicals, Induces Apoptosis in HL-60 Cells"; **Photochemistry and Photobiology**, 72(4), 548–553, 2000.

KÚBAT, P.; MOSINGER, J.; "Photophysical properties of metal complexes of meso-tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin", **Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry**, 96, 93-97, 1996.

LAU, A.; MCLAUGHLIN, A.; MCLAUGHLIN, S.; "The adsorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes", **Biochimica et Biophysica Acta** 645, 279–292, 1981.

LANDAU, I. M.; STEEN, B.; SEREGARD, S.; "Photodynamic therapy for circumscribed choroidal haemangioma", **Acta Ophthalmologica Scandinavica** 80, 531–536, 2002.

LIN, C.P.; LYNCH, M.C.; KOCHEVAR, I.E.; "Reactive oxidizing species produced near the plasma membrane induce apoptosis in bovine aorta endothelial cells", **Experimental Cell Research**, 259, 351-359, 2000.

LINDSEY, J.S.; SCHREIMAN, I.C.; HSU, H.C.; KEARNEY, P.C.; MARGUERETTAZ, A.M.; "Rothemund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions" **Journal of Organic Chemistry**, 52, 827-836, 1987.

a) LIPSON, R. L., BALDES, E. J. & OLSEN, A. M.; "Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease" **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery** 42, 623–629, 1961.

b) LIPSON, R. L., BALDES, E. J. & OLSEN, A. M.; "The use of an derivative of hematoporphyrin in tumor detection" **Journal of the National Cancer Institute** 26, 1–11, 1961.

LIPSON, R. L., *Proceedings of the 9th International Cancer Congress*, Tokio Japan, 1966.

- LONGET-HIGGINS, H.C.; RECTOR, C.W.; PLATT, J.R.; "Molecular Orbital calculations on porphine and tetrahydroporphine" **Journal of Chemical Physics**, 18, 1174-1181, 1950.
- MACHADO, A.H.A.; BRAGA, F.M.P.; SOARES, C.P.; PELISSON, M.M.M.; BELTRAME JUNIOR, M.; da SILVA, N.S.; "Photodynamic Therapy with a new photosensitizing agent", **Photomedicine and Laser Surgery**, 25 (3), 220-228, 2007.
- MAMAN, N.; DHAMI, S.; PHILIPS, D.; BRAULT, D.; "Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles" **BBA-Biomembranes**, 1420, 168-178, 1999.
- MANG, T. S.; ALLISON, R.; HEWSON, G.; SNYDER, W.; MOSKOWITZ, R.; "A Phase II/III study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer" **Cancer Journal from Scientific American**, 4, 378-384, 1998.
- McCAUGHAN, J. S. JR, HICKS, W., LAUFMAN, L., MAY, E. & ROACH, R.; "Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy" **Cancer** 54, 2905-2910, 1984.
- MEUNIER, B.; LACEY, C.J.; LOUP, C.; SAINT-JALMES, B.; CASAS, C.; **Journal of Organic Chemistry**, 58, 2913, 1993.
- MEYER-BETZ, F.; "Untersuchungen uber die biologische photodynamische Wirkung des Hematoporphyrins und anderer Derivative des Blut und Galenafarbstoffs" ; **Dtsch Arch. Klin.**, 112, 476-503, 1913.
- MLKVY, P.; MESSMANN, H.; REGULA, J.; CONIO, M.; PAUER, M.; MILLSON, C.E.; MACROBERT, A.J.; BOWN, S.G.; "Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors using three photosensitizers — ALA induced PPIX, Photofrin and MTHPC. A pilot study", **Neoplasma**, 45, 157-161, 1998.

MOSMAN, T.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays" **Journal of Immunological Methods** 65, 55-63, 1983.

MORGAN, J.; OSEROFF, A.R.; "Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy", **Advanced Drug Delivery Reviews**, 49, 71-86, 2001.

NETTO, L. E. S., A. J. KOWALTOWSKI, R. F. CASTILHO AND A. E. VERCESI "Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage". **Methods in Enzymology**, 348, 260–270, 2002.

NEUMANN-SPALLART, M.; KALYANASUNDARAM, K.; "Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous-media" **The Journal of Physical Chemistry**, 86 (26), 5163-5169, 1982.

OBATA, M.; HIROHARA, S.; SHARYO, K.; ALITOMO, H.; KAJIWARA, K.; OGATA, S-I.; TANIHARA, M.; OHTSUKI, C.; YANO, S.; "Sugar-dependent photodynamic effect of glycoconjugated porphyrins: A study on photocytotoxicity, photophysical properties and binding behavior to bovine serum albumin (BSA)", **Biochimica et Biophysica Acta**, 1770, 1204-1211, 2007.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I.; "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how", **Photochemical and Photobiological Science**, 1, 1 –21, 2002.

OLMSTED, J. "Calorimetric determinations of absolute fluorescence quantum yields" **The Journal of Physical Chemistry** 83(20), 2581-2584, 1979.

ORTEL, B.; CALZAVARA-PINTON, P.G.; SZEIMIES, R.M.; HASAN, T. "Perspectives in cutaneous photodynamic sensitization" **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, , 209-211, 1996.

OSEROFF, A.R.; MORGAN, J.; "Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy", **Advanced Drug Delivery Reviews**, 49, 71-86, 2001.

- PANDEY, R. K., "Recent advances in photodynamic therapy", **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 4, 368-373, 2000.
- PANZARINI, E.; TENUZZO, B.; PALAZZO, F.; CHIONNA, A.; DINI, L.; "Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumor cells by photoproducts of Rose Bengal acetate", **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 83, 39-47, 2006.
- PASHKOVSKAYA, A.A.; SOKOLENKO, E.A.; SOKOLOV, V.S.; KOTOVA, E.A.; ANTONENKO, Y.N.; "Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: Contribution of metal-phosphate coordination", **Biochimica et Biophysica Acta**, 1768, 24598-2465, 2007.
- PAVANI, C.; UCHOA, A.F.; OLIVERIA, C.S.; IAMAMOTO, Y.; BAPTISTA, M.S.; "Effect on zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers", **Photochemical and Photobiological Sciences**, 8, 233-240, 2009.
- PECORA, R.; *Dynamic light scattering. Applications of photon correlation spectroscopy*, chapter 8, New York: Plenum Press, 1985, pp.305.
- PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHL, H.; STEEN, H.B.; NESLAND, J.M.; GIERCKSKY, K.E. "Distribution of 5aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloucerative basal cell carcinoma", **Photochemistry and Photobiology**, 62, 906-913, 1995.
- POPOVIC, E. A.; KAYE, A. H.; HILL, J. S.; "Photodynamic therapy of brain tumors" **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery** 14, 251-261, 1996.
- PRIEBE, J.P.; SATNAMI, M.L.; TONDO, D.W.; SOUZA, B.S.; PRIEBE, J.M.; MICKE, G.A.; COSTA, A.C.O.; FIEDLER, H.D.; BUNTON, C.A.; NOME, F. **Journal of Physical Chemistry B: Condensed Matter, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical** 112, 14373, 2008.

QUIMBY, D.J.; LONGO, F.R.; "Luminescence studies on several tetra-arylporphins and their zinc derivatives", **Journal of the American Chemical Society**, 97 (18), 5111-5117, 1975.

RAAB, O. ; "Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien" **Zeitung Biol.**, 39, 524-526, 1900.

REDDI, E.; CECCON, M.; VALDUGA, G.; JORI, G.; BOMMER, J. C.; ELISEI, F.; LATTERINI, L.; MAZZUCATO, U.; "Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins" **Photochemistry and Photobiology**, 75 (5), 462-470, 2002.

REDMOND, R.W.; GAMLIN, J.N.; "A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules", **Photochemistry and Photobiology** 70 (4), 391-475, 1999.

REDMOND, R.W.; KOICHEVAR, I.E.; "Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen" **Photochemistry and Photobiology** 82, 1178-1186, 2006.

REINERS JR, J. J.; CARUSO, J. A.; MATHIEU, P.; CHELLADURAI, B.; YIN, X.-M.; KESSEL, D.; "Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage", **Cell Death Differentiation**, 9, 934-944, 2002.

RIBEIRO, C.; "Cosmetologia Aplicada a Dermocosmética", São Paulo, Pharmabooks, 2006, 270p.

RICCHELLI, F.; FRANCHI, L; MIOTTO, G; BORSETTO, L; GOBBO, S; NIKOLOV, P; BOMMER, JC; REDDI. E; "Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting" **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 37, 306-319, 2005.

ROHATGI-MUKHERJEE, K.K.; Fundamentals of Photochemistry, Wiley Eastern Limited, New Delhi, 2nd reprint, 1992.

ROSSETTI, F.C.; "Microemulsões como sistemas de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na Terapia Fotodinâmica do

câncer de pele: obtenção, caracterização e estudos de permeação e penetração cutâneas", Ribeirão Preto, 2006, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

ROTHERMUND, P.; "Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes" **Journal of the American Chemical Society**, 57, 2010-2011, 1935.

ROTHERMUND, P.; "A New Porphyrin Synthesis: The Synthesis of Porphin", **Journal of the American Chemical Society**, 58, 625-627, 1936.

ROTHERMUND, P.; "Porphyrin Studies. III. The Structure of the Porphine Ring System" **Journal of the American Chemical Society**, 61(10), 2912-2915, 1939.

SANDEMAN, D. R.; "Photodynamic therapy in the management of malignant gliomas: a review" **Lasers in Medical Science** 1, 163-167, 1986.

SCHNEIDER, R.; SCHIMITT, F.; FROCHOT, C.; FORT, Y.; LOURETTE, N.; GUILLEMIN, F.; MÜLLER, J-F.; BARBIERI-HEYOB, M.; "Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy", **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13, 2799-2808, 2005.

SCHWEITZER, V. G. "Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer", **Otolaryngology: Head and Neck Surgery**, 102, 225-232, 1990.

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H.C.; GUGLIOTTI, NM.; GABRIELLI, D. S.; BAPTISTA, M.S.; "Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue"; **Photochemistry and Photobiology**, 77 (5), 459-468, 2003.

SHARONOV, G.V.; KARMAKOVA, T.A.; KASSIES, R.; PLJUTINSKAYA, A.D.; GRIN, M.A.; REFREGIERS, M.; YAKUBOVSKAYA, R.I.; MIRONOV, A.F.; MAURIZOT, J.C.; VIGNY, P.; OTTO, C.; FEOFANOV, A.V.; "Cycloimide

bacteriochlorin *p* derivatives: Photodynamic properties and cellular and tissue distribution" **Free Radical Biology and Medicine** 40, 407-419, 2006.

SHAW, D. J.; MAAR, J. H.; "Introdução à Química dos Colóides e de superfícies", trad.: Edgard Blucher - EDUSP, 1975.

SHEN, T.; ZHANG, M.; ZHOU, Y.; XIA, G.; HE, X.; "Comparative study of photophysical properties of isomeric tetrapyrrolyl- and tetra-(N-hexadecylpyridiniumyl) porphyrins" **Spectrochimica Acta A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 55, 873-880, 1999.

SIBATA, C.H.; CHILDS, C.J.H.; HU, X.H.; CUENCA, R.; DOWNIE, G.H.; ALLISON, R.R.; "Photosensitizers in clinical PDT" **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 1, 27-42, 2004.

SIMPSON, W.T.; "On the Theory of the pi-electron system in porphyrines" **Journal of Chemical Physics**, 17, 1218, 1949.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N.; "Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos" **Química Nova**, 25 (5), 801-807, 2002.

SMITH, K.M.; in: *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, 1975, 177-186.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WÖHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RÖDER, B.; SCHNURPFEIL, G.; "Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar and micellar solutions" **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 2, 145-158, 1998.

SOL, V.; LAMARCHE, F.; ENACHE, M.; GARCIA, G.; GRANET, R.; GUILLOTON, M.; BLAIS, J.C.; KRAUSZ, P.; "Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: Potential agents for photodynamic therapy of cancers", **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 1364-1377, 2006.

SONGCA, S.P.; MBATHA, B.; "Solubilization of meso-tetraphenylporphyrin photosensitizers by substitution with fluorine and with 2,3-dihydroxy-1-

propyloxy groups" **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 52 (11), 1361-1367, 2000.

SPANGLER, D.; MAGGIORA, G.M.; SHIPMAN, L.L.; CHRISTOFFERSEN, R.E.; "Stereoelctronic properties of photosynthetic and related systems. 1 Ab initio quantum mechanical ground state characterization of free base porphine, chlorin, and ethyl pheophorbide a", **Journal of the American Chemical Society**, 99 (23), 7470-7477, 1977.

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C.; "Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy", **Tetrahedron**, 54, 4151-4202, 1998.

STENDER, I.M.; WULF, H.C.; "Photodynamic therapy with 5aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis" **British Journal of Dermatology**, 135, 454-456, 1996.

SUHODEN, T.M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A.; "Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations" **Journal of Controlled Release**, 59, 149-161, 1999.

SZEIMIES, R.M.; KARRER, S.A.; "Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses: an initial clinical study", **Dermatology**, 192, 146-251, 1996.

TANIELIAN, C.; HEINRICH, G.; "Effect of aggregation on the hematoporphyrin-sensitized production of singlet molecular oxygen", **Photochemistry and Photobiology**, 61 (2), 131-135, 1995.

TOMÉ, J.P.C.; NEVES, M.G.P.M.S.; TOMÉ, A.C.; CAVALEIRO, J.A.S.; MENDONÇA, A.F.; PEGADO, I.N.; DUARTE, R.; VALDEIRA, M.L.; "Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2", **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13, 3878-3888, 2005.

TOUMA, D.J.; SZEIMIES, R-M.; "Terapia Fotodinâmica Tópica" in: GILCHREST, B.A.; KRUTMANN, J.; Envelhecimento cutâneo, Carlos

Henrique Cosendey (Trad.), Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, Cap 14, 207-218.

TREVISI, L.; PIGHIN, I.; BAZZAN, S.; LUCIANI, S.; "Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells" **FEBS Letters**, 580 (11), 2769-2773, 2006.

van Gisbergen, S.J.A; Rosa, A.; Ricciardi, G.; Baerends, E.J.; "A DFT/TDDFT interpretation of the ground and excited states of porphyrin and porphyrazine complexes" **Coordination Chemistry Reviews**, 230, 5-27, 2002.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C.; "Flow cytometry of apoptotic cell death", **Journal of Immunological Methods**, 243 (1-2), 167-190, 2000.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A.; "Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen"; **Munch Med. Wochenschr.** 47, 2042-2044, 1903.

VON TAPPEINER, H.; JODLBAUER, A.; "Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen Gesamte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung" (Vogel, F. C., Leipzig, 1907).

YOU, Y.; GIBSON, S.L.; DETTY, M.R.; "Core-modified porphyrins. Part 5: Electronic effects on photophysical and biological properties in vitro" **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 13, 5968-5980, 2005.

WARD, B. G., FORBES, I. J., COWLED, P. A., MCEVOY, M. M. & COX, L. W. "The treatment of vaginal recurrences of gynecologic malignancy with phototherapy following hematoporphyrin derivative pretreatment", **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 142, 356-357, 1982.

Web 1 . (http://cosmeticnow.com.br/mt_sol-melhoradores-filtros.htm)

Web 2. www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/index.html

Web 3. <http://www.wuacc.edu/cas/chemistry/sleung/porphyrin>

Web 4. <http://curlygirl.naturlink.pt/celula.htm> acessado em 08/09/08.

WENNBERG, A.M.; LINDHOLM, L. E.; ALPSTEN, M.; LARKO, O. "Treatment of superficial basal cell carcinomas using topically applied delta-aminolevulinic acid and a filtered xenon lamp", **Archives of Dermatological Research**, 288, 561-564, 1996.

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 and Chemical Reference Data**, 22, 113-262, 1993.

ZHENG, G.; POTTER, W.R.; CAMACHO, S. II; MISSERT J.R.; WANG, G. BELLNIER, D.A.; HENDERSON, B.W.; RODGERS, M.A.J.; DOUGHERTY, T.J.; PANDEY, R.K.; "Synthesis, photophysical properties, tumor uptake and preliminary in vivo photosensitizing efficacy of a homologous series of 3-(1'-alkyloxy)ethyl-3-devinyl purpurin-18-N-alkylimides with variable lipophilicity" **Journal Medicinal Chemistry** 44 1540-1559, 2001.

ZIMMERMANN, H.W.; CERNAY, T.H.; "Selective photosensitization of mitochondria by the lipophilic cationic porphyrin POR10" **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**; 34, 191-196, 1996.

APÊNDICE A - Estudo de fragmentação das porfirinas alquiladas através de espectrometria de massas

Fragmentação da TC8PyP

Isolou-se o íon em $m/z = 267.8$ (cátion 5,10,15,20-(1-octil-4-N-piridil) porfirina), Figura 49. A fragmentação observada indica que ocorrem perdas sucessivas de cadeias alquílicas, apresentando os picos em $m/z = 319.3$ (3 cadeias e 3 cargas positivas); $m/z = 422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas) e $m/z = 731.6$ (1 cadeia e 1 carga positiva). Além disso, possivelmente o íon em $m/z = 731.6$ sofre uma protonação gerando o pico em $m/z = 366.3$ (1 cadeia e 2 cargas positivas) e que posteriormente sofre a perda de mais uma cadeia resultando no íon em $m/z = 619.4$ (nenhuma cadeia alquílica e 1 carga positiva).

Figura 49: Espectro ESI-MS/MS do íon $m/z = 267.8$ da TC8PyP.

Analisou-se também a fragmentação para o íon em $m/z=356.7$ isolado, Figura 50. Observa-se perdas sucessivas de cadeias alquílicas gerando os picos em $m/z=478.5$ (3 cadeias e 2 cargas positivas) e $m/z=843.7$ (2 cadeias e 1 carga positiva), a partir do íon de $m/z 357.7$ (4 cadeias e 3 cargas positivas). Nota-se a protonação do íon de $m/z=478.5$, gerando um pico em $m/z=319.6$ (3 cadeias alquílicas e 3 cargas positivas) que também sofre perdas sucessivas de cadeias alquílicas, observando-se os sinais em $m/z=422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas) e $m/z=731.6$ (1 cadeia e 1 carga positiva).

Figura 50: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z= 356,7$ da TC8PyP.

Isolou-se o íon de $m/z=535.5$ (4 cadeias e 2 cargas positivas), apresentado na Figura 51 e observou-se a existência de uma maior basicidade para este composto, uma vez que as perdas de cadeias alquílicas foram necessariamente acompanhadas de

protonação, observou-se os picos em $m/z=479.9$ (3 cadeias e 2 cargas positivas), , $m/z= 366.3$ (1 cadeia e 2 cargas positivas). O íon de $m/z=422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas) também sofre perda de cadeia alquílica sem protonação resultando no sinal em $m/z= 731.5$ (1 cadeia e 1 carga positiva).

O experimento ESI-MS da amostra utilizando maior energia (Figura 52Figura 52:) resultou, além dos picos já observados no experimento com menor energia, em $m/z=267.8$; 356.7 e 535.5; observou-se a perda de cadeias alquílicas observando-se os picos em $m/z=319.3$ (3 cadeias e 3 cargas positivas) e 422.4 (2 cadeias e 2 cargas positivas).

Figura 51: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z= 535,4$ da TC8PyP.

Figura 52: Espectro ESI-MS utilizando maior energia.

No experimento ESI-MSMS para o íon de $m/z=319.6$ (3 cadeias e 3 cargas positivas), apresentado na Figura 53 observa-se a perda de cadeias alquílicas observando-se os picos em $m/z=422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas) e $m/z=731.5$ (1 cadeia e 1 carga positiva) e a partir de cada um destes picos, a perda de cadeia alquílica acompanhada de protonação observando-se respectivamente os sinais em $m/z=366.4$ (1 cadeia e 2 cargas positivas) e $m/z=619.5$ (nenhuma cadeia e 1 carga positiva).

Figura 53: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z = 319, 6$.

No experimento ESI-MSMS para o íon de $m/z=422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas), apresentado na Figura 54, observa-se a perda de cadeia alquílica podendo-se notar sinal em $m/z=731.5$ (1 cadeia e 1 carga positiva) e perdas de cadeias acompanhadas de protonação a partir do mesmo gerando o sinal em $m/z=619.5$ (nenhuma cadeia e 1 carga positiva) e perdas sucessivas a partir do íon de $m/z=422.4$ (2 cadeias e 2 cargas positivas) notando-se os picos em $m/z=366.3$ (1 cadeia e 2 cargas positivas) e $m/z=310.2$ (nenhuma cadeia e 2 cargas positivas).

Figura 54: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z=422,4$ da TC8PyP.

Fragmentação da TC14PyP

Em uma tentativa de verificar a fragmentação da porfirina fez-se estudos ESI-MSMS. No espectro apresentado na Figura 33 isolou-se o íon de $m/z=352,1$ (Cátion 5,10,15,20-tetrakis(1-tetradecil-4-N-piridil)porfirina).

A fragmentação observada indica que ocorrem perdas sucessivas das cadeias alquílicas, apresentando os picos em $m/z=403,4$ (composto com 3 cadeias alquílicas e 3 cargas positivas, determinadas através da diferença de massa da razão isotópica), $m/z=506,5$ (porfirina com 2 cadeias alquílicas e 2 cargas positivas) e $m/z=815,7$ (porfirina com 1 cadeia alquílica e 1 carga positiva).

Figura 55: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z=352,1$ da TC14PyP.

Além disso, isolou-se o íon de $m/z= 469,0$ que foi atribuído à porfirina tetraalquilada com 3 cargas, para analisar o padrão de fragmentação.

Observou-se para este composto um padrão de fragmentação diferenciado. Além das sucessivas perdas de cadeias alquílicas à partir do cátion com 4 cadeias e 3 cargas positivas, que levam ao aparecimento dos picos em $m/z=605,2$ (3 cadeias e 2 cargas) e $1012,0$ (2 cadeias e 1 carga), ocorre a perda de cadeias alquílicas a partir do cátion de $m/z=403,6$, observando-se os sinais em $m/z=506,5$ (2 cadeias e

2 cargas) e $m/z=815,7$ (1 cadeia e 1 carga). Os dois fragmentos que apresentam carga +1, em $m/z=815,8$ e 1012,05, que apresentam uma e duas cadeias alquílicas, respectivamente, sofrem perdas de 79 unidades de massa, indicando que há a perda de um grupo piridil da molécula.

Supõe-se que o íon de $m/z=403,6$ seja proveniente da protonação do cátion de $m/z=605,2$. Ainda não é possível saber se essa protonação se dá no nitrogênio do grupo piridil, do qual ocorreu a saída da cadeia alquílica (talvez através da saída de uma cadeia neutra) ou, se ocorre uma protonação no nitrogênio pirrólico.

Figura 56: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z=469,2$ da TC14PyP.

Isolou-se também o íon $m/z = 703,2$. Observa-se a perda de uma cadeia alquílica, resultando no pico em $m/z = 1012,5$ (3 cadeias alquílicas e 1 carga positiva). Acredita-se que este composto apresente uma elevada basicidade e, desta maneira, as perdas de cadeias alquílicas a partir do íon de $m/z = 604,7$ (3 cadeias e 2 cargas) e do íon de $m/z = 1012,5$, sejam acompanhadas de protonação. Assim, apesar de ser observada a perda de cadeia alquílica, não se detecta alteração na carga da molécula. Neste sentido, a partir do íon de $m/z = 604,7$ obtém-se os picos em $m/z = 506,0$ (2 cadeias e 2 cargas) e $407,3$ (1 cadeia e 2 cargas) e, a partir do íon de $m/z = 1210,5$, observa-se os picos em $m/z = 1012,1$ (2 cadeias e 1 carga) e $813,8$ (1 cadeia e 1 carga). O composto que dá o sinal em $m/z = 604,7$ seria, resultado de protonação do composto de sinal em $m/z = 1012,5$.

Figura 57: Espectro ESI-MSMS do íon $m/z=703,3$ da TC14PyP.

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Christiane Pavani

Nascida em 01 de janeiro de 1982 em Ribeirão Preto, SP.

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Departamento de Química, Ribeirão Preto.

2009- Doutorado em Ciências

2004 – Licenciatura em Química

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas

2003 – Bacharelado em Química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto – FAPESP – 06/2004 a 05/2009

Bolsista de Iniciação Científica – CNPq – Período 09/2001 a 08/2003

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Oliveira, C.S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S.; "Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers" **Photochem. Photobiol. Sci.**, 2009, 8, 233-240.

2. Ramos, A.P.; Pavani, C.; Iamamoto, Y.; Zaniquelli, M.E.D.; "Porphyrins-phospholipid interaction and *in situ* Langmuir monolayers metallation tailored by surface charge availability", **Langmuir**, Submetido.

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. Pavani, C.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S.; "Porfirinas Catiônicas: relação entre hidrofobicidade, complexação com zinco e indução de apoptose" Em: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2009, Fortaleza- CE.

2. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Oliveira, C.S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S.; "Structure effects in mitochondrial accumulation of porphyrins: Influence in the final photodynamic efficiency" Em: IX Encontro Latino Americano de Fotoquímica e Fotobiologia, 3-6 Novembro de 2008, Cubatão-SP.

3. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Oliveira, C.S.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S.; "Efeito da Estrutura Química nas interações de porfirinas com membranas e eficiência fotodinâmica" Em: VI Congresso da Sociedade Brasileira de Laser e PDT 2008, 24-26 de Outubro de 2008, Jundiaí-SP.

4. Ramos, A.P.; Pavani, C.; Iamamoto, Y.; Zaniquelli, M.E.D.; "Langmuir monolayers and LB films as a tool to understand the interaction between phospholipids and an amphiphilic porphyrin used as a photosensitizer in photodynamic therapy", Em: I Encontro sobre estruturas auto-organizadas em soluções e interfaces, 08-10 de outubro de 2008, São Pedro-SP.

5. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Iamamoto, Y.; Baptista, M.S.; "Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of HeLa

cells via mitochondrial target” Em: 10th Methods and Applications on Fluorescence, 09-12 de Setembro de 2007, Salzburg, Áustria.

6. Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Severino, D.; Baptista, M.S.; Iamamoto, Y.; “Avaliação de Propriedade Fotofísicas de Piridilporfirinas N-alquiladas” Em: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 31 de maio a 03 de junho de 2007, Águas de Lindóia - SP.

7. Satollo, A.; Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Severino, D.; Baptista, M.S.; Iamamoto, Y.; “Avaliação das Propriedade Fotofísicas da 5-mono(pentafluorofenil)-10,15,20-trifenilporfirina substituída com beta-ciclodextrina” Em: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 31 de maio a 03 de junho de 2007, Águas de Lindóia - SP.

8. Pavani, C.; Ribeiro, A.O.; Uchoa, A.F.; Severino, D.; Baptista, M.S.; Iamamoto, Y.; “Propriedades de N-galactopiranosil-piridil-porfirinas catiônicas: Novos sensibilizadores para uso em PDT” Em: II Workshop Terapia fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde, 03-06 de junho de 2007, São Pedro-SP.

9. Satollo, A.; Pavani, C.; Iamamoto, Y.; “Synthesis and characterization of 5-mono(pentafluorophenyl)-10,15,20-trisphenyl- β -Cyclodextrin dyad” Em: 13th Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 03-06 de setembro de 2006, Fortaleza – CE.

10. Pavani, C.; Eberlin, M.N.; Moraes, L.A.B.; Iamamoto, Y.; “Síntese do Brometo de 5,10,15,20-tetrakis(N-tetradecil-4-piridil)porfirina e caracterização por espectrometria de massas” Em: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2005, Poços de Caldas - MG.

11. Fugisawa, F.P.; Pavani, C.; Iamamoto, I.; Serra, O.A.; “Determinação da Atividade Fotodinâmica de pentafluorofenilporfirinas substituídas com beta-ciclodextrina” Em: XIII SIICUSP, 10 e 11 de novembro de 2005, Ribeirão Preto-SP.

12. Maestrin, A.P.J.; Pavani, C.; Neri, C.R.; Iamamoto, Y.; Serra, O.A.; "Photochemistry evaluation of pyridilcarboxichlorins as potential photodynamic agent" Em: 12th Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 08-11 de setembro de 2004, São Carlos-SP.

13. Pavani, C.; Luz, P.P.; Maestrin, A.P.J.; Neri, C.R.; Iamamoto, Y.; Serra, O.A.; "Determinação da atividade fotodinâmica de porfirinas: Avaliação indireta da formação de oxigênio singlete" Em: XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino Americano de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2004, Salvador-BA.

OUTRAS ATIVIDADE ACADÊMICAS

1. Atuação como debatedora no 15º SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – Área: Biológicas, 22 e 23 de novembro de 2007, Ribeirão Preto-SP.

2. Treinamento em: Operação no sistema de Cromatografia Líquida composto por 2 LC-6AD, DGU-20AS, RHEODYNE7725i, CTO-10AS, CBM-20A, SPD-20A, FRC-10A e Software LC-Solution, SINC do Brasil – Instrumentação Científica, Carga Horária 15 horas, 13 de julho de 2007, São Paulo-SP.

3. Participação no workshop: Fotoquímica e fotofísica de materiais, Coordenado por Vera R.L. Constantino e Wilhlem Josef Baader, 31 de maio de 2007, na XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 31 de maio a 03 de junho de 2007, Águas de Lindóia - SP.

4. Assistiu à palestra: Técnica de Apresentação, 15 de agosto de 2006, proferida pelo Prof. Dr. José Carlos Cintra.

5. Participação no Simpósio: A formação pedagógica do professor universitário: novas exigências, novos desafios, promovido pelo

Grupo de Apoio Pedagógico do Campus de Ribeirão Preto, 21 e 22 de agosto de 2006, Ribeirão Preto-SP, Carga horária: 12 horas.

6. Atuação como debatedora no 14º SIICUSP – Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – Área: Biológicas, 13 e 14 de novembro de 2006, Ribeirão Preto-SP.

7. Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino durante o 1º semestre de 2005 na disciplina Química Inorgânica Experimental II, supervisor Prof. Dr. Elia Tfouni, Carga horária: 6 horas semanais.

8. Participação no workshop: Fronteiras e desafios da Química Inorgânica, Coordenado por Stela Maris de Moraes Romanowski, 30 de maio de 2005, na XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2005, Poços de Caldas-MG.

9. Curso: Química Forense, Ministrado pelo Prof. Valter Stefani durante a XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2005, Poços de Caldas-MG, carga horária: 6 horas.

10. Participação no workshop: II International Workshop in Photodynamic Therapy, 26 e 27 de abril de 2004, São Paulo-SP.

11. Curso: Métodos em Fotoquímica, Ministrado pelos Prof. Frank Herbert Quina, José Carlos Netto Ferreira, Antonio Cláudio Tedesco durante a XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30 de maio a 02 de junho de 2004, Salvador-BA, carga horária: 6 horas.