Irwin Alexander Patiño Linares

**Síntese, caracterização estrutural, fotofísica e químico-biológica de novas
clorinas visando aplicação em Terapia Fotodinâmica**

Tese apresentada ao Instituto Química de São Carlos da
universidade de São Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica
Orientador: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela vida e por toda sua infinita força colocada em mim para superar todos os obstáculos que a vida nos põe.

À professora **Dra Janice R. Perussi**, pela confiança e oportunidade concedida, além da dedicação, paciência e atenção durante a orientação deste trabalho.

Ao professor **Dr. Kleber Thiago de Oliveira** pela sua co-orientação na síntese das moléculas estudadas realizadas no seu grupo de pesquisa.

A minha tia, **Stella Linares**, pelos conselhos e seu ânimo de sair adiante como uma pessoa integral.

Aos meus colegas e ex-colegas do laboratório **Thayz, Milene, Larissa, Luiza e Cristian** pelo apoio e convívio diário.

Ao Instituto de Química de São Carlos – **USP** pela oportunidade e à **Capes** pela bolsa de doutorado concedida e ao CEPOF/FAPESP pelo suporte financeiro ao laboratório.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que pode ser aplicada para tratamento de câncer que usa um fotossensibilizador (FS) que na presença de luz e oxigênio molecular gera espécies altamente reativas de oxigênio (EROs) que levam as células tumorais à morte por apoptose ou necrose. Os FSs do tipo clorina apresentam problemas de agregação reduzindo sua eficácia fotodinâmica. O objetivo deste estudo foi sintetizar, caracterizar e testar novas clorinas que prevêm a agregação em meio fisiológico, assim como determinar sua ação fotodinâmica em células tumorais (HEp-2 e HeLa) e não tumorais (Vero). As moléculas **10-a** e **10-b** foram obtidas com um rendimento global de 68% e as moléculas **11-a** e **11-b** com um 64% de rendimento. Foram caracterizadas por RMN ^1H , ^{13}C , UV-Vis e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_0) das clorinas foram comparáveis a uma molécula comercial análoga usada em TFD, a verteporfina (Visudyne[®]). As clorinas sintetizadas apresentaram valores de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) maiores que o Visudyne[®], além de uma baixa fotodegradação. O coeficiente de absorção molar (ϵ) das clorinas **10a-b** e **11a-b** exibiram valores maiores em meio aquoso apresentando uma auto-agregação menor que o Visudyne[®]. O coeficiente de partição (Log P) obtido para a verteporfina (1.61 ± 0.10) foi maior que das clorinas **10a-b** e **11a-b** (1.20 ± 0.04 e 1.40 ± 0.03) respectivamente, evidenciando uma maior lipofilicidade e dificuldade de solubilização em meio aquoso em relação às clorinas. Os valores de Concentração Inibitória Média (IC_{50}) das clorinas **10-a** e **10-b** nas linhagens celulares HEp-2 e HeLa foram menores que os determinados para a verteporfina pelo método de MTT. As análises por microscopia de fluorescência mostraram que as quatro clorinas sintetizadas levam à morte celular predominantemente por apoptose nas duas linhagens tumorais. A acumulação intracelular determinada por microscopia confocal mostrou que as clorinas **10a-b** exibiram uma maior penetração em relação às clorinas **11a-b** através da membrana citoplasmática nas células tumorais, assim como, nas não tumorais. Dessa forma, as clorinas sintetizadas mostraram-se mais fotoestáveis, mais fototóxicas e mais solúveis em meio fisiológico do que o Visudyne[®], vantagens consideráveis para o uso como fotossensibilizadores para TFD.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique for the treatment of cancer that uses a photosensitizer (PS) that in the presence of light and molecular oxygen generates highly reactive oxygen species (ROS) that lead tumor cells to death by apoptosis or necrosis. Chlorine-like PSs exhibit aggregation, reducing its photodynamic efficacy in PDT. Thus, the objective of this study was to synthesize, characterize and test new chlorins sterically-prevented for self-aggregation in physiological medium, as well as determining their photodynamic response in tumor cells (HEp-2 and HeLa) and non-tumor cells (Vero). The chlorins designated **10-a** and **10-b** (yield: 68%), **11-a** and **11-b** (yield: 64%) were characterized by NMR ^1H , ^{13}C , UV-Vis, and high resolution mass spectrometry (HRMS). The singlet oxygen quantum yield (ϕ_0) values of the chlorins were comparable to an analogous commercial molecule used in PDT, verteporfin (Visudyne[®]). The synthesized chlorins shown fluorescence quantum yield values (ϕ_f) higher than Visudyne[®], in addition to low photodegradation. The molar absorption coefficient (ϵ) of chlorins **10a-b** and **11a-b** exhibited higher values in aqueous medium showing less self-aggregation than Visudyne[®]. The partition coefficient (Log P) obtained for verteporfin (1.61 ± 0.10) was higher than that of chlorins **10a-b** and **11a-b** (1.20 ± 0.04 and 1.40 ± 0.03), respectively, indicating a greater lipophilicity and difficulty of solubilization in aqueous medium comparing to chlorins. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of **10-a** and **10-b** chlorins in HEp-2 and HeLa cell lines were lower than those determined for verteporfin by the MTT method. These chlorins were three and two times more potent than Visudyne[®] respectively. Fluorescence microscopy analyzes displayed that the four synthesized chlorins lead to cell death predominantly by apoptosis in the two tumor cells. Intracellular accumulation determined by confocal microscopy showed that chlorinas **10a-b** exhibited a greater penetration with respect to chlorins **11a-b** through the cytoplasmic membrane in tumor cells, as well as in non-tumor cells. Thus, the chlorins synthesized in this study showed to be more phototoxic and more soluble in physiological medium than Visudyne[®], considerable advantages for the use as photosensitizers for PDT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de administração e acumulação do FS no paciente tratado por terapia fotodinâmica (Adaptado)	13
Figura 2 – propagação da luz através do tecido (adaptado)	14
Figura 3 – Processo fotoquímico e fotofísico do FS ilustrado no diagrama de Jablonski modificado para a terapia fotodinâmica (Adaptado)	16
Figura 4 – Mecanismo de morte celular observado após irradiação na célula tumoral (adaptado)	18
Figura 5 – Diagramas de orbitais moleculares para o oxigênio molecular, oxigênio singleto, ânion superóxido e íon peróxido (adaptado).....	21
Figura 6 – representação estrutural da porfirina e seus derivados.....	26
Figura 7 – A) Estrutura de um macrociclo do tipo clorina. B) Espectros de UV/Vis do éster dimetílico da protoporfirina IX (preto) e de uma clorina derivada da mesma (vermelho).....	27
Figura 8 – Alguns fotossensibilizadores comerciais ou em fase de estudos (adaptado).....	28
Figura 9 – Síntese da protoporfirina IX dimetil éster a partir da hematoporfirina.....	31
Figura 10 – Síntese da maleimida1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno	32
Figura 11 – Síntese da maleimida1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno.....	33
Figura 12 – Rota sintética das novas clorinas.....	34
Figura 13 – Mecanismo de reação da maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno	42
Figura 14 – Mecanismo de reação da maleimida1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno	43
Figura 15 – Síntese das clorinas 10-a e 10-b.....	44
Figura 16 – Síntese das clorinas 11-a e 11-b.....	45
Figura 17 – Espectro de UV-Vis da fotodegradação das clorinas 10-a e 11-a utilizando um laser vermelho em 661 nm e potência de 50 mW	47
Figura 18 – Gráfico de IC ₅₀ das clorinas 10-a, 10-b, 11-a, 11-b e da verteporfina testadas nas células HEP-2 após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm ⁻² B) 6 J cm ⁻²	52
Figura 19 – Gráfico de IC ₅₀ das clorinas 10-a, 10-b, 11-a, 11-b e da verteporfina testadas nas células HeLa após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm ⁻² B) 6 J cm ⁻²	54
Figura 20 – Gráfico de IC ₅₀ das clorinas 10-a, 10-b, 11-a, 11-b e da verteporfina testadas nas células Vero após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm ⁻² B) 6 J cm ⁻²	56
Figura 21 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HEP-2 após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 3 J cm ⁻²)	59

Figura 22 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HEP-2 após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 6 J cm ⁻²)	61
Figura 23 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HeLa após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 3 J cm ⁻²)	63
Figura 24 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HeLa após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 6 J cm ⁻²)	65
Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais Vero após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 3 J cm ⁻²)	67
Figura 26 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais Vero após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b na concentração de IC ₅₀ respectivamente, (dose de 6 J cm ⁻²)	69
Figura 27 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral HeLa tratadas com as clorinas: 1) 10-a, 2) 10-b, 3) 11-a e 4) 11-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.	71
Figura 28 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral HEP-2 tratadas com as clorinas: 1) 10-a, 2) 10-b, 3) 11-a e 4) 11-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.	73
Figura 29 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral Vero tratadas com as clorinas: 1) 10-a e 2) 10-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de rendimento quântico de formação de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) e de fluorescência (Φ_f) da verteporfina e clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b.....	46
Tabela 2 – Valores de coeficiente de partição (Log P) das clorinas sintetizadas e da verteporfina utilizando uma mistura de 1-octanol e tampão fosfato de sódio (PBS) .	48
Tabela 3 – Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) das clorinas estudadas e verteporfina em solvente DMSO	49
Tabela 4 – Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) das clorinas estudadas e verteporfina em solvente PBS	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS	Ácido p-toluensulfônico
BE	Brometo de Etídio
BHT	2,6-de-terc-butil-4-metilfenol
CIS	Cruzamento Intersistemas
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAS	<i>First Apoptosis Signal Receptor</i>
FAS-L	<i>First Apoptosis Signal Ligand</i>
FS	Fotossensibilizador
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivados de hematoporfirina
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>
IC ₅₀	Concentração Inibitória media
LA	Laranja de Acridina
LBD	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LED	<i>Light EmittinDiode</i>
Log P	Coeficiente de partição
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NIR	<i>Near-infrared</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
Redox	Reações óxido-redução
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro Fetal Bovino
TDF	Terapia Fotodinâmica
TNF	Fator Indutor de Necrose (<i>Tumor NecrosisFactor</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)	11
1.2 Liberação da luz no tecido	13
1.3 Mecanismo Fotodinâmico	15
1.4 Mecanismos Biológicos de Morte Celular Mediados por EROs	17
1.5 Espécies reativas de Oxigênio (EROs)	19
1.6 Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)	21
1.7 Fotossensibilizadores	23
1.8 Porfirinas e seus derivados	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Obtenção da Protoporfirina IX dimetil éster	31
3.2 Síntese das Maleimidas	32
3.3 Síntese das clorinas	33
3.4 Caracterização dos Fotossensibilizadores	34
3.4.1 Caracterização Estrutural	34
3.5 Caracterização Fotofísica	34
3.5.1 Rendimento Quântico de Fluorescência	34
3.5.2 Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto	35
3.5.3 Coeficiente de partição	36
3.5.4 Fotodegradação	36
3.5.5 Coeficiente de Absorção Molar (ϵ)	37
3.6 Linhagens celulares utilizadas para o estudo Fotodinâmico	37
3.7 Fototoxicidade das novas clorinas	37
3.7.1 Ensaio de Viabilidade e Metabolismo Celular - Método MTT	38
3.8 Morte Celular por Microscopia de Fluorescência	38
3.9 Acumulação Intracelular dos FSs por Microscopia Confocal	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Síntese da Protoporfirina IX dimetil éster	40
4.2 Síntese da maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno	41

4.3	Síntese da maleimida 1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno	42
4.4	Síntese das novas clorinas	43
4.5	Rendimento Quântico de Fluorescência (Φ_f) e de formação de Oxigênio Singlete (Φ_Δ)	45
4.6	Fotodegradação e Coeficiente de Partição (Log P)	46
4.7	Coeficiente de Absorção Molar (ϵ)	49
4.8	Estudos Fototóxicos das Clorinas pelo Método de MTT	50
4.8.1	Células HEp-2.....	50
4.8.2	Células HeLa	53
4.8.3	Células Vero	55
4.9	Mecanismo de Morte Celular por Microscopia de Fluorescência	57
4.9.1	Células HEp-2 irradiadas na dose 3 J cm^{-2}	57
4.9.2	Células HEp-2 irradiadas na dose 6 J cm^{-2}	60
4.9.3	Células HeLa irradiadas na dose 3 J cm^{-2}	62
4.9.4	Células HeLa irradiadas na dose 6 J cm^{-2}	64
4.9.5	Células Vero irradiadas na dose 3 J cm^{-2}	66
4.9.6	Células Vero irradiadas na dose 6 J cm^{-2}	68
4.10	Acumulação Intracelular dos FSs por Microscopia Confocal	70
4.10.1	Células HeLa.....	70
4.10.2	Células HEp-2	72
4.10.3	Células Vero.....	73
5.	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXOS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

O objetivo principal na terapia do câncer é destruir as células cancerosas, preservando as células normais, mas o sucesso do tratamento é comprometido pela toxicidade exibida, uma vez que o quimioterápico não pode discriminar adequadamente entre os dois tipos de células presentes no tecido (Aggarwal *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010; Mion *et al.*, 2017). As estratégias clínicas atuais para o tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e, mais recentemente, imunoterapia e terapia-alvo molecular (Lucky *et al.*, 2015). Estas terapias podem atuar individualmente ou em combinação, aumentando a ação citotóxica nas células cancerosas (Konan *et al.*, 2002; Master *et al.*, 2013).

A *cirurgia* geralmente é a primeira tentativa de estratégia, embora não seja uma opção apropriada se ocorrer metástase. A remoção cirúrgica do tumor também não é um método viável nos casos em que o tumor está localizado em áreas sensíveis, por exemplo, na proximidade da medula espinhal ou perto de outros órgãos vitais.

A *radioterapia* danifica o DNA da célula devido à natureza ionizante da radiação, que pode prevenir a replicação das células tumorais e possivelmente diminuir o tamanho do tumor se for focalizado sobre o tumor (Darzynkiewicz *et al.*, 2009; Master *et al.*, 2013). Por outro lado, a radioterapia frequentemente gera efeitos de longo prazo, incluindo danos nas células vizinhas normais, formação de tecido cicatricial e imunossupressão.

A *quimioterapia* utiliza moléculas citostáticas ou citotóxicas que são utilizadas para destruir as células cancerosas. Estas moléculas inibem a divisão celular das células malignas causando a morte, mas atua do mesmo modo nas células de tecidos saudáveis. Esta terapia apresenta efeitos secundários severos nos pacientes, tais como: mielossupressão, mucosite, alopecia e outros (Ramakrishnan e Gabrilovich, 2011).

A *imunoterapia* funciona permitindo que o sistema imunológico natural do paciente lute contra o câncer ou reduzindo mecanismos de cascata de sinalização inerentes que promovam a proliferação e agressão do câncer, usando vacinas

contra câncer e anticorpos monoclonais direcionados aos receptores de células cancerígenas. No entanto, as células cancerosas são propensas à mutação, levando a uma eficácia limitada de imunoterapias altamente específicas (Vanneman e Dranoff, 2012; Gao *et al.*, 2013).

A *terapia alvo-molecular* inibe genes ou proteínas que são específicas das células do tumor mediante o uso de anticorpos monoclonais (via intravenosa) ou medicamentos orais induzindo apoptose ou autofagia nas células alvo. A eficácia da terapia reside na liberação direta do agente terapêutico no local da doença, minimizando os efeitos colaterais fora do alvo causados aos tecidos normais (Padma, 2015).

Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma abordagem terapêutica bastante promissora, uma vez que não é invasiva e possui uma maior seletividade para as células tumorais em detrimento às células normais (Agostinis *et al.*, 2011; Dabrowski e Arnaut, 2015). Portanto, pode ser utilizada amplamente em doenças oncológicas e não oncológicas (dermatológicas, oftalmológicas, etc) uma vez que atua de forma eficaz e preferencialmente nos tecidos alvos (Agostinis *et al.*, 2011; Dabrowski e Arnaut, 2015). O procedimento fotodinâmico utiliza um agente fotossensibilizante (FS), luz visível para ativar o FS que, em presença de oxigênio, elimina seletivamente agentes patógenos, células ou tecidos prejudiciais através da geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e de radicais livres que têm um forte efeito citotóxico através de reações fotoquímicas (Oleinick *et al.*, 2002; Berlanda *et al.*, 2006).

O tratamento por TFD envolve a administração tópica ou sistêmica de um agente foto-terapêutico (que é intrinsecamente não tóxico) ao paciente. O FS é acumulado principalmente nas células cancerígenas e também, em certa medida, no tecido saudável circundante (Figura 1). A localização intracelular dos FSs nas células abarca diversas organelas, incluindo membranas plasmáticas, retículo endoplasmático, mitocôndrias, lisossomos e complexos de Golgi (Robertson *et al.*, 2009; Skupin-Mrugalska *et al.*, 2014). Após a acumulação de quantidades significativas de FS pela lesão neoplásica, o tumor é irradiado por uma fonte de luz (laser ou diodos emissores de luz - LED) num comprimento de onda adequado excitando eletronicamente o FS e assim, provocando uma série de eventos físicos, químicos e biológicos que gera a morte das células cancerígenas (Nseyo, 1992;

Ethirajan *et al.*, 2011). Este processo é de natureza multifatorial, uma vez que gera a morte direta de células neoplásicas, assim como danos na vascularização do tumor, desencadeamento de uma resposta imune antitumoral e reações inflamatórias localizadas (Dolmans *et al.*, 2003; Juarranz *et al.*, 2008).

Figura 1 – Esquema de administração de um agente terapêutico (FS) no paciente tratado por terapia fotodinâmica que se acumula principalmente nas células neoplásicas seguido de irradiação por uma fonte de luz visível gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que provoca a morte das células cancerígenas. (Adaptado)

Fonte: (Kocki *et al.*, 2017)

1.2 Liberação da luz no tecido

Para que o processo fotodinâmico tenha sucesso, é necessário garantir que a luz irradiada no tecido doente seja suficiente para determinar a eficácia da resposta antitumoral, uma vez que os fótons que entram no tecido podem ser refletidos, dispersados ou absorvidos como é observado na Figura 2 (Plaetzer *et al.*, 2009; Agostinis *et al.*, 2011). A profundidade de penetração e a entrega eficiente de luz são as duas barreiras principais na TFD anticâncer para o tratamento de tecidos profundos, já que depende de outros fatores tais como: energia dos fótons,

coeficiente de absorção molar (ϵ), polarização, coerência, densidade de energia, tempo de iluminação e a fisiologia do tecido (pigmentação e hidratação) (Zhou *et al.*, 2016).

Figura 2 – A propagação da luz através do tecido pode ser por absorção, dispersão, transmissão ou reflexão dependendo do comprimento de onda usado. Em $\lambda < 630$ nm a luz será dispersa pelo tecido e terá uma menor penetração, enquanto que $\lambda > 630$ nm terá uma penetração eficiente apresentado pouca perda de energia. (adaptado)

Fonte: (Dabrowski, 2017)

Os tecidos contêm cromóforos tais como: hemoglobina, mioglobina, melanina e citocromos que apresentam uma forte absorção no espectro visível o que diminui a eficácia da TFD, além da espessura do tecido devido à forte atenuação da luz visível com aumento da profundidade do tecido, levando ao tratamento incompleto e à recaída do tumor. Porém, um FS ideal deve ter um pico de absorção entre 630-800 nm conhecida como “janela terapêutica” para penetrar eficientemente nos tecidos (Plaetzer *et al.*, 2009; Lucky *et al.*, 2015). Deste modo, comprimentos de onda até aproximadamente 800 nm podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e $^1\text{O}_2$, mas acima desse valor ($\lambda > 800$ nm) a energia é insuficiente para iniciar uma reação fotodinâmica devido aos efeitos térmicos causados por transições rápidas

não radiativas e pelo estreito espaço entre os níveis de energia, enquanto que os comprimentos de onda mais curtos ($\lambda < 630$ nm) são os mais espalhados pelos tecidos, e a sua penetração é limitada (Smith *et al.*, 2009; Dabrowski *et al.*, 2016). Portanto, a escolha da fonte de luz deve ser baseada na absorção do FS (excitação de fluorescência e espectro de absorção), tipo da doença (localização, tamanho da lesão, acessibilidade e características do tecido), custo e tamanho do equipamento (Agostinis *et al.*, 2011).

1.3 Mecanismo Fotodinâmico

O FS no seu estado fundamental (S_0) apresenta dois elétrons num orbital molecular de baixa energia, mas quando o FS é irradiado, um elétron é deslocado para um orbital molecular de maior energia conhecido como estado singleto excitado (S_n) de vida curta (Figura 3). Após absorção de fótons, o $^1FS^*$ é relaxado a níveis de energia mais favoráveis dentro do estado singleto excitado. Estes processos são chamados de relaxamento vibracional e/ou conversão interna (dissipação de energia na forma de calor). O tempo de vida da molécula excitada ($^1FS^*$) neste nível de energia é da ordem de 10^{-9} segundos e pode sofrer vários processos distintos antes de voltar ao estado fundamental (Dabrowski *et al.*, 2016). Se o $^1FS^*$ decai ao estado fundamental por emissão da energia absorvida, este processo é chamado de **fluorescência** (Triesscheijn *et al.*, 2006; O'connor *et al.*, 2009). Um segundo processo que pode ocorrer é um cruzamento intersistemas (CIS) sem emissão de energia onde a rotação do seu elétron excitado se inverte para formar um estado tripleto ($^3FS^*$) com um tempo de vida mais longo (10^{-3} s). Por ultimo, a emissão de energia do estado $^3FS^*$ para o estado S_0 provoca o fenômeno da **fosforescência** e raramente os FSs retornam ao seu estado fundamental através deste processo (Kocki *et al.*, 2017).

Existem duas vias fotoquímicas, conhecidas como reações tipo I e tipo II. Na reação tipo I, o FS no estado tripleto excitado ($^3FS^*$) pode interagir com o substrato, tal como a membrana celular ou biomoléculas, transferindo um próton ou um elétron produzindo EROs tais como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$. Na reação tipo II, o 1O_2 é gerado como resultado da transferência de energia do estado tripleto excitado do $^3FS^*$ para o 3O_2 (Yoon *et al.*, 2013).

Figura 3 – Processo fotoquímico e fotofísico do FS ilustrado no diagrama de Jablonski modificado para a terapia fotodinâmica. O FS no seu estado singlete excitado ($^1\text{FS}^*$) pode sofrer um cruzamento intersistemas formando um estado tripleto excitado mais estável ($^3\text{FS}^*$) e depois gerando EROS. (Adaptado)

Fonte: (Dabrowski, 2017)

Estas duas reações podem ocorrer simultaneamente, dependendo do tipo de FS dos seus potenciais de oxidação e da quantidade de oxigênio presente na célula ou tecido (Dabrowski *et al.*, 2012; Krzykawska-Serda *et al.*, 2014). A localização intracelular do FS determina o local do dano celular induzido pelas reações do Tipo I, porque os radicais centrados no oxigênio são espécies não seletivas, reagindo apenas na organela onde são geradas. Por outro lado, o efeito fotodinâmico induzido pelo oxigênio singlete não se restringe a um compartimento celular, uma vez que o $^1\text{O}_2$ pode explorar todo o volume celular e é um oxidante mais seletivo que os radicais livres centrados em oxigênio (Da Silva *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2016).

1.4 Mecanismos Biológicos de Morte Celular Mediados por EROs

Embora a TFD possa induzir muitos eventos de via celular e de sinalização molecular nas células, o objetivo principal é induzir a morte celular por algum mecanismo seja apoptose, necrose ou autofagia (Figura 4). Portanto, alguns fatores importantes tais como: concentração do FS, propriedades físico-químicas, localização intracelular do FS, assim como, a concentração de oxigênio, o comprimento de onda e a intensidade da luz apropriada, bem como as propriedades específicas do tipo de célula podem influenciar no modo e o alcance da morte celular.

Apoptose é um mecanismo irreversível que desempenha um papel predominante na morte de células após a TFD. O mecanismo de apoptose é mediado por uma cascata de eventos que, em última instância, leva à ativação irreversível de caspases e à fragmentação celular (Oleinick *et al.*, 2002; Mroz *et al.*, 2011). Entre os vários indicadores apoptóticos, os sinais mais característicos são as alterações na morfologia celular, como colapso da superfície celular, o encolhimento, a condensação da cromatina, fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos desencadeados tanto pelo fator indutor de apoptose como pelo fator indutor da necrose (TNF – do inglês *Tumor necrosis factor*) (Ouyang *et al.*, 2012).

Existem duas vias centrais para induzir a apoptose, a via extrínseca (receptor da morte) e a via intrínseca (mitocondrial). A *via extrínseca* é desencadeada pela ligação de receptores de proteínas de superfície de membrana (Faz – do inglês *First apoptosis signal receptor*), com o seu ligando extracelular (Fas-L – do inglês *First apoptosis signal ligand*) formando um complexo de morte (Fas/Fas-L) quando ocorrem estímulos de morte. Este complexo de morte recruta proteínas adaptadoras intracelulares (FADD – do inglês *Fas-associated death domain*) e pró-caspase-8, gerando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC – do inglês *Death-inducing signaling complex*). Consequentemente, o complexo protéico ativa sua pró-caspase-8, que procede a desencadear a pró-caspase-3, a penúltima enzima para a execução do processo apoptótico (Elmore, 2007). A *via intrínseca* também leva apoptose, mas sob o controle de pró-enzimas mitocondriais. Nos dois casos, se uma célula é iniciada por estímulos extracelulares ou por sinais intracelulares, as membranas mitocondriais externas tornam-se permeáveis ao *citocromo c* que é

liberado para o citosol. O *citocromo c* recruta proteínas ativadoras de apoptose (Apaf-1) e pro-caspase-9 para formar o apoptossoma, que desencadeia uma sinalização em cascata da caspases 9 e 3, culminando em apoptose (Ouyang *et al.*, 2012).

Figura 4 – Mecanismo de morte celular observado na célula tumoral após irradiação do FS acumulado dentro da célula. (adaptado)

Fonte: (Abrahamse e Hamblin, 2016)

A **Necrose** possui características morfológicas distintas e é acompanhada por uma rápida permeabilização da membrana plasmática, assim como um dano irreversível no DNA. Ademais, está associada a uma diminuição significativa nos níveis de ATP resultante do desequilíbrio de íons devido à despolarização da membrana mitocondrial (Buytaert *et al.*, 2007). O volume da célula é aumentado, a

integridade da membrana é perdida e, conseqüentemente, observa-se o influxo passivo de Ca^{2+} , Na^+ e água para o interior celular (Nakagawa *et al.*, 2005). Entre as condições mais comuns de ativação da necrose estão a isquemia e a hipóxia, que podem ser simuladas *in vitro* por privação de oxigênio, glicose e outros nutrientes. Estas condições hipóxicas e isquêmicas ocorrem durante o crescimento tumoral *in vivo* devido a uma vascularização inadequada. A principal causa de necrose nessas condições é, obviamente, a privação de energia, e para sobreviver a esse estresse, é necessário aumentar a produção de energia ou diminuir o consumo de energia (Galluzzi *et al.*, 2014). A TFD realizada a doses baixas de luz tende a desencadear a apoptose, enquanto a necrose torna-se o mecanismo predominante de dano celular em altas doses de luz. Além disso, as vias de sinalização, como receptores de morte, cascatas de quinase e mitocôndrias, também participam de apoptose e necrose, e modulando essas vias, é possível alternar entre apoptose e necrose (Castano *et al.*, 2006).

A **Autofagia** é um processo celular catabólico que permite que a célula mantenha um equilíbrio entre síntese, degradação e reciclagem de produtos celulares. Existe uma variedade de processos autofágicos, todos os quais envolvem a degradação lipossômica das organelas e proteínas celulares (Reiners *et al.*, 2010). Este processo celular envolve a formação de uma vesícula a partir dos autofagossomos que separa seu conteúdo do resto do citoplasma. Esta vesícula é transportada e fundida com lisossomos gerando uma estrutura conhecida como autofagolisossomo, cujos conteúdos são degradados por hidrolases lisossômicas (Buytaert *et al.*, 2006). Este processo provoca a liberação de aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos no citosol (Wirawan *et al.*, 2012).

1.5 Espécies reativas de Oxigênio (EROs)

Há mais de 2,5 bilhões de anos se apresentou um aumento da concentração de oxigênio molecular (O_2), causada pela fotossíntese oxigenada de cianobactérias, permitindo a evolução da respiração aeróbica na terra, levando ao desenvolvimento de organismos eucarióticos complexos (Lyons *et al.*, 2014). Para todas as espécies aeróbicas atualmente vivas, o oxigênio molecular é uma molécula central na respiração celular. Porém, certos derivados de oxigênio são altamente tóxicos para

as células (Lesser, 2006). Neste contexto, as EROs são radicais, íons ou moléculas que possuem um único elétron não emparelhado na sua camada externa de elétrons proporcionando-lhes uma alta reatividade. O ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), oxigênio singleto (1O_2), óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), radicais orgânicos ($RO^{\cdot}$), ozônio (O_3) entre outros, fazem parte deste grupo de EROs (Shi *et al.*, 2012). Esta classe de moléculas associada ao estresse oxidativo é considerada prejudicial para a célula, uma vez que pode danificar o DNA celular, oxidar ácidos graxos em lipídios e aminoácidos em proteínas e desativar certas enzimas e seus cofatores (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, a formação excessiva de EROs está ligada a muitas patologias, incluindo distúrbios relacionados à idade, câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurodegenerativas, como doenças de Parkinson e Alzheimer (Dickinson e Chang, 2011; Niedzielska *et al.*, 2016). Por outro lado, é mencionado que estas moléculas são importantes como segundo mensageiro para a expressão de vários fatores de transcrição e outras moléculas de transdução de sinal, como fator de choque térmico e fator nuclear. Eles também participam da regulação da adesão celular, amplificação mediada por redox da resposta imune e morte celular programada (Winterbourn, 2008).

O oxigênio molecular apresenta uma estrutura eletrônica com dois elétrons desemparelhados, em orbitais π^* antiligantes com spins paralelos (Figura 5). Esta configuração faz o O_2 exibir uma baixa reatividade, apesar da sua poderosa força oxidante. A maioria das moléculas orgânicas não radicais é diamagnética com elétrons emparelhados e de spins opostos (Halliwell, 2006). Uma restrição de spin é aplicada na molécula de oxigênio de acordo com as regras de seleção dipolo-elétrico para participar em reações de óxido-redução (redox), com átomos e moléculas aceitando um par de elétrons do agente redutor que tem o mesmo spin (paramagnéticas) ocupando os orbitais π^* antiligantes do oxigênio (Krupenie, 1972; Long e Kearns, 1973). Esta restrição faz com que o oxigênio molecular possa reagir rapidamente com outros radicais por transferência de um único elétron. A redução de um elétron para o oxigênio resulta na formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este radical a sua vez, é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é uma molécula de camada fechada (Tong *et al.*, 2015). A redução do peróxido de hidrogênio, por sua vez, gera a formação do radical $OH^{\cdot}$ que sofre redução para produzir água (ou hidróxido OH^-) (Figura 5).

Figura 5 – Diagramas de orbitais moleculares para o oxigênio molecular, oxigênio singlete, ânion superóxido e íon peróxido. (Adaptado)

Fonte: (Krumova e Cosa, 2016)

As EROs podem ser produzidas em uma ampla gama de processos bioquímicos e fisiológicos e vários tipos de enzimas estão implicadas na geração destas espécies. Por exemplo, a família NADPH oxidases trans-membranas são as principais enzimas na geração do íon superóxido gerado mediante a transferência de elétrons do NADPH intracelular através da membrana acoplando-os ao oxigênio molecular, que a sua vez, este radical é transformado em H₂O₂ pela enzima peróxido dismutase mantendo os níveis enzimáticos intracelulares de H₂O₂ estáveis, assim como, as mitocôndrias (Nathan e Cunningham-Bussel, 2013). Os domínios citosólicos de NOX transferem um elétron de NADPH (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) para um cofator FAD (do inglês, *Flavin adenine dinucleotide*). A partir daí, o elétron é passado para um grupo heme, que o doa para O₂ no lado extracelular da membrana, gerando O₂⁻. Dependendo da NADPH oxidase específica expressa em diferentes células, elas podem desencadear diferentes transformações celulares com resultados biológicos muito diferentes. A família de enzimas NADPH oxidase ilustra a especificidade na geração de EROs e seu impacto na sinalização celular normal e na homeostase (Nathan e Cunningham-Bussel, 2013).

1.6 Oxigênio singlete (¹O₂)

Muitos processos bioquímicos e fotoquímicos geram ¹O₂ *in vivo*. Por outro lado, outras espécies também são produzidas além de ¹O₂ no chamado efeito

fotodinâmico que envolve o efeito simultâneo de oxigênio, um FS e luz visível em um alvo biológico, mas acredita-se que o $^1\text{O}_2$ é a única espécie deste processo fotoquímico (Ishii, 2012). No entanto, considerando a complexidade dos sistemas biológicos e a grande variedade de espécies ativas geradas pela fotoquímica é difícil avaliar claramente o papel de cada espécie nos efeitos biológicos resultantes.

O oxigênio singlete pode ser produzido por reação química, descarga de fase gasosa ou por uma reação de fotossensibilização, sendo este último método o mais comum (Napartovich *et al.*, 2001; Juzenas e Moan, 2006; Tian *et al.*, 2012). No entanto, a técnica mais usada para determinar o $^1\text{O}_2$ é a luminescência no infravermelho próximo (NIR – do inglês *Near-infrared*), mediante a detecção da fosforescência de uma molécula fotossensível a 1270 nm excitada num comprimento de onda adequado (usualmente na região UV visível) (Boso *et al.*, 2016). Isto permite atribuir uma constante de decaimento do $^1\text{O}_2$ (k_Δ) ou seu parâmetro recíproco, o tempo de vida útil $^1\text{O}_2$ (τ_Δ), em diferentes meios, mostrando que a cinética de decaimento do $^1\text{O}_2$ é dependente do ambiente onde está localizado (Kraljic e Sharpatyi, 1978; Sivery *et al.*, 2013). O tempo de vida média do $^1\text{O}_2$ varia de 10-100 μs em diferentes solventes orgânicos, mas esse tempo decai no meio aquoso até aproximadamente 2 μs uma vez que a energia do estado excitado do $^1\text{O}_2$ é similar à energia de alongamento da ligação O-H da molécula de água. Portanto, a energia do $^1\text{O}_2$ é dissipada como calor de estiramento e movimentos vibracionais das moléculas de água (Macdonald e Dougherty, 2001).

Outros métodos para determinar $^1\text{O}_2$ são a partir da foto-oxidação de moléculas orgânicas chamados de sequestradores químicos que reagem rapidamente com o $^1\text{O}_2$ formado após irradiação sem nenhuma reação secundária. Os compostos mais utilizados são: 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), antracenos, tetraceno, entre outros. Esta reação é monitorada pela curva de decaimento por espectrofotometria de absorção. Por outro lado, estes métodos fotoquímicos são mais fáceis de realizar, uma vez que não precisa de instrumentos robustos e caros para o seu uso (Spiller *et al.*, 1998).

1.7 Fotossensibilizadores

Existem requisitos importantes para que um composto químico seja utilizado como FS para TFD. Um dos requisitos importantes é sua pureza e viabilidade sintética. Além disso, o FS deve ser solúvel em meio fisiológico e facilmente distribuído no corpo. Não deve apresentar toxicidade ou ser mutagênico no organismo humano sem ativação da luz; portanto, deve ser inerte até a ativação por luz. Os FSs devem se acumular seletivamente no tecido tumoral e devem ser caracterizados pela diferenciação do tecido saudável, de modo que a terapia só atue nas células patologicamente alteradas. Ademais, os FSs não devem ser tóxicos para as regiões não irradiadas (Dabrowski e Arnaut, 2015). Os FSs devem ser ativados pela luz em um comprimento de onda adequado que penetre mais profundamente no tecido e gere eficazmente espécies reativas de oxigênio (especialmente $^1\text{O}_2$). Portanto, a geração de reações tipo II através da ativação do FS é muito importante para o sucesso clínico, uma vez que se teria uma morte celular programada por apoptose e não por necrose que gera um processo inflamatório no paciente (Allison e Sibata, 2010; Ethirajan *et al.*, 2011). O FS ideal não induz a dor durante e após a terapia e pode ser utilizado em cuidados ambulatoriais. Geralmente, clínicos e químicos têm visões diferentes sobre o FS a ser usado. Os químicos colocam mais ênfase sobre um alto coeficiente de extinção e um alto rendimento quântico de oxigênio singleto, enquanto os clínicos enfatizam na baixa toxicidade e alta seletividade (Huang, 2005; Kocki *et al.*, 2017).

A maioria dos FSs utilizados na TFD são moléculas tetrapirrólicas cujas propriedades químicas e farmacocinéticas tem sido estudadas desde o início do século XX (Abrahamse e Hamblin, 2016). Este tipo de composto exibe uma grande capacidade de acumulação dentro das células cancerígenas o que promove um importante interesse no desenvolvimento de FSs no âmbito clínico e pré-clínico (Osterloh e Vicente, 2002; O'connor *et al.*, 2009). Por outro lado, estes compostos tetrapirrólicos estão presentes, por exemplo, em uma grande variedade de sistemas biológicos apresentando importância vital nos processos energéticos de fotossíntese e respiração celular de muitos organismos vivos (De Oliveira *et al.*, 2014).

A escolha do FS para o tratamento de uma doença neoplásica específica é considerada crítica, uma vez que a natureza do composto utilizado é essencial em

termos de localização, distribuição no corpo e eficácia terapêutica (Dabrowski e Arnaut, 2015). FSs hidrofílicos são capazes de se ligar a proteínas plasmáticas e devido a sua baixa capacidade de penetrar a membrana plasmática, estes são acumulados no espaço intersticial e no tecido vascular do tumor (Nyman e Hynninen, 2004; Dabrowski *et al.*, 2016). Quando a molécula fotossensível liga-se à albumina presente no microambiente do tumor e é produzido EROs, gera um efeito vascular resultando na eliminação do tumor (Ashur *et al.*, 2009). Por sua vez, os FSs hidrofóbicos mostram uma afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LBD) e sua internalização é mediada por endocitose (Osterloh e Vicente, 2002). Uma vez dentro da célula, o FS é acumulado nas organelas celulares (mitocôndria, lisossomos, retículo endoplasmático e complexo de golgi) (Castano *et al.*, 2004; Dabrowski, 2017). No entanto, estas moléculas se caracterizam por apresentar agregação em meio aquoso e seu uso é fortemente limitado após injeção intravenosa (Dabrowski *et al.*, 2016). Portanto, a síntese de FSs com caráter anfifílico é de grande importância, uma vez que permitiria uma melhor solubilidade em meio fisiológico e uma rápida acumulação na célula tumoral (Abels, 2004).

Os primeiros agentes fototerapêuticos usados na TFD foram misturas de monômeros, dímeros e oligômeros de hematoporfirinas (Hp), que depois mediante processos de purificação de derivados de hematoporfirinas (HpD) deram origem ao Photofrin[®] (Dougherty, 1983; Triesscheijn *et al.*, 2006). Estes compostos são eficientes no tratamento de tumores tais como pulmão, esôfago, bexiga e cerviz uterina, assim como de doenças não malignas. Embora sejam muito utilizados clinicamente, estes compostos apresentam várias desvantagens como sua pobre pureza química, assim como sua lenta eliminação do organismo, sendo que o paciente pode apresentar reações de fotossensibilidade durante 6 a 10 semanas após tratamento, tendo que evitar a exposição à luz solar ou fontes luminosas artificiais durante este período de tempo, baixos valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e comprimentos de onda curtos para obter uma melhor penetração no tecido (Bellnier *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2013).

Com o intuito de desenvolver compostos com comprimentos de onda de maior absorção ($\lambda > 650$ nm) para uma maior penetração no tecido, surgiu a necessidade de melhorar as propriedades físico-químicas dos primeiros FSs que levou conseqüentemente, a um efeito fotodinâmico mais profundo e mais rápido no

tecido, além de uma eliminação mais rápida do organismo (farmacocinética mais favorável). Esta geração é constituída de moléculas quimicamente puras com valores de absorvidade molar (ϵ) elevados comparados com os FSs de primeira geração que exigiam altas concentrações do FS e luz para erradicar o tumor (O'Connor *et al.*, 2009). O tempo de meia vida dessas moléculas é curto e a acumulação nos tecidos é seletiva e rápida (cerca de 1 a 6 h após a aplicação sistêmica). A estrutura básica destes compostos levou a novos planejamentos sintéticos de moléculas mais solúveis em meio fisiológico evitando a agregação, dentre de outras características favoráveis (Yoon *et al.*, 2013).

1.8 Porfirinas e seus derivados

As porfirinas são uma classe de tetrapirróis essenciais para a atividade biológica de todos os organismos vivos. Estas moléculas possuem um macrociclo heterocíclico altamente conjugado e também podem conter um átomo metálico central, como ferro (hemoglobina e mioglobina) ou magnésio (clorofila) (Schee, 2006; Pavlov, 2007). Além disso, são constituídos por quatro anéis de pirrol unidos por pontes *meso*-metínicas (=CH-) que apresentam hibridação sp^2 e bandas de absorção na região do visível. Este macrociclo porfirínico exibe um sistema π de 22 elétrons dos quais 18 elétrons estão deslocalizados contribuindo à aromaticidade da molécula e obedecendo a regra de Huckel ($4n+2$) (Ethirajan *et al.*, 2011; Kempa *et al.*, 2015). Por outro lado, a redução de duplas ligações nas unidades pirrólicas deriva na formação de outros compostos como clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas, mostrando propriedades físico-químicas relevantes na TFD. As clorinas exibem um anel pirrólico reduzido, enquanto as bacterioclorinas e isobacterioclorinas apresentam duas unidades reduzidas (Figura 6) (Galezowski e Gryko, 2007; De Oliveira *et al.*, 2014).

Figura 6 – Representação estrutural da porfirina e seus derivados

Fonte: Autoria própria

As **clorinas** são moléculas de alta abundância e de importância na natureza, presentes na maioria das plantas que fazem fotossíntese (clorofila). A extensa conjugação das duplas ligações nos derivados de clorina permite que estes compostos apresentem um grande número de propriedades fotofísicas e eletrônicas favoráveis, provando a capacidade da natureza de desenhar e sintetizar moléculas ideais para a evolução da vida (Bjorn *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2014). Em comparação com as porfirinas, as clorinas apresentam um maior interesse na TFD devido as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, uma vez que exibe uma forte absorbância na região vermelha do visível compreendida entre 650-690 nm denominadas banda Q, permitindo uma maior penetração no tecido tumoral. Ademais, apresenta uma banda de absorção forte em torno de 400 nm (região do azul), denominada banda Soret (Figura 7B). Além disso, as clorinas mostram maiores coeficientes de absortividade molar, assim como uma baixa toxicidade (De Assis *et al.*, 2013). Por último, as moléculas que apresentam uma redução em um dos anéis pirrólicos na posição β (Figura 7A), em especial, substituídas nas posições β -pirrólicas são estáveis, o que é essencial para aplicação em TFD (Juzeniene e Moan, 2007).

Figura 7 – A) Estrutura de uma clorina derivada da Pp IX dimetil éster. **B)** Espectros de UV/Vis do éster dimetílico da protoporfirina IX (preto) e de uma clorina derivada da mesma (vermelho).

Fonte: Dos Santos, F. A. B., 2012, p. 37. (Adaptado)

A obtenção deste tipo de compostos pode ser obtida a partir de três metodologias diferentes tais como: síntese total, modificações estruturais de porfirinas e clorinas de origem natural. Vários FSs do tipo clorina já foram desenvolvidos sendo alguns deles aprovados para uso clínico como o Foscan[®] e outros em fase de estudos (Figura 8). No caso da clorina MACE (do inglês, *mono-N-aspartyl chlorine e6*) há estudos que comprovam sua superioridade em tratamentos *in vitro* e *in vivo* comparado com o Photofrin[®] que é constituído por uma mistura de dímeros e oligômeros da hematoporfirina (Hp) (O'Connor *et al.*, 2009). Outro exemplo de clorina aprovada para uso em TFD em oftalmologia é o Visudyne[®], um FS bastante eficiente em tratamentos da forma úmida da degeneração macular relacionada à idade e neovascularização coroidal secundária devido à miopia patológica, assim como em pacientes com suspeita de histoplasiose ocular (Karim e Adelman, 2013; Mak e Wong, 2013).

Figura 8 – Alguns fotossensibilizadores comerciais ou em fase de estudos (adaptado).

Fonte: Dos Santos, F. A. B., 2012, p. 58.

Nos últimos anos, a síntese de novas clorinas a partir da protoporfirina IX reagindo com diferentes substituintes de maleimidas mediante uma reação de Diels-Alder trouxe um grande aporte para a química de derivados de porfirinas para melhorar os problemas de agregação e estabilidade química que apresentam estas moléculas ao formar um aduto-*endo* prevenindo completamente a agregação das clorinas, além de bons rendimentos quânticos de oxigênio singleto (Uchoa *et al.*, 2011; De Assis *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2013). Deve-se destacar, que nosso colaborador, Prof. Dr. Kleber T. de Oliveira foi uns dos pioneiros na síntese desse novo tipo de Clorina.

Assim, a relevância científica do projeto consiste na síntese de novos FSs derivados de clorina que possuam boa seletividade em meios fisiológicos e uma relativa anfifilicidade com potencial atividade na terapia fotodinâmica contra o câncer melhorando sua estabilidade química resultando em bom rendimento quântico de formação de oxigênio singleto que provoca a morte celular por mecanismo apoptótico ou necrótico para as células tumorais com estrutura especial do “tipo L” utilizando substituintes maleimídicos que confere uma estrutural diferente das clorinas comuns, ou seja, ausência de agregação em meio fisiológico.

2. OBJETIVOS

Síntese, caracterização estrutural e fotofísica de novos derivados de clorina que possuam boa solubilidade em meios fisiológicos e uma relativa anfifilicidade adicionando grupos funcionais estratégicos maleimídicos avaliando sua ação fototoxicidade de cada uma delas em diferentes linhagens celulares, bem como o mecanismo de morte celular, localização e acumulação intracelular.

2.1 Objetivos específicos

1. Sintetizar uma série de novas clorinas a partir da protoporfirina IX e diferentes substituintes maleimídicos mediante a reação de Diels-Alder.
2. Caracterizar as propriedades estruturais das clorinas sintetizadas utilizando as técnicas de RMN ^1H e ^{13}C , UV-Vis e MS de alta resolução.
3. Determinar as propriedades fotoquímicas: fotoestabilidade, rendimento quântico e rendimento quântico de fluorescência das diferentes clorinas sintetizadas.
4. Determinar a citotoxicidade, fototoxicidade, mecanismos de morte celular, localização e acumulação intracelular das clorinas sintetizadas em diferentes linhagens celulares tumorais.
5. Comparar as propriedades físico-químicas das clorinas sintetizadas às do Visudyne[®], nome comercial da verteporfina, uma vez que apresenta uma estrutura análoga às clorinas derivadas da protoporfirina IX.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção da Protoporfirina IX dimetil éster

A primeira etapa realizada para a síntese de novas clorinas com conformação tipo L, consistiu na obtenção da protoporfirina IX dimetil éster (PpIX) a partir da hematoporfirina (Hp) mediante reações de eliminação e esterificação conforme descrito na Figura 9 (Jackson *et al.*, 1987; Dos Santos *et al.*, 2013). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 2,0 g de hematoporfirina (3,34 mmol), um litro (1000 mL) de clorobenzeno (PhCl), além de 5 g de ácido p-toluensulfônico (APTS) (30 mmol) em refluxo durante 3 h a 130°C em atmosfera de nitrogênio (N₂). Após disso, o PhCl foi evaporado sob pressão reduzida e adicionado à reação 670 ml de uma solução metanólica ácida (H₂SO₄ 5% (v/v)) durante 12 h com proteção da luz. Em seguida, a reação foi esfriada e neutralizada com hidróxido de amônia (NH₄OH). O produto da reação foi extraído com diclorometano (CH₂Cl₂) (4 x 100 mL) e a fase orgânica lavada com sulfato de sódio (Na₂SO₄). A PpIX dimetil éster foi obtida após evaporação do solvente e posterior cristalização com uma mistura CHCl₃:MeOH (1:3).

Figura 9 – Síntese da protoporfirina IX dimetil éster a partir da hematoporfirina

Fonte: Autoria própria.

3.2 Síntese das Maleimidas

A síntese da maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno foi realizada de acordo as metodologias apresentadas na literatura (Heath *et al.*, 2008; Gramlich *et al.*, 2010; Engel e Kickelbick, 2013). Num balão de 100 ml foram adicionados 10 g de anidrido maleico (102 mmol), 7,5 ml de furano (103,1 mmol) e 50 ml de tolueno seco em refluxo durante 24 h. O produto intermediário **3** foi filtrado e lavado com dimetileter (Figura 10). Em seguida, 5 g do composto **3** (30,1 mmol) foi dissolvido em 15 ml de metanol anidro sob agitação. Após estabilizar o processo de agitação, foi adicionado 1,84 g de etalonamina (30,12 mmol) a 0°C e deixado por 24 h em refluxo. Ao final da reação, o metanol foi destilado sob pressão reduzida e o composto **4** foi recristalizado com dietil eter (-20°C). A hidroxietil maleimida **5** foi obtida a partir de uma reação retro Diel-Alders do intermediário **4** (2,30 g, 10,99 mmol) em 30 ml de tolueno anidro durante 7 h em agitação e refluxo.

Figura 10 – Síntese da maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno

Fonte: Autoria própria

A segunda maleimida sintetizada obteve-se partindo dos precursores: ácido maleico **1** (500 mg) e quantidades equimolares de 3-fenilpropilamina dissolvido em 10 ml de clorofórmio (CHCl_3) durante 3 h sob agitação. O composto intermediário ácido (N-fenilpropilmaleico) **6** foi filtrado e lavado lentamente com água (Figura 11). Posteriormente foi deixado em refluxo com uma mistura de anidrido acético/acetato

de sódio (10 ml) durante 4 h fornecendo o produto esperado 1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno **7** (Sortino *et al.*, 2008; Sortino *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015).

Figura 11 – Síntese da maleimida 1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno

Fonte: Autoria própria.

3.3 Síntese das clorinas

A síntese das clorinas foi realizada a partir da Pp IX dimetil éster (dieno) e a respectiva maleimida (dienófilo). Em um tubo de vidro selado (sistema Sealed tube Aldrich®) foram adicionados 60 mg (0,1 mmol) do composto **9**, 5 ml de tolueno seco e 282 mg (2 mmol) da maleimida sob atmosfera inerte e agitação durante 24 h a 125°C sob a proteção da luz. Os produtos da reação foram purificados por cromatografia de coluna e por placas preparativas de sílica gel usando uma mistura de solventes para a sua separação (Figura 12). Para as clorinas **10-a** e **10-b**, foram utilizados uma mistura de cloroformio, acetato de etila e metanol numa proporção de 5:4:1 para a sua separação, enquanto para as clorinas **11-a** e **11-b** foram usados uma mistura de hexano, acetato de etila e diclorometano numa proporção de 6:2:2. Finalmente, todas as clorinas sintetizadas foram recristalizadas em uma mistura de hexano:acetato de etila.

Figura 12 – Rota sintética das novas clorinas derivadas da protoporfirina IX dimetil ester.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Caracterização dos Fotossensibilizadores

3.4.1 Caracterização Estrutural

As novas clorinas foram purificadas por métodos convencionais como colunas cromatográficas de sílica gel, placas preparativas de sílica e alumina. Para caracterização estrutural foram utilizadas técnicas de espectroscopia de absorção no UV-Vis (HITACHI U-2800), HRMS (ESI-LTQ orbitrapvelos), RMN de ¹H e ¹³C (Bruker avance, 400 MHz).

3.5 Caracterização Fotofísica

3.5.1 Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foi determinado para todas as clorinas sintetizadas assim como para o padrão de referência (verteporfina– Sigma-Aldrich) a partir da equação 1 (Fery-Forgues, 1999).

$$\Phi_f = \Phi_f^p \frac{F_a}{F_p} \frac{Abs_p}{Abs_a} \frac{\eta_a^2}{\eta_p^2} \quad (1)$$

onde F_a e F_p são as integrais da área sob a curva de emissão de fluorescência da amostra e do padrão. Abs_p e Abs_a são os valores de absorbância e η_a e η_p são os valores do índice de refração da amostra e padrão, respectivamente. O padrão de referencia usado foi a Rodamina B solubilizada em etanol ($\phi_f = 0,65$) (Moltali *et al.*, 2006). Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de fluorescência (HITACHI F-4500) no comprimento de onda de excitação (510 nm) e em duplicata.

3.5.2 Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto

O rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (Φ_Δ) foi determinado a partir da intensidade de decaimento de fosforescência a 1270 nm (Wilkinson *et al.*, 1995). Os dados foram registrados com um fluorômetro NIR resolvido em tempo (Edinburgh Analytical Instruments) no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. O fluorímetro NIR foi equipado com um Nd: YAG LASER (Quantel) e um oscilador de parâmetro óptico do sistema (OPO) que permite escolher o comprimento de onda desejado onde as amostras foram excitadas em 420 nm (pulso de 5 ns). A luz emitida foi passada através de silício, um filtro de interferência e um monocromador antes da detecção com um fotomultiplicador NIR (HamamatsuCo. R5509). A vida do oxigênio singleto foi determinada pela aplicação de ajustes exponenciais de primeira ordem para a curva de decaimento de fosforescência. Os valores de Φ_Δ foram obtidos mediante a equação 2 e usando a verteporfina como referência ($\Phi_\Delta = 0,77$) (Redmond e Gamlin, 1999). Este procedimento foi realizado em triplicata.

$$\Phi_\Delta = \frac{Abs_{Std}}{Abs_{FS}} \frac{I_{FS}}{I_{Std}} \frac{\tau_{Std}}{\tau_{FS}} \Phi_\Delta^{Std} \quad (2)$$

onde Abs_{Std} e Abs_{FS} são os valores de absorbância do padrão e do FS respectivamente. I_{FS} e I_{Std} são as intensidades máximas de fosforescência da curva de decaimento para o FS e verteporfina. τ_{Std} e τ_{FS} são os tempo de vida do oxigênio singleto do padrão e FS, respectivamente. As soluções de clorina e verteporfina foram solubilizadas em DMSO.

3.5.3 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição ($\log P$) é um parâmetro bastante útil para estimar a afinidade relativa de um dado composto por uma fase lipofílica, como a membrana celular e uma fase aquosa. Pode-se utilizar uma mistura bifásica 1-octanol/água ou 1-octanol/PBS (solução salina tamponada de fosfato) para mimetizar a interfase membrana/água (Engelmann *et al.*, 2007). Com o objetivo de determinar a hidrofiliicidade das clorinas e da verteporfina, foi preparado uma solução de uma concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ do FS e verteporfina em 1-octanol se obtendo um espectro de absorção inicial. Em seguida, adicionou-se 3 mL da solução do FS e 3 mL de PBS e colocado em agitação vigorosamente durante 1 h. Após o tempo de agitação, a mistura das soluções foi centrifugada durante 10 min a 3000 rotações por minuto (RPM) e deixada por 2 h para que ocorresse o processo de partição. Finalmente, uma quantidade de FS foi extraída gerando um segundo espectro de absorção e assim poder calcular o $\log P$ a partir de equação 3.

$$\log P = \log \frac{(A_{\lambda d})}{(A_{\lambda o} - A_{\lambda d})} \quad (3)$$

onde $A_{\lambda o}$ é a absorbância da solução antes da partição e $A_{\lambda d}$ é o valor da absorbância depois da partição. O monitoramento da absorbância foi realizado seguindo a fase orgânica uma vez que a solubilidade dos compostos é limitada na fase aquosa. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5.4 Fotodegradação

A fotoestabilidade dos FSs foi avaliada em uma solução de diclorometano (CH_2Cl_2) uma vez que o FS foi solúvel neste solvente. A fotodegradação foi monitorada através do espectro de absorção no intervalo de comprimento de onda de 300-800 nm. Os FSs em solução de CH_2Cl_2 foram irradiados em intervalos de três segundos com um laser (FTC 500, OPTO, no modo PDT/iPDT) de intensidade 50 mW cm^{-2} durante 10 minutos (Dos Santos *et al.*, 2013).

3.5.5 Coeficiente de Absorção Molar (ϵ)

O coeficiente de absorção molar foi determinado para cada clorina nos comprimentos de onda 670 e 672 nm (banda Q) em DMSO e PBS com a ajuda do software OriginPro8. Foram obtidos os valores de absorbância a diferentes concentrações de clorina preparadas a partir de uma concentração estoque de 1 mmol L^{-1} .

3.6 Linhagens celulares utilizadas para o estudo Fotodinâmico

Nos ensaios citotóxicos foram utilizadas as linhagens de carcinoma, HEP- 2 (ATCC CCL-23) que foi estabelecida originalmente de carcinoma epidermóide de laringe humana, mas posteriormente verificou-se que era derivada de contaminação com a linhagem HeLa. Empregou-se também células de carcinoma de colo uterino HeLa (ATCC CCL-2), além de células epiteliais de rim de macaco verde africano VERO (ATCC CCL-81). Essas linhagens foram cultivadas aderidas em garrafas de polipropileno, em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's e Meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico penicilina $10\,000\text{ U.I. mL}^{-1}$ e estreptomicina 10 mg mL^{-1} . As células foram mantidas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 95% de ar e 5% de CO_2 gasoso. As manipulações celulares foram realizadas em ambiente previamente esterilizado com radiação ultravioleta, numa capela de fluxo laminar, com materiais estéreis.

3.7 Fototoxicidade das novas clorinas

Os experimentos fototóxicos foram realizados em placas de cultura de 96 poços contendo uma concentração de 5×10^4 células mL^{-1} em meio de cultura, incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 gasoso. Após 24 h, foi removido o meio de cultura através de aspiração e a monocamada de células lavada com PBS. As células foram incubadas com diferentes faixas de concentração de FSs por até 2 horas. Após esse período de incubação, os FSs foram retirados lavando-se novamente as células com PBS. Em seguida adicionou-se meio de cultura e as placas foram irradiadas com um Biotable de 660 nm e uma irradiância de $27,6\text{ mW cm}^{-2}$ em diferentes intervalos de

tempo. Foi realizado também o controle para verificar se ocorre a morte celular somente com o FS, ou seja, sem a irradiação. Após a irradiação as células foram mantidas na estufa de cultura por 24 e 48 horas.

3.7.1 Ensaio de Viabilidade e Metabolismo Celular - Método MTT

Após o período de recuperação de 24 ou 48 h, as células foram tratadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (Merlin *et al.*, 1992). Este método de contagem de células baseia-se na redução do MTT, um composto amarelo que é reduzido a um produto violeta chamado formazam que absorve em 570 nm. A redução é realizada pelas enzimas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células vivas. Após três horas de incubação em meio com MTT, este foi retirado, tendo-se o cuidado para não danificar os cristais de formazam formados. Adicionou-se 100 µL de álcool etílico e 100 µL de uma mistura de PBS com álcool isopropílico na proporção de 1:1. A absorbância proveniente da solução resultante de cada poço da placa foi determinada em leitor de placas (espectrofotômetro Biotek-Synergy HT) com filtro em 570 nm. Para se obter o valor de IC₅₀, que representa a concentração de FS capaz de fotoinativar 50% da população de células, foi utilizado o programa GraphPrism 6.

3.8 Morte Celular por Microscopia de Fluorescência

O mecanismo de morte celular (apoptose ou necrose) induzido pelo processo fotodinâmico foi avaliado por microscopia de fluorescência. Foram utilizados dois marcadores, brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). As células viáveis são marcadas pelo laranja de acridina e aparecem verdes e com estruturas organizadas. As células apoptóticas são marcadas pelos dois fluoróforos e aparecem laranjas ou verdes com cromatina condensada ou fragmentada. As células necróticas aparecem similares às vivas, exceto pela cor vermelha (Smith *et al.*, 2012). Foi colocada uma suspensão de 5×10^4 células mL⁻¹ em cada poço de uma lâmina de cultivo de 8 poços (NucTMLab-TekTM II – Thermo Fischer). Após 24 h, incubaram-se os FSs com diferentes concentrações por 2 h. A seguir, as células foram lavadas com PBS para retirar o FS que pode não ter sido incorporado nas células e em seguida estas

foram irradiadas em 660 nm em diferentes intervalos de tempo com irradiância de $27,6 \text{ mW cm}^{-2}$. Após 24h de irradiação, as células foram marcadas com 30 μL de uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de laranja de acridina e brometo de etídio diluídos em PBS. Imediatamente após, as células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar o excesso de corante, e visualizadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX41) na objetiva de 20X.

3.9 Acumulação Intracelular dos FSs por Microscopia Confocal

A microscopia confocal permite investigar a acumulação intracelular de FS qualitativa ou quantitativamente retido nas células em função do tempo. Primeiramente, uma suspensão celular de 5×10^4 células mL^{-1} foi incubada em lâminas de cultivo. Após 24 h, as células foram incubadas com 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clorina em cada poço da lâmina de cultivo de oito poços em duplicatas, deixando dois poços para os controles. Os tempos de incubação foram de 30, 60 e 120 min. Após esses períodos de incubação, as células foram lavadas com PBS e em seguida analisadas no microscópio confocal (LSM780 – Carl Zeiss). As clorinas foram excitadas no comprimento de onda de 405 nm e sua visualização de fluorescência foi coletada num canal de 600-758 nm (vermelho) analisadas numa objetiva de 40X.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese da Protoporfirina IX dimetil éster

A síntese da protoporfirina IX dimetil éster descrita no Figura 9 apresentou algumas modificações nas metodologias descritas na literatura, uma vez que exibiram polimerizações do material de partida (Hematoporfirina), assim como formação de emulsões no processo de extração o que dificultava a sua separação. Portanto, foi preciso ter cuidado nas duas etapas da reação. Primeiro no processo de eliminação dos dois grupos hidroxilas (-OH) da hematoporfirina (Hp), usando PhCl e APTS onde não foi realizado o processo de extração/purificação do produto com NH₄OH 2% usado para neutralizar o APTS que não reagiu. Em contrapartida, foi evaporado o PhCl sob pressão reduzida e protegendo a mistura reacional da luz visível. Imediatamente, foi realizada a esterificação dos grupos carboxílicos da hematoporfirina na presença de metanol e ácido sulfúrico catalítico (H₂SO₄). Nesta etapa, o metanol foi evaporado e adicionado uma solução concentrada de NH₄OH para neutralizar o meio reacional com posterior esfriamento com gelo devido à liberação de calor. Após, o composto final foi extraído utilizando uma mistura CHCl₃:MeOH (1:3) (Dos Santos *et al.*, 2013). O rendimento da reação foi de 79% e o produto foi caracterizado por RMN de ¹H e UV-Vis confirmando a sua identidade e pureza.

No espectro de RMN de ¹H da Pp IX (composto 9) foram identificados os sinais característicos desta molécula (anexo 1). Por exemplo, foram observados dois sinais dubletos referente a quatro singletos dos hidrogênios *meso* na região de σ 10,05 – 9,93 ppm ocasionado pela agregação do composto. Estes hidrogênios são deslocados a campos mais baixos devido ao fato que estão mais desprotegidos pelo efeito anisotrópico da corrente elétrica do anel tetrapirrólico. Também é exibido um duplo dubleto em σ 8,20 ppm referente aos hidrogênios da dupla ligação. Assim como, os sinais referentes aos hidrogênios α e β da dupla ligação do processo de eliminação na região de σ 6,35 – 6,16 ppm (dois dubletos). Outros sinais identificados foram as metoxilas procedente da esterificação localizados na região σ 6,35 ppm (s, 6H) integrado para 6 hidrogênios. Os sinais que se encontram em σ 3,62 – 3,24 ppm são referentes as metilas ligadas ao anel porfirínico. Por último, um

singleto localizado em σ – 3,94 ppm é referente aos hidrogênios internos ligados ao nitrogênio. Estes prótons são diferenciados devido à forte blindagem que existe em torno do anel tetrapirrólico.

4.2 Síntese da maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno

Após obtenção da Pp IX dimetil éster, foi sintetizado a maleimida 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-dieno a partir de uma reação de Diels–Alder com inserção de uma amina primária e uma retro Diels–Alder para obter o produto desejado (Figura 10). Esta reação de cicloadição $[4\pi+2\pi]$ compreende um sistema de quatro elétrons π (dieno) e um de dois elétrons π (dienofilo) em um mecanismo concertado de uma etapa. O primeiro intermediário obtido foi o 4,10-dioxatriciclo[5.2.1.0]dec-8-eno-3,5-diona (**3**) produzido a partir dos seus precursores anidrido maleico e furano com um rendimento de 80% e exibindo uma orientação *endo* preferencialmente devido aos grupos retiradores de elétrons (grupos carbonilos) do dienófilo orientando os hidrogênios da dupla ligação no mesmo sentido dos orbitais π do dieno (Figura 13). O composto foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C (anexo 2). A segunda molécula intermediária foi obtida através da inserção de uma amina primária (etanolamina) no composto **3**, gerando o intermediário 4-(2-hidroxi-ethyl)-10-oxa-4-aza-triciclo[5.2.1.0]-dec-8-eno-3,5-diona (**4**) com um rendimento de 61%. Nesta etapa, o par de elétrons do nitrogênio ataca o carbono de carbonila gerando um intermediário tetraédrico como é observado na Figura 13. Em seguida, a dupla ligação da carbonila é regenerada ($\text{C}=\text{O}$) promovendo a quebra da ligação $\text{C}-\text{O}$ anidrido, dando origem a um ácido carboxílico (COOH). Posteriormente, o mecanismo procede de forma similar como foi mencionado anteriormente com o ataque do par de elétrons do nitrogênio da amida sobre o carbono do ácido carboxílico com a liberação de uma molécula de água e a formação do aducto maleimidico **4**. Este composto foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C para sua confirmação (anexo 3). Finalmente, foi realizada uma retro Diels–Alder (cicloversão) para liberar o furano e obter a maleimida **5**. A hidroxietil maleimida foi caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C com rendimento de 81% (anexo 4).

Figura 13 – Mecanismo de reação da maleimida 1-(2-hidroxiethyl)-1H-pirrol-2,5-dieno

Fonte: autoria própria

4.3 Síntese da maleimida 1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno

A segunda maleimida sintetizada foi gerada a partir do anidrido maleico e fenilpropilamina. Essa reação apresentou um intermediário ácido de cor branca que depois foi colocado em refluxo para produzir o composto de interesse. O mecanismo de reação é descrito na Figura 14, onde o par de elétrons da amina ataca o carbono de carbonila do anidrido maleico gerando um intermediário tetraédrico com carga positiva sobre o nitrogênio e uma carga negativa sobre o oxigênio. Em seguida, a dupla ligação da carbonila é regenerada promovendo concomitantemente a quebra da ligação C–O anidrido, dando origem a um ácido carboxílico (COOH) estável que

foi purificado e caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C com rendimento de 85% (anexo 5). Após disso, o par de elétrons do nitrogênio da amida ataca o carbono do ácido carboxílico que apresenta densidade de carga positiva produzindo um deslocamento de elétrons sobre o oxigênio gerando uma carga negativa. Além disso, um próton é capturado pelo grupo OH gerando uma ligação $-\text{OH}_2^+$ de carga positiva sobre o oxigênio que em seguida é liberado como água e formação da molécula **7**, que foi caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C com rendimento de 45% (anexo 6).

Figura 14 – Mecanismo de reação da maleimida 1-(3-fenilpropil)-1H-pirrol-2,5-dieno

Fonte: autoria própria

4.4 Síntese das novas clorinas

Após obtenção da protoporfirina IX dimetil éster (dieno) e sintetizar cada maleimida (dienófilo) como descrito nas figuras 15 e 16, foi realizada a ciclo adição $4\pi+2\pi$, também chamada de reação Diels-Alder com 1 equivalente (0.1 mmol) de protoporfirina IX e 20 equivalente (2 mmol) de maleimida dissolvidos em tolueno anidro e usando 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) como inibidor de radicais. Para

avaliar a reatividade dos materiais de partida e verificar o final da reação, foi utilizada a espectrofotometria de UV-Vis e cromatografia em camada delgada (do inglês, TLC) para monitorar a reação determinando a relação entre a absorbância da banda Q (668 nm) e a banda Soret (404 nm), um valor de 0,20. As clorinas foram separadas por placas preparativas em sílica observando-se um excesso de protoporfirina IX. O rendimento global de reação das primeiras clorinas (Figura 15), chamadas $2^1,2^2$ -[N,N-dicarbonil-N-4-(2-hidroxietil)]-13,17-bis[2-(metoxicarbonil)etil]-2,7,12,18-tetrametil-8-vinil-2,2¹,2²,2³-tetrahidrobenzo[b]porfirina (**10-a**) e $2^1,2^2$ -[N,N-dicarbonil-N-4-(2-hidroxietil)]-8,12-bis[2-(metoxicarbonil)etil]-2,7,12,18-tetrametil-8-vinil-2,2¹,2²,2³-tetrahidrobenzo[b]porfirina (**10-b**) foi de 68% (proporção 1:1 de regioisômeros) e caracterizadas por RMN ¹H e ¹³C, assim como por HRMS (anexo 7 e 8).

Figura 15 – Síntese das clorinas **10-a** e **10-b**

Fonte: Autoria própria.

As segundas clorinas obtidas (Figura 16) foram a $2^1,2^2$ -[N,N-dicarbonil-N-4-(3-fenilpropil)]-13,17-bis[2-(metoxicarbonil)etil]-2,7,12,18-tetrametil-8-vinil-2,2¹,2²,2³-tetrahidrobenzo[b]porfirina (**11-a**) e a $2^1,2^2$ -[N,N-dicarbonil-N-4-(3-fenilpropil)]-8,12-bis[2-(metoxicarbonil)etil]-2,7,12,18-tetrametil-8-vinil-2,2¹,2²,2³-tetrahidrobenzo[b]porfirina (**11-b**), que apresentaram um rendimento global similar de 64% (proporção 1:1 de regioisômeros) e caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C e HRMS (anexo 9 e 10). Estes valores de rendimento para as clorinas foram satisfatórios, uma vez que se tinham exemplos deste tipo de reações realizados no grupo de Química Bio-orgânica (Universidade de federal de São Carlos), mas não se

sabia sobre a reatividade das maleimidas sintetizadas e se elas iam resistir às condições reacionais (altas temperaturas).

Figura 16 – Síntese das clorinas **11-a** e **11-b**

Fonte: Autoria própria.

Estas moléculas foram comparadas com um FS aprovado para o tratamento por TFD como é o caso do Visudyne[®] (verteporfina), uma vez que apresenta uma estrutura análoga às clorinas derivadas da protoporfirina IX e que é utilizado para tratar a degeneração macular relacionada à idade e a neovascularização coroidal secundária. Este composto foi testado pela primeira vez no ano 2000 em pacientes com estas doenças anteriormente mencionadas nas fases clínicas I e II, além disso, foi determinado o mecanismo de ação da verteporfina na TFD (Schmidt-Erfurth, 2000; Schmidt-Erfurth e Hasan, 2000). Durante os últimos 15 anos, este composto tem sido alvo de diferentes pesquisas determinando a ação molecular que leva à morte das células tumorais e seu efeito fotodinâmico comparado com outros FSs mais antigos como Photofrin[®] e Phoscan[®] (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2006).

4.5 Rendimento Quântico de Fluorescência (Φ_f) e de formação de Oxigênio Singleto (Φ_Δ)

Os valores de rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) das clorinas sintetizadas foram determinados a partir dos tempos de vida (τ_Δ) obtidos através das curvas de decaimento exponenciais mediante a detecção direta da emissão de luminescência NIR em torno de 1270 nm utilizando um laser com excitação em 420

nm (Anexo 11 e 12). A molécula de referência usada para estes ensaios foi a verteporfina ($\Phi_{\Delta} = 0,77 \pm 0,02$) (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2006). Comparadas com o composto padrão, as clorinas **10-a** e **10-b** apresentaram os melhores valores de Φ_{Δ} dentre as quatro moléculas tetrapirrólicas sintetizadas (Tabela 1). Esses valores de rendimento quântico de oxigênio singleto são de grande importância devido as suas características químicas na oxigenação/oxidação de grupos funcionais orgânicos, provocando uma cascata de eventos na célula induzindo a morte por apoptose ou infligindo um dano celular por necrose (Da Silva *et al.*, 2012).

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) foi determinado empregando-se Rodamina B solubilizada em etanol ($\Phi_f = 0,65$) como padrão (Moltalti *et al.*, 2006) (Tabela 1). Os valores de absorvância das soluções foram determinados no comprimento de onda de excitação 510 nm. A verteporfina apresentou um Φ_f cerca de duas vezes menor que o valor das clorinas. Embora, as clorinas tivessem valores de Φ_f maiores do que a verteporfina, este fato não teve influência na atividade fotodinâmica nas células tumorais. Os experimentos foram realizados em triplicata em dias diferentes.

Tabela 1 – Valores de rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) e de fluorescência (Φ_f) da verteporfina e clorinas 10-a, 10-b, 11-a e 11-b

	(Φ_{Δ})	(Φ_f)
Verteporfina	$0,77 \pm 0,02$	$0,0085 \pm 0,0006$
10-a	$0,75 \pm 0,04$	$0,0096 \pm 0,0003$
10-b	$0,73 \pm 0,02$	$0,0107 \pm 0,0006$
11-a	$0,69 \pm 0,04$	$0,0148 \pm 0,0007$
11-b	$0,66 \pm 0,02$	$0,0166 \pm 0,0012$

Fonte: Autoria própria.

4.6 Fotodegradação e Coeficiente de Partição (Log P)

As clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** foram irradiadas com um laser vermelho em 661 nm e uma irradiância de 50 mW por 10 min em intervalos de 1 min determinando-se a estabilidade da molécula (anexo 13). Esta é uma propriedade físico-química importante para este tipo de composto, uma vez que durante o tempo de irradiação a molécula pode perder sua atividade fotodinâmica pela alta

degradação devido às alterações químicas na estrutura, resultando em pequenos fragmentos (fotoprodutos) que não apresentam uma absorção apreciável na região do visível (Ferreira *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2012). Todas as clorinas sintetizadas apresentaram uma leve fotodegradação em função do tempo de irradiação, observando-se uma diminuição ao redor de 5% na banda de absorbância em 404 nm (banda Soret) e 668 nm (banda Q) respectivamente, o que torna estas moléculas fotoestáveis durante os ensaios de viabilidade celular (Figura 17).

Figura 17 – Espectro de UV-Vis da fotodegradação das clorinas **10-a** e **11-a** utilizando um laser vermelho em 661 nm e irradiância de 50 mW por 10 min em intervalos de 1 min.

Fonte: Autoria própria.

Para conhecer a hidrofiliidade das clorinas sintetizadas foi necessário determinar o coeficiente de partição de cada composto solubilizado em 1-octanol em relação à fase aquosa (tampão fosfato de sódio). O log P foi calculado de acordo com uma adaptação do método proposto inicialmente por Pooler e Valenzano (Pooler e Valenzano, 1979), uma vez que as clorinas estudadas são pouco solúveis na fase aquosa (Equação 1).

Na Tabela 2 apresentam-se os valores de Log P das clorinas estudadas e da verteporfina como padrão de comparação. Todos os valores de Log P dos compostos analisados foram positivos proporcionando-lhes características lipofílicas, enquanto valores negativos significariam que os compostos seriam hidrofílicos. A ordem crescente de lipofiliidade foi 10-b<10-a<11-b<11-a<Verteporfina. As moléculas **11-a** e **11-b** mostraram um aumento na lipofiliidade de 0,22 em relação às clorinas **10-a** e **10-b**, permitindo deduzir a importância dos grupos hidrofílicos ligados à estrutura da clorina diminuindo os valores dos coeficientes de partição e aumentando a solubilidade em meio aquoso sem alterar o poder de penetração pela membrana plasmática das células (Huang *et al.*, 2010; Ormond e Freeman, 2013). As quatro clorinas sintetizadas apresentaram valores de Log P menores que a verteporfina, que não apresenta grupos hidrofílicos na sua estrutura, tornando-a mais lipofílica e menos solúvel em meio aquoso que as clorinas estudadas. É importante ressaltar que clorinas com caráter anfifílico apresentam excelentes características físico-químicas e melhores resultados em TFD. Portanto, novas estratégias sintéticas são desenvolvidas para melhorar a eficiência destas moléculas tetrapirrólicas em células tumorais.

Tabela 2 – Valores de coeficiente de partição (Log P) das clorinas sintetizadas e da verteporfina utilizando uma mistura de 1-octanol e tampão fosfato de sódio (PBS)

Fotossensibilizador	Coeficiente de Partição (Log P)
Verteporfina	1,61 ± 0,10
10-a	1,20 ± 0,04
10-b	1,17 ± 0,03
11-a	1,44 ± 0,06
11-b	1, 42 ± 0,03

Fonte: Autoria própria.

4.7 Coeficiente de Absorção Molar (ϵ)

O coeficiente de absorção molar das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b**, foi determinado nos comprimentos de onda 670 e 672 nm dissolvidas em DMSO e tampão fosfato (PBS), respectivamente (Anexo 14 e 15). Os valores de ϵ foram gerados no programa OriginPro8 e estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que todas as clorinas obtidas a partir da reação de Diels-Alder estão na mesma ordem de magnitude (10^4) comparada com o composto de referência, mas é importante ressaltar que os valores de ϵ destas clorinas foram próximas da verteporfina.

Tabela 3 – Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) das clorinas estudadas e verteporfina em solvente DMSO

FS	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de Absorção molar ($M^{-1} cm^{-1}$)
10-a	670	$2,41 \times 10^4$
10-b	670	$2,39 \times 10^4$
11-a	670	$2,00 \times 10^4$
11-b	670	$2,20 \times 10^4$
Verteporfina	688	$2,59 \times 10^4$

Fonte: Autoria própria.

Quando foi determinado o coeficiente de absorção molar em PBS, observou-se um decréscimo no valor de ϵ tanto nas clorinas quanto na verteporfina (Tabela 4). Para as clorinas **10-a** e **10-b**, o decréscimo foi de 34% no valor de ϵ , enquanto para as moléculas **11-a** e **11-b** foi de 27%. Esta diminuição no valor de ϵ em meio aquoso foi maior para a verteporfina ao redor de 62% exibindo uma baixa absorção de radiação da sustância provocada pela pouca solubilidade do composto em um meio polar. Além disso, causada pela forte interação dos orbitais π do anel aromático provocando a sua agregação em meio fisiológico (Uchoa *et al.*, 2011). É importante mencionar que a conformação estrutural tipo L das clorinas sintetizadas além de grupos hidrofílicos na molécula, ajudou na solubilidade em meio aquoso e no processo de não agregação.

Tabela 4 – Valores de coeficiente de absorção molar (ϵ) das clorinas estudadas e verteporfina em solvente PBS

FS	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de Absorção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
10-a	672	$1,51 \times 10^4$
10-b	672	$1,65 \times 10^4$
11-a	672	$1,49 \times 10^4$
11-b	672	$1,57 \times 10^4$
Verteporfina	690	$9,88 \times 10^3$

Fonte: Autoria própria.

4.8 Estudos Fototóxicos das Clorinas pelo Método de MTT

Os ensaios fototóxicos das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a**, **11-b** e da verteporfina foram realizados nas linhagens tumorais HEP-2 e HeLa, além de uma não tumoral Vero. Estes tipos de células foram irradiados em duas doses de luz (3 e 6 J cm^{-2}) com intensidade luminosa de $27,6 \text{ mW cm}^{-2}$ na presença dos FSs estudados para obtenção do IC_{50} após 24 e 48 h utilizando-se o método colorimétrico de MTT. Além disso, foram realizados os ensaios sem irradiação para determinação da citotoxicidade no escuro. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em quatro experimentos independentes.

4.8.1 Células HEP-2

Os valores de IC_{50} obtidos para as clorinas sintetizadas mostraram que as moléculas **10-a** e **10-b** exibiram uma maior fototoxicidade do que a verteporfina nas células HEP-2 após 24 e 48 h do processo fotodinâmico nas duas doses de luz testadas (dose 3 e 6 J cm^{-2}), enquanto às clorinas **11-a** e **11-b** exibiram os maiores valores de IC_{50} nas mesmas condições como é observado nos gráficos A e B da Figura 18. A clorina **10-a** apresentou o maior efeito fototóxico no período de 48 h sendo o IC_{50} 2,0 vezes maior nas duas doses de luz usadas ($23,6 \text{ nM} \pm 2,8$ (3) e $13,1 \text{ nM} \pm 1,4$ (6)) em comparação com o período de 24 h ($53,0 \text{ nM} \pm 3,0$ (3) e $28,8 \text{ nM} \pm 3,6$ (6)). Do mesmo modo, a clorina **10-b** exibiu um valor de IC_{50} 6,0 e 2,0 vezes mais potente ($36,4 \text{ nM} \pm 4,0$ (3) e $9,2 \text{ nM} \pm 1,1$ (6)) no período de 48 h do que

em 24 h. Quando foi comparada a fototoxicidade destas duas moléculas (**10-a** e **10-b**) com a verteporfina após 48 h, observamos que na dose 3 J cm^{-2} os valores de IC_{50} das clorinas apresentaram uma atividade de 3,0 e 2,0 vezes maior do que a molécula padrão que exibiu o valor de IC_{50} de $66,0 \text{ nM} \pm 4,1$ (Figura 18A). De igual maneira, quando a dose de luz foi incrementada (6 J cm^{-2}), os valores de IC_{50} das clorinas **10-a** e **10-b** foram 2,0 e 3,0 vezes mais potente respectivamente, frente à verteporfina que apresentou um IC_{50} de $30,1 \text{ nM} \pm 2,5$ (Figura 18B). Portanto, pode-se concluir que a potencia fototóxica de ambas as clorinas foi constante nos dois tempos após irradiação em relação à verteporfina.

As clorinas **11-a** e **11-b** apresentaram uma atividade fototóxica 4,0 e 3,0 vezes menor do que a clorina **10-a** nas doses 3 e 6 J cm^{-2} respectivamente, no período de 24 h (Figura 18). Esta potência fototóxica foi ainda menor após 48 h, sendo 6,0 e 8,0 vezes menor para a dose 3 J cm^{-2} e 5,0 e 6,0 vezes menos potente para a dose 6 J cm^{-2} respectivamente. Por outro lado, quando se comparou o efeito fototóxico em relação à clorina **10-b** no período 24 h, as moléculas **11-a** e **11-b** foram 2,0 vezes menos potente na dose 3 J cm^{-2} (Figura 18A). No entanto, para a dose 6 J cm^{-2} , não se apresentou uma diferença na atividade fototóxica entre elas de acordo aos valores de IC_{50} . Após 48 h do processo fotodinâmico, as clorinas **11-a** e **11-b** diminuíram a atividade fotodinâmica em 5,0 vezes na dose 3 J cm^{-2} e de 8,0 vezes para a dose 6 J cm^{-2} em comparação com a clorina **10-b** como é apresentado no gráfico A e B da Figura 18. Por ultimo, os ensaios realizados no escuro mostraram que as clorinas **10a-b** e **11a-b** não apresentaram citotoxicidade nas concentrações usadas no processo fotodinâmico. Entretanto, a verteporfina exibiu uma citotoxicidade importante nas maiores concentrações saturando o ambiente celular.

Figura 18 – Gráfico de IC_{50} das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a**, **11-b** e da verteporfina testadas nas células HEp-2 após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm^{-2} B) 6 J cm^{-2}

Fonte: Autoria própria.

4.8.2 Células HeLa

Quando foram realizados os ensaios fototóxicos na linhagem celular HeLa, foi observado que as clorinas **10-a** e **10-b** apresentaram os melhores valores de IC_{50} tanto em 24 h quanto em 48 h após irradiação nas duas doses de luz utilizadas. A molécula **10-a** exibiu um valor de IC_{50} 2,0 vezes maior após 48 h ($32,8 \text{ nM} \pm 3,8$) em comparação com o período de 24 h ($62,4 \text{ nM} \pm 5,5$) na dose 3 J cm^{-2} visualizado na Figura 19A. Porém, não se teve uma diminuição importante no valor de IC_{50} na dose 6 J cm^{-2} ($34,1 \text{ nM} \pm 5,0$ e $26,9 \text{ nM} \pm 1,9$ respectivamente) nos tempos de 24 e 48 h (Figura 19B). Por outro lado, a molécula **10-b** apresentou um valor de IC_{50} 4,0 vezes mais potente no período de 48 h com um valor de IC_{50} de $43,6 \text{ nM} \pm 4,2$ na dose 3 J cm^{-2} em relação ao tempo de 24 h que foi de $159,4 \text{ nM} \pm 18,7$. Enquanto para a dose 6 J cm^{-2} , a clorina **10-b** exibiu uma atividade 3,0 vezes mais fototóxica após 48 h ($31,4 \text{ nM} \pm 2,8$) do que no período de 24 h ($94,0 \text{ nM} \pm 7,4$) (Figura 19). No entanto, os valores de IC_{50} das clorinas **11-a** e **11-b** tiveram pouca atividade fotodinâmica sendo 6,0 vezes menos potente do que a clorina **10-a** nas duas doses de luz testadas no período de 24 h. Do mesmo modo, após 48 h, estas clorinas foram ainda menos potentes sendo 11,0 e 13,0 vezes menos ativas do que a clorina **10-a** na dose 3 J cm^{-2} e 7,0 e 11,0 vezes menos fototóxicas na dose 6 J cm^{-2} observado no gráfico A e B da Figura 19.

Da mesma maneira, foi realizada a comparação da atividade fototóxica das moléculas **10-a** e **10-b** para verteporfina nas células HeLa. Essas análises, exibiram uma atividade fototóxica 2,0 vezes menos potente da verteporfina em relação às clorinas nas doses de luz 3 e 6 J cm^{-2} ($83,5 \text{ nM} \pm 5,9$ e $60,8 \text{ nM} \pm 5,0$ respectivamente) no período de 48 h (Figura 19). Esses resultados inesperados de resistência das células HeLa em comparação com as células HEP-2, sugere que alguns fatores adicionais determinam o dano celular, por exemplo, o nível endógeno da capacidade oxidativa que pode estar relacionado a algumas enzimas como glutatona e superóxido dismutases (Kiehl et al., 2010). Os ensaios citotóxicos no escuro mostraram que as clorinas sintetizadas não apresentaram atividade nas concentrações usadas para os testes com irradiação em comparação com a verteporfina que exibiu uma baixa citotoxicidade nas concentrações mais altas.

Figura 19 – Gráfico de IC_{50} das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a**, **11-b** e da verteporfina testadas nas células HeLa após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm^{-2} B) 6 J cm^{-2}

Fonte: Autoria própria.

4.8.3 Células Vero

Após determinar a atividade fototóxica das clorinas **10a-b** e **11a-b** nas linhagens tumorais HeLa e HEp-2, foram testadas nas células não tumoral Vero nos mesmos períodos após irradiação e doses de energia, analisando-se o efeito fototóxico provocado pelas clorinas. Observou-se que as clorinas **11-a** e **11-b** foram menos fototóxicas em relação às clorinas **10-a** e **10-b**, assim como, para a verteporfina. Porém, as moléculas **10-a** e **10-b** apresentaram valores de IC_{50} similares à molécula padrão nos dois de tempos após irradiação e nas duas de doses de energias usadas. Por outro lado, no período de 24 h, a clorina **11-a** apresentou um IC_{50} de $1140,5 \text{ nM} \pm 85,8$ apresentando uma eficiência fototóxica 9,0 e 3,0 vezes menor em comparação com as clorinas **10-a** e **10-b** ($130,6 \text{ nM} \pm 15,1$ e $390,1 \text{ nM} \pm 41,7$) tanto para a dose 3 J cm^{-2} quanto para a dose 6 J cm^{-2} ($79,5 \text{ nM} \pm 4,6$ e $287,8 \text{ nM} \pm 34,8$) (Figura 20). Igualmente, a clorina **11-a** exibiu uma atividade fototóxica 7,0 vezes menor do que a verteporfina ($173,2 \text{ nM} \pm 19,3$ e $90,0 \text{ nM} \pm 8,3$) nas duas doses de luz respectivamente. Enquanto para o período de 48 h após irradiação, esta relação foi de 14,0 e 17,0 vezes menos fototóxica do que a verteporfina ($93,5 \text{ nM} \pm 7,9$ (3) e $62,6 \text{ nM} \pm 6,5$ (6)) (Figura 20).

A clorina **11-b** no período de 24 h apresentou o maior valor de IC_{50} das cinco moléculas testadas para estes estudos, uma vez que foi 17,0 e 6,0 vezes menos potente que as clorinas **10-a** e **10-b** nas doses 3 e 6 J cm^{-2} . No período de 48 h após irradiação, a clorina **11-b** teve valores de IC_{50} muito elevados se comparamos com o período de 24 h nas mesmas doses de energia. Do mesmo modo, a clorina **11-b** foi 14,0 e 13,0 vezes menos potente do que a verteporfina nas doses 3 e 6 J cm^{-2} no período de 24 h, Já para o período de 48 h, esta relação foi quase o dobro em comparação com a verteporfina (Figura 20A-B).

Estas moléculas tetrapirrólicas apresentam uma maior acumulação (seletividade) na célula tumoral devido a um incremento na permeabilidade da neovasculatura tumoral (Yuan *et al.*, 1993). Além disso, a localização do FS dentro na célula tumoral pode ser diferente da célula normal por causa da retenção seletiva de cada célula tal como o baixo valor de pH (Pottier e Kennedy, 1990; Castano *et al.*, 2005a), a super expressão de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL; apoB/E) (Allison *et al.*, 1994), drenagem linfática pouco desenvolvida (Roberts e

Hasan, 1992) e alguns macrófagos associados ao tumor (Korbelik e Krosl, 1995). Estas características das células neoplásicas as tornam mais suscetíveis ao acúmulo do FS quando comparadas às células normais.

Figura 20 – Gráfico de IC_{50} das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a**, **11-b** e da verteporfina testadas nas células Vero após 24 e 48 h de irradiação, utilizando duas doses de luz: A) 3 J cm^{-2} B) 6 J cm^{-2}

Fonte: Autoria própria.

4.9 Mecanismo de Morte Celular por Microscopia de Fluorescência

A TFD pode mediar muitos eventos de sinalização nas células, por isso, vários estudos foram realizados elucidando os caminhos pelo qual as células de mamíferos podem morrer e algumas das formas como a TFD pode iniciar esses processos. A concentração, as propriedades físico-químicas e localização intracelular do FS, assim como a concentração de oxigênio, o comprimento de onda adequado, a intensidade da luz, além das propriedades específicas de cada célula podem influenciar no modo e extensão da morte celular (Castano *et al.*, 2005b).

4.9.1 Células HEP-2 irradiadas na dose 3 J cm^{-2}

A fim de determinar o mecanismo de morte celular, as células HEP-2 foram marcadas com uma mistura de laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE) após 24 h do tratamento fotodinâmico e tratadas com a concentração de IC_{50} de cada clorina sintetizada definida pelo método colorimétrico de MTT. Além disso, a diferenciação celular foi analisada com uma objetiva de 20X. Nas imagens E e H da Figura 21 pode-se observar tanto o processo de morte via apoptose quanto o de necrose. As células apoptóticas apresentam mudanças características na sua morfologia tais como condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos, encolhimento celular, dentre outras (Golstein e Kroemer, 2007). Já as células necróticas exibem alterações morfológicas tais como: perda da homeostase, inchaço de toda a célula e suas organelas, seguido da ruptura da membrana plasmática, liberação de componentes intracelulares, incluindo enzimas proteolíticas, e dissolução lenta do núcleo (Edinger e Thompson, 2004).

Dentro do processo de apoptose, também é diferenciada a *apoptose precoce* e a *apoptose tardia*. No primeiro caso, é constatada uma condensação ou fragmentação da cromatina onde o LA penetra a membrana celular ainda íntegra e liga-se ao DNA do núcleo, gerando uma coloração verde clara na célula (Smith *et al.*, 2012). Esta mesma coloração é observada para as células viáveis. No segundo caso, além de apresentar condensação e fragmentação da cromatina, também exibe uma ruptura da membrana plasmática permitindo a entrada do BE corando a cromatina de laranja. Do mesmo modo, as células em processo necrótico

apresentam uma coloração laranja a vermelha provocada pela perda da integridade da membrana citoplasmática facilitado pela passagem do BE.

Os ensaios de microscopia para este tipo de células tratadas com as clorinas **10-a** e **10-b** e irradiadas com um LED vermelho (660 nm) são apresentados na Figura 21E-F respectivamente. Estas células exibiram uma alta porcentagem (ao redor de 70%) pelo mecanismo celular de apoptose, assim como uma baixa porcentagem de células necróticas (em torno de 30%). Os controles negativos (células sem FS) foram utilizados para comparar o efeito que causa a luz sobre as células quando foram irradiadas por um período de tempo. Portanto, foi observado aproximadamente 5% de células em processo de apoptose e 95% de células viáveis (Figura 21A-B). Por outro lado, a ação fototóxica gerada pelas clorinas **11-a** e **11-b** apresentadas nas imagens G e H da Figura 21, mostraram uma maior porcentagem de células em processo de apoptose ao redor de 80%, além de uma baixa porcentagem de células necróticas (15%) e de células viáveis (5%). Os controles negativos das clorinas **11a-b**, também teve uma baixa porcentagem de células apoptóticas em torno de 7%, assim como, algumas células necróticas observadas nas imagens C e D da Figura 21. É importante ressaltar que foi difícil observar células em apoptose precoce nas imagens mostradas na Figura 21, uma vez que se podia confundir com células viáveis. Portanto, as células em apoptose inicial e tardia foram somadas em uma só porcentagem. Igualmente, foram somados as porcentagem das clorinas **10-a** e **10-b**, assim como, das clorinas **11-a** e **11-b** para um melhor análise dos resultados obtidos.

Figura 21 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HEP-2 após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controles negativos sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC_{50} respectivamente, (dose de 3 J cm^{-2})

4.9.2 Células HEp-2 irradiadas na dose 6 J cm⁻²

Quando foi duplicado o tempo de irradiação na célula tumoral tratadas com as clorinas **10-a** e **10-b**, observou-se um aumento no número de células necróticas aproximadamente de 10% comparado com a dose 3 J cm⁻² e proporcionalmente uma diminuição no número de células apoptóticas (Figura 22E-F). Os controles negativos das células sem FS na dose 6 J cm⁻² apresentaram diferenças com os controles negativos da dose 3 J cm⁻², uma vez que foram vistas um maior número de células em apoptose tardia (em torno de 8%) nas imagens A e B da Figura 22. Para as clorinas **11-a** e **11-b**, este aumento no tempo de irradiação provocou uma diminuição ao redor de 5% na porcentagem de células apoptóticas com relação à dose 3 J cm⁻² e um aumento na porcentagem de células necróticas de 10% aproximadamente, sem ser observadas células viáveis (Figura 22G-H). Nos seus controles negativos (Figura 22C-D), foram observadas células tanto em processo de apoptose tardia quanto em necrose (ao redor de 5-8%) causado possivelmente pelo tempo de irradiação, assim como, pela senescência das células e a pouca área livre no poço ocasionando a morte. É importante mencionar que as clorinas **11a-b** tiveram uma maior seletividade pelo mecanismo apoptótico utilizando os valores de IC₅₀ determinados nos ensaios de MTT, porém foram menos potentes do que as clorinas **10a-b**.

Uma explicação para o maior número de células necróticas pode ser devido ao tempo de irradiação que foram submetidas às células provocando um dano na membrana mitocondrial e, portanto uma depleção dos níveis do trifosfato de adenosina (ATP) intracelular além de uma inibição de cisteíno proteases chamadas caspases que atuam no processo de apoptose (Elmore, 2007). Estudos realizados mostram como altas doses de irradiação geram um maior numero de células necróticas, enquanto que baixas doses de luz o mecanismo que predomina é apoptose (Plaetzer *et al.*, 2002). Além disso, as vias de sinalização, como receptores de morte, cascatas de quinase e mitocôndrias, também participam de apoptose e necrose, modulando essas vias, é possível alternar entre apoptose e necrose (Proskuryakov e Gabai, 2010).

Figura 22 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HEP-2 após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC₅₀ respectivamente, (dose de 6 J cm⁻²)

4.9.3 Células HeLa irradiadas na dose 3 J cm⁻²

Após os análises como as células HEP-2, foram realizados os ensaios com a linhagem celular HeLa com as moléculas **10-a** e **10-b** (Figura 23E-F). Estas células apresentaram uma alta porcentagem de células apoptóticas ao redor de 80% e 20% de células necróticas aproximadamente. As imagens A e B da Figura 23 são os controles negativos sem FS usadas para comparar o efeito fototóxico das moléculas **10a-b**, assim como a ação da luz sobre as células. Nestas imagens não foram observadas células apoptóticas nem necróticas nesta dose. Referente às moléculas **11-a** e **11-b**, a porcentagem de células apoptóticas nesta linhagem celular foi (em torno de 90%) o que mostra uma grande seletividade pela via apoptótica, além de exibir um número baixo de células necróticas (Figura 23G-H). Por outro lado, os controles negativos (Figura 23C-D) não exibiram células em processo de apoptose nem necrose, o que se pode concluir que nesta dose as células HeLa não tiveram influência da irradiação da luz. Embora, as moléculas **11a-b** apresentaram um maior número de células apoptóticas e geraram um maior estresse oxidativo na célula tumoral do que as moléculas **10a-b** usando a concentração de IC₅₀, estas foram 6,0 vezes menos potente do que a clorina **10-a** e 3,0 vezes menos potente do que a clorina **10-b**.

O estresse oxidativo provocado na célula pode ser explicado, mediante a diminuição dos níveis de GSH (um tripeptídeo com propriedades antioxidantes) que atua como tampão redutor junto à tiorredoxina (TRX) em um dos mecanismos de defesa da célula. Este composto tiol é liberado da célula quando se apresenta alterações oxidativas no ambiente intracelular induzido por agentes tóxicos, levando a célula à morte por apoptose (Ghibelli *et al.*, 1995; Xu e Thornalley, 2001). É importante ressaltar que as células apresentam um estado redox como consequência dos níveis de EROs produzidos pelo organismo como resultado do metabolismo celular normal e fatores ambientais como o ar poluído ou fumaça do cigarro. Portanto, a elevação nos níveis de EROs acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular os níveis dessas espécies resultando em um estresse oxidativo potencialmente citotóxico para a célula (Birben *et al.*, 2012).

Figura 23 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HeLa após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC₅₀ respectivamente, (dose de 3 J cm⁻²)

4.9.4 Células HeLa irradiadas na dose 6 J cm⁻²

A irradiação das células HeLa na maior dose tratadas com as clorinas **10-a** e **10-b** provocou uma diminuição no número de células em apoptose de 80% para 70%, uma vez que como foi mencionado anteriormente no item 4.9.2 muitas células poderiam apresentar uma redução nos níveis de ATP devido à diminuição da função mitocondrial causada pelo agente fotossensível, assim como, a inibição das enzimas caspases (Figura 24E-F). Os controles negativos sem FS (Figura 24A-B), não exibiram células nem em apoptose nem em necrose, o que é uma grande diferença com os controles negativos das células HEP-2 que sim apresentaram células por estes dois mecanismos na mesma dose (6 J cm⁻²). É possível que as células HeLa mostrem uma maior resistência a estímulos externos como a luz irradiada a 660 nm, de modo que, não existe um desequilíbrio nos níveis de EROs intracelular que cause um efeito citotóxico. Enquanto para as células HEP-2, estes estímulos provocados pela irradiação poderiam gerar radicais livres que possam causar danos ao DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, provocando a morte celular (Valko *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007). Do mesmo modo, as clorinas **11-a** e **11-b** mostraram um decréscimo na porcentagem de células apoptóticas de 90% para um 75% como pode ser observado nas imagens G e H da Figura 24, respectivamente. Igualmente, os controles negativos destas clorinas (Figura 24C-D) não apresentaram células em processo de apoptose ou necrose. Por último, é importante mencionar que as clorinas **11a-b** tiveram uma ação fotodinâmica similar do que as clorinas **10a-b**, em consequência do aumento da concentração que foi 5,0 vezes menos ativas com relação à clorina **10-a** e 2,0 vezes com relação à clorina **10-b**.

Figura 24 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais HeLa após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC_{50} respectivamente, (dose de $6 J cm^{-2}$)

4.9.5 Células Vero irradiadas na dose 3 J cm⁻²

As imagens de microscopia para as células não tumorais Vero tratadas com as clorinas **10-a** e **10-b** na concentração de IC₅₀ mostraram um mecanismo de apoptose no estado tardio (ao redor de 90%) sem a presença de células viáveis e um 10% de células necróticas observadas nas imagens E e F da Figura 25. Os controles destas duas clorinas exibiram células em processo de apoptose (em torno de 5-8%) e um 92% de células viáveis como é visualizado na Figura 25A-B. Esta porcentagem de células em apoptose poderia ser causada pela estimulação da luz gerada pelo LED vermelho. Por outro lado, as clorinas **11-a** e **11-b** também apresentaram um valor de 90% das células em apoptose aproximadamente, mas com a diferença que foi observado células em estado inicial de apoptose em torno de 30% (Figura 25G-H). Enquanto para os controles negativos, observou-se uma menor porcentagem de células em apoptose ao redor de 6% (Figura 25C-D).

A escolha das células Vero para estes ensaios foi devido ao grande número de resultados obtidos em estudos de virologia, assim como em muitas outras aplicações, incluindo a propagação e estudo de bactérias intracelulares (por exemplo, *Rickettsia* spp.) e parasitas (por exemplo, *Neospora*) e avaliação dos efeitos de substâncias químicas, toxinas e outras substâncias em células de mamíferos a nível molecular (Ammerman *et al.*, 2009).

Estes resultados foram importantes para nossos estudos, uma vez que as clorinas **10a-b** e **11a-b** exibiram uma baixa fototoxicidade após o tratamento fotodinâmico com uma alta porcentagem de células em apoptose. Além disso, corroborando os ensaios colorimétricos por MTT para este tipo de célula discutido no item 4.8.3.

Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais Vero após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC₅₀ respectivamente, (dose de 3 J cm⁻²)

4.9.6 Células Vero irradiadas na dose 6 J cm⁻²

Os resultados obtidos para as células Vero tratadas com as clorinas **10-a** e **10-b** na dose 6 J cm⁻² mostrou um aumento na porcentagem de células em estado necrótico ao redor de (20-25%) em relação à dose 3 J cm⁻² que foi de 10% aproximadamente (Figura 26E-F). Enquanto para as clorinas **11-a** e **11-b**, a porcentagem de células necróticas não teve um aumento significativo (em torno de 15%), mas apresentou uma diminuição importante na porcentagem de células em apoptose inicial caindo para uns 5% (Figura 26G-H). Estas alterações no mecanismo de morte celular na célula foram observadas detalhadamente pela mudança na coloração nas células apoptóticas devido à intensidade apresentada e provocada pela mudança no potencial de membrana permitindo a entrada BE na célula. Os controles negativos para as moléculas **10a-b** e **11a-b** exibiram uma maior porcentagem de células em apoptose em torno de 10% em comparação com a dose 3 J cm⁻².

As informações morfológicas observadas pela coloração diferencial com LA/BE sugerem que as clorinas **10a-b** e **11a-b** induzem a morte celular por apoptose em todas as linhagens celulares estudadas. No entanto, a via de indução deste processo apoptótico ainda não está completamente compreendida, uma vez que a mitocôndria desempenha um papel importante no processo de apoptose (via intrínseca). Por último, todas as análises de microscopia foram realizadas em duplicata e em lâminas de cultivo de oito poços.

Figura 26 – Imagens de microscopia de fluorescência das células tumorais Vero após 24 h do tratamento fotodinâmico e 2 h de incubação. A, B, C e D) controle negativo sem FS. E, F, G e H) clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** na concentração de IC_{50} respectivamente, (dose de $6 J cm^{-2}$)

4.10 Acumulação Intracelular dos FSs por Microscopia Confocal

A acumulação intracelular foi realizada em lâminas de cultivo de oito câmaras e utilizada uma concentração de clorina de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para todos os ensaios. As clorinas foram excitadas em 431 nm para sua detecção no microscópio confocal. As análises de acumulação das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** em função do tempo de acumulação para a célula HeLa são exibidas na Figura 27.

4.10.1 Células HeLa

As imagens de microscopia confocal da Figura 27 apresentam os três períodos de incubação das clorinas **10a-b** e **11a-b** nas células tumorais HeLa, assim como, seus controles sem FS (Figura 27: 1A, 2A, 3A e 4A). Após 30 minutos de incubação, a clorina **10-a** exibiu uma emissão de fluorescência (cor vermelha) mais intensa do que a clorina **10-b** e esta a sua vez, foi maior do que as outras duas clorinas sintetizadas mostradas na Figura 27: 1B, 2B, 3B e 4B. Portanto, à medida que as moléculas penetram a bicamada lipídica da membrana, haverá uma maior concentração que será proporcional à intensidade de fluorescência. Depois de 1 h de incubação, as moléculas **10-a** e **10-b** seguiram mostrando uma rápida penetração através da membrana em comparação às moléculas **11-a** e **11-b** mostrando uma maior intensidade de fluorescência (Figura 27: 1D, 2D, 3D e 4D). Quando foi visualizada a emissão de fluorescência no período de 2 h, a clorina **10-a** (Figura 27: 1D) apresentou a maior intensidade em comparação com as outras três clorinas sintetizadas. Este resultado mostrou que o tempo de incubação de 2 h escolhido para estes ensaios foi ideal para as clorinas **10a-b**, uma vez que uma grande concentração de moléculas foi observada dentro das células. No entanto, para as clorinas **11a-b**, este tempo de incubação poderia não ser suficiente dado que, o número de moléculas dentro do citoplasma da célula foi menor em relação às moléculas **10a-b**, refletido na intensidade de fluorescência. Esta diferença entre as clorinas pode ser explicada pelo coeficiente de partição (Log P), uma vez que é uma propriedade importante que determina o caráter lipofílico das moléculas para penetrar a membrana. Espera-se que moléculas mais lipofílicas atravessem a membrana mais fácil do que moléculas menos lipofílicas. No entanto, neste caso em

particular, as moléculas **10-a** e **10-b** apresentaram as melhores características anfifílicas em relação às moléculas **11-a** e **11-b** (mencionado no item 4.6) provocando uma rápida penetração através da célula. Além disso, estes resultados de acumulação foram coerentes com os valores de IC_{50} obtidos para esta linhagem celular mencionado no item 4.8.2.

Figura 27 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral HeLa tratadas com as clorinas: 1) 10-a, 2) 10-b, 3) 11-a e 4) 11-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.

Fonte: Autoria própria.

4.10.2 Células HEP-2

A acumulação intracelular das clorinas **10-a**, **10-b**, **11-a** e **11-b** nas células tumorais HEP-2 são mostradas na Figura 28. Nos primeiros 30 minutos de incubação, as clorinas **10a-b** exibiram uma maior emissão de fluorescência em comparação com as clorinas **11a-b** (Figura 28: 1B, 2B, 3B e 4B). Porém, a clorina **10-b** apresentou a maior intensidade de fluorescência ((Figura 28: 2B) e a clorina **11-b** a menor intensidade ((Figura 28: 4B). Ademais, este resultado de fluorescência é corroborado com o valor de IC_{50} onde a molécula **10-b** mostrou ser mais fototóxica do que a molécula **10-a**. Após 1 h de incubação, pode-se observar um aumento na fluorescência nas clorinas **10a-b**, assim como nas clorinas **11a-b** provocado pelo aumento no número de moléculas dentro da célula tumoral (Figura 28: 1C, 2C, 3C e 4C). No entanto, as clorinas **10-a** e **10-b**, assim como nas células HeLa, exibiram uma rápida penetração através da membrana plasmática em relação às clorinas **11-a** e **11-b** onde a intensidade de fluorescência foi menor. Do mesmo modo, ao final das 2 h de incubação, foi visualizada uma grande intensidade de fluorescência das clorinas **10-a** e **10-b** dentro da região citoplasmática da célula tumoral em comparação as clorinas **11-a** e **11-b** (Figura 28: 1D, 2D, 3D e 4D) o que intui que o tempo de acumulação de 2 h para as clorinas **10a-b** também foi suficiente para que todas moléculas atrevessem a membrana, enquanto as clorinas **11a-b** necessitariam de um tempo maior de incubação. Neste caso, a ordem crescente de acumulação celular foi $10-b > 10-a > 11-a > 11-b$. É importante ressaltar que todas as informações de fluorescência obtidas para cada clorina foi comparada com seu controle negativo (Figura 28: 1A, 2A, 3A e 4A).

Figura 28 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral HEp-2 tratadas com as clorinas: 1) 10-a, 2) 10-b, 3) 11-a e 4) 11-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.

Fonte: Autoria própria.

4.10.3 Células Vero

Com o intuito de se comparar o processo de acumulação das clorinas **10-a** e **10-b** tanto nas células tumorais quanto nas células não tumorais, foram realizadas as análises nas células Vero nos mesmos tempos de incubação. No período de 30 minutos, percebeu-se uma rápida penetração do clorina **10-a** através da membrana citoplasmática em comparação com a clorina **10-b** ocupando toda a região citoplasmática da célula sem permear o núcleo celular (Figura 29: 1B, 2B), embora uma quantidade de FS seja observada no ambiente externo da célula. Quando as

células foram incubadas com o FS durante 1 h, foi exibida uma alta fluorescência em todas as células analisadas, assim como uma diminuição de FS fora da célula (Figura 29: 1C, 2C). Por último, as análises de 2 h de incubação da clorina **10-a** exibiram o mesmo padrão de fluorescência do que as células incubadas por 1h (Figura 29: 1D, 2D). Em todos os ensaios de incubação, foi realizado um controle das células sem FS já que não apresentam fluorescência (Figura 29:1A, 2A). A rápida permeabilidade da clorina **10-a** através das células Vero nos ensaios de incubação intracelular trouxe um maior entendimento nos estudos fototóxicos destas moléculas como possíveis FSs para serem utilizados na TFD. Mesmo com uma alta concentração deste composto nas células não há maior morte celular, tendo em conta que estes tipos de FSs são mais seletivos às células neoplásicas por uma variedade de características morfológicas (Castano *et al.*, 2005a) e diferenças de pH entre os tecidos saudáveis e tumorais que podem contribuir para esta seletividade (Gerweck e Seetharaman, 1996).

Figura 29 – Imagens de microscopia confocal da linhagem não tumoral Vero tratadas com as clorinas: 1) 10-a e 2) 10-b, em diferentes tempos de incubação: A) controle negativo sem FS, B) 30 min, C) 60 min e D) 120 min no comprimento de onda de excitação 431-557 nm e objetiva de 40X.

Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

- Mediante a reação de Diels-Alder foram sintetizadas clorinas regioisomeras com uma conformação tipo L que previne agregação com rendimentos >65%. Além disso, foram caracterizadas a partir de técnicas espectroscópicas como RMN ^1H e ^{13}C , assim como massas de alta resolução (HRMS).
- Valores de rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_0) clorinas 10-a e 10-b >clorinas 11-a e 11-b $\sim$ verteporfina.
- Os valores de log P indicam que as clorinas sintetizadas são anfifílicas. A ordem crescente de anfifilicidade foi 10-b<10-a<11-b<11-a<Verteporfina.
- Clorinas sintetizadas não apresentam citotoxicidade no escuro.
- Clorinas 10-a e 10-b são $\sim 3\text{x}$ mais fototóxicas em células tumorais que verteporfina > clorinas 11-a e 11-b.
- Clorinas 10-a e 10-b apresentam alta toxicidade (IC_{50} da ordem de nM) em baixas doses de luz.
- As clorinas sintetizadas desencadeiam morte celular por apoptose.
- As clorinas sintetizadas apresentam diversas características que sugerem um bom potencial para uso como fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

ABELS, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 765-771, 2004.

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, p. 347-364, 2016.

AGGARWAL, B.; VIJAYALEKSHMI, R.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 425-430, 2009.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.; FOSTER, T.; GIROTTI, A.; GOLLNICK, S., HAHN, S., HAMBLIN, M., JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B.; AND GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **Ca-a Cancer Journal For Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

ALLISON, B.; PRITCHARD, P.; LEVY, J. Evidence for low-density-lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 5, p. 833-839, 1994.

ALLISON, R.; SIBATA, C. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61-75, 2010.

AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; AZAD, A. F. Growth and maintenance of vero cell lines. **Current Protocols in Microbiology**, APPENDIX-4E, 2009.

ASHUR, I.; GOLDSCHMIDT, R.; PINKAS, I.; SALOMON, Y.; SZEWCZYK, G.; SARNA, T.; SCHERZ, A. Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative wst11, noncovalently bound to serum albumin. **Journal of Physical Chemistry a**, v. 113, n. 28, p. 8027-8037, 2009.

BELLNIER, D.; GRECO, W.; LOEWEN, G.; NAVA, H.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, T. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 439-444, 2006.

BERLANDA, J.; KIESSLICH, T.; OBERDANNER, C.; OBERMAIR, F.; 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**, v. 25, n. 1-2, p. 173-188, 2006.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BJORN, L.; PAPAGEORGIOU, G.; BLANKENSHIP, R.; GOVINDJEE, A. viewpoint: Why chlorophyll a? **Photosynthesis Research**, v. 99, n. 2, p. 85-98, 2009.

BOSO, G.; KE, D.; KORZH, B.; BOUILLLOUX, J.; LANGE, N.; ZBINDEN, H. Time-resolved singlet-oxygen luminescence detection with an efficient and practical semiconductor single-photon detector. **Biomedical Optics Express**, v. 7, n. 1, p. 211-224, 2016.

BUYTAERT, E.; CALLEWAERT, G.; VANDENHEEDE, J.; AND AGOSTINIS, P. Deficiency in apoptotic effectors bax and bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. **Autophagy**, v. 2, n. 3, p. 238-240, 2006.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005a.

CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005b.

CASTANO, A.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 535-545, 2006.

CHEN, X.; ZHANG, L.; LI, F.; FAN, Y.; WANG, W.; LI, B.; SHEN, Y. Synthesis and antifungal evaluation of a series of maleimides. **Pest Management Science**, v. 71, n. 3, p. 433-440, 2015.

CORREA, J.; BAGNATO, V.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387-1394, 2012.

DA SILVA, E.; PEDERSEN, B.; BREITENBACH, T.; TOFTEGAARD, R.; KUIMOVA, M.; ARNAUT, L.; OGILBY, P. Irradiation and sensitizer-dependent changes in the lifetime of intracellular singlet oxygen produced in a photosensitized process. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 445-461, 2012.

DA SILVA, E.; PIMENTA, F.; PEDERSEN, B.; BLAIKIE, F.; BOSIO, G.; BREITENBACH, T.; WESTBERG, M.; BREGNHOJ, M.; ETZERODT, M.; ARNAUT, L.; OGILBY, P. Intracellular singlet oxygen photosensitizers: on the road to solving the problems of sensitizer degradation, bleaching and relocalization. **Integrative Biology**, v. 8, n. 2, p. 177-193, 2016.

DABROWSKI, J.; ARNAUT, L. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1765-1780, 2015.

DABROWSKI, J.; ARNAUT, L.; PEREIRA, M.; URBANSKA, K.; SIMOES, S.; STOCHEL, G.; CORTES, L. Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: Evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 7, p. 1188-1200, 2012.

DABROWSKI, J.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOŁ, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 325, p. 67-101, 2016.

DABROWSKI, J. M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. In: VAN ELDIK, R. e HUBBARD, C. D. (Ed.). **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 70, p. 343-394, 2017.

DAI, T.; FUCHS, B.; COLEMAN, J.; PRATES, R.; ASTRAKAS, C.; ST DENIS, T.; RIBEIRO, M.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN, M.; TEGOS, G. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

DARZYNKIEWICZ, Z.; TRAGANOS, F.; WLODKOWIC, D. Impaired DNA damage response - An Achilles' heel sensitizing cancer to chemotherapy and radiotherapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1-3, p. 143-150, 2009.

DE ASSIS, F.; DE SOUZA, J.; ASSIS, B.; BROCKSOM, T.; DE OLIVEIRA, K. Synthesis and photophysical studies of a chlorin sterically designed to prevent self-aggregation. **Dyes and Pigments**, v. 98, n. 1, p. 153-159, 2013.

DE OLIVEIRA, K.; MOMO, P.; DE ASSIS, F.; FERREIRA, M.; BROCKSOM, T. Chlorins: natural sources, synthetic developments and main applications. **Current Organic Synthesis**, v. 11, n. 1, p. 42-58, 2014.

DICKINSON, B.; CHANG, C. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, 2011.

DOLMANS, D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DOS SANTOS, F.; UCHOA, A.; BAPTISTA, M.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O.; BROCKSOM, T.; DE OLIVEIRA, K. Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 2, p. 402-411, 2013.

DOUGHERTY, T. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 38, n. 3, p. 377-379, 1983.

EDINGER, A.; THOMPSON, C. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663-669, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENGEL, T.; KICKELBICK, G. Thermoreversible reactions on inorganic nanoparticle surfaces: diels-alder reactions on sterically crowded surfaces. **Chemistry of Materials**, v. 25, n. 2, p. 149-157, 2013.

ENGELMANN, F.; ROCHA, S.; TOMA, H.; ARAKI, K.; BAPTISTA, M. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 12-18, 2007.

ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 340-362, 2011.

FERREIRA, J.; MENEZES, P.; KURACHI, C.; SIBATA, C.; ALLISON, R.; BAGNATO, V. Photostability of different chlorine photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 5, n. 2, p. 156-161, 2008.

FERY-FORGUES, S. L., D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. **Journal of Chemical Education**, v. 76, n. 9, p. 1260-1264, 1999.

GALEZOWSKI, M.; GRYKO, D. Recent advances in the synthesis of hydroporphyrins. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 15, p. 1310-1338, 2007.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KRAUTWALD, S.; KROEMER, G.; LINKERMANN, A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 35, p. 24-32, 2014.

GAO, J.; BERNATCHEZ, C.; SHARMA, P.; RADVANYI, L.; HWU, P. Advances in the development of cancer immunotherapies. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 90-98, 2013.

GERWECK, L.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. **Cancer Research**, v. 56, n. 6, p. 1194-1198, 1996.

GHIBELLI, L.; COPPOLA, S.; ROTILIO, G.; LAFAVIA, E.; MARESCA, V.; CIRIOLO, M. Nonoxidative loss of glutathione in apoptosis via gsh extrusion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 216, n. 1, p. 313-320, 1995.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GRAMLICH, W.; ROBERTSON, M.; HILLMYER, M. Reactive compatibilization of poly(l-lactide) and conjugated soybean oil. **Macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 2313-2321, 2010.

GRIVENNIKOV, S.; GRETEN, F.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Oxygen: boon yet bane-introducing oxygen and reactive species. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. United Kingdom: Oxford University Press, 2015. p. 1-29.

HEATH, W.; PALMIERI, F.; ADAMS, J.; LONG, B.; CHUTE, J.; HOLCOMBE, T.; ZIEREN, S.; TRUITT, M.; WHITE, J.; WILLSON, C. Degradable cross-linkers and strippable imaging materials for step-and-flash imprint lithography. **Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 719-726, 2008.

HUANG, L.; HUANG, Y.; MROZ, P.; TEGOS, G.; ZHIYENTAYEV, T.; SHARMA, S.; LU, Z.; BALASUBRAMANIAN, T.; KRAYER, M.; RUZIE, C.; YANG, E.; KEE, H.; KIRMAIER, C.; DIERS, J.; BOCIAN, D.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J.; HAMBLIN, M. Stable synthetic cationic bacteriochlorins as selective antimicrobial photosensitizers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3834-3841, 2010.

HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, n. 3, p. 283-293, 2005.

ISHII, K. Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 15-16, p. 1556-1568, 2012.

JACKSON, A.; RAO, K.; WILKINS, M. Synthetic and biosynthetic-studies of porphyrins. 11. the synthesis of meso oxygenated protoporphyrins. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n. 2, p. 307-312, 1987.

JUARRANZ, A.; JAEN, P.; SANZ-RODRIGUEZ, F.; CUEVAS, J.; GONZALEZ, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. **Clinical & Translational Oncology**, v. 10, n. 3, p. 148-154, 2008.

JUZENAS, P.; MOAN, J. Singlet oxygen in photosensitization. **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 29-50, 2006.

JUZENIENE, A.; MOAN, J. The history of PDT in norway part one: Identification of basic mechanisms of general PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2007.

KARIM, S. P.; ADELMAN, R. A. Profile of verteporfin and its potential for the treatment of central serous chorioretinopathy. **Clin Ophthalmol**, v. 7, p. 1867-75, 2013.

KEMPA, M.; KOZUB, P.; KIMBALL, J.; ROJKIEWICZ, M.; KUS, P.; GRYCZYNSKI, Z.; RATUSZNA, A. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 146, p. 249-254, 2015.

KIESSLICH, T.; NEUREITER, D.; ALINGER, B.; JANSKY, G. L.; BERLANDA, J.; MKRTCHYAN, V.; OCKER, M.; PLAETZER, K.; BERR, F. Uptake and phototoxicity of meso-tetrahydroxyphenyl chlorine are highly variable in human biliary tract cancer cell lines and correlate with markers of differentiation and proliferation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 734, 2010.

KOCKI, T.; CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, B.; KOCKA, K.; STOLARSKA, M.; WACHOWSKA, D.; LIJEWSKI, S. Nurses and pharmacists in interdisciplinary team of health care providers in photodynamic therapy. In: Tanaka, Y. (Ed.). **Photomedicine - Advances in Clinical Practice**. InTechOpen, 2017. v. Edited, p. 113-133.

KONAN, Y.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KORBELIK, M.; KROSL, G. Photofrin accumulation in malignant and host-cell populations of a murine fibrosarcoma. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, n. 1, p. 162-168, 1995.

KRALJIC, I.; SHARPATYI, V. Determination of singlet oxygen rate constants in aqueous-solutions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4-5, p. 583-586, 1978.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of reactive oxygen species. **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences**. NONELL, S. e FLORS, C. Cambridge CB4 0WF, UK: The Royal Society of Chemistry. 13: 3-21 p. 2016.

KRUPENIE, P. H. The spectrum of molecular oxygen. **Journal of Physical and Chemical reference data**, v. 1, n. 2, p. 423, 1972.

KRZYKAWSKA-SERDA, M.; DABROWSKI, J.; ARNAUT, L.; SZCZYGIEL, M.; URBANSKA, K.; STOCHEL, G.; ELAS, M. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 239-251, 2014.

LESSER, M. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 253-278, 2006.

LONG, C.; KEARNS, D. R. Selection rules for the intermolecular enhancement of spin forbidden transitions in molecular oxygen. **Journal of Chemical Physics**, v. 59, n. 10, p. 5729-36, 1973.

LUCKY, S.; SOO, K.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990-2042, 2015.

LYONS, T.; REINHARD, C.; PLANAVSKY, N. The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 307-315, 2014.

MACDONALD, I.; DOUGHERTY, T. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105-129, 2001.

MAK, S. T.; WONG, A. C. M. Single-session combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy for chronic central serous chorioretinopathy: a pilot study at 12-month follow-up. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, n. 1, p. 401-402, 2013.

MASTER, A.; LIVINGSTON, M.; SEN GUPTA, A. Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 1, p. 88-102, 2013.

MERLIN, J.; AZZI, S.; LIGNON, D.; RAMACCI, C.; ZEGHARI, N.; GUILLEMIN, F. Mtt assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumor-cells to photodynamic therapy. **European Journal of Cancer**, v. 28A, n. 8-9, p. 1452-1458, 1992.

MION, G.; MARI, C.; DA ROS, T.; RUBBIANI, R.; GASSER, G.; GIANFERRARA, T. Towards the synthesis of new tumor targeting photosensitizers for photodynamic therapy and imaging applications. **Chemistryselect**, v. 2, n. 1, p. 190-200, 2017.

MONTALTI, M.; CREDI, A.; PRODI, L.; GANDOLFI, M. T. Photophysical properties of organic compounds. In: **Handbook of photochemistry**. New York: CRC Press, 2006. Third ed. p. 83-146.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell death pathway in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-39, 2011.

NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K.; YAMAGATA, H.; INOHARA, H.; KUBO, T.; TSUJIMOTO, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 652-658, 2005.

NAPARTOVICH, A.; DERYUGIN, A.; KOCHETOV, I. Discharge production of the singlet delta oxygen for an iodine laser. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 34, n. 12, p. 1827-1833, 2001.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 349-361, 2013.

NIEDZIELSKA, E.; SMAGA, I.; GAWLIK, M.; MONICZEWSKI, A.; STANKOWICZ, P.; PERA, J.; FILIP, M. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 4094-4125, 2016.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; KAROCKI, A.; ELAS, M.; PAWLAK, A.; STOCHEL, G.; URBANSKA, K. Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 2, p. 549-555, 2006.

NSEYO, U. O. Photodynamic therapy. **Urologic Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 591-599, 1992.

NYMAN, E.; HYNINEN, P. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, 2004.

O'CONNOR, A.; GALLAGHER, W.; BYRNE, A. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.

OLEINICK, N.; MORRIS, R.; BELICHENKO, T. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.

ORMOND, A.; FREEMAN, H. Effects of substituents on the photophysical properties of symmetrical porphyrins. **Dyes and Pigments**, v. 96, n. 2, p. 440-448, 2013.

OSTERLOH, J.; VICENTE, M. Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 6, n. 5, p. 305-324, 2002.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.; ZHOU, T.; LIU, B.; BAO, J. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

PADMA, V. An overview of targeted cancer therapy. **Biomedicine-Taiwan**, v. 5, n. 4, p. 1-6, DEC 2015

PAVLOV, V. Modern aspects of the chemistry of protoporphyrin IX. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 1-34, 2007.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERL, P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 172-177, 2002.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

POOLER, J.; VALENZENO, D. Physicochemical determinants of the sensitizing effectiveness for photo-oxidation of nerve membranes by fluorescein derivatives. **Photochemistry and Photobiology**, v. 30, n. 4, p. 491-498, 1979.

POTTIER, R.; KENNEDY, J. new trends in photobiology (invited review) - the possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1990.

PROSKURYAKOV, S.; GABAI, V. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 56-68, 2010.

RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. Mechanism of synergistic effect of chemotherapy and immunotherapy of cancer. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 60, n. 3, p. 419-423, 2011.

REDMOND, R.; GAMLIN, J. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 4, p. 391-475, 1999.

REINERS, J.; AGOSTINIS, P.; BERG, K.; OLEINICK, N.; KESSEL, D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 7-18, 2010.

ROBERTS, W.; HASAN, T. Role of neovasculature and vascular-permeability on the tumor retention of photodynamic agents. **Cancer Research**, v. 52, n. 4, p. 924-930, 1992.

ROBERTSON, C.; EVANS, D.; ABRAHARNSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

SCHEE, H. An overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In: Grimm, B.; Porra, R. J.; Rüdiger, W.; Scheer, H. (Eds.). **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Advances in Photosynthesis and Respiration**. Netherlands: Springer, 2006. v. 25, p.1-26.

SCHMIDT-ERFURTH, U.; MILLER, J. W.; SICKENBERG, M.; LAQUA, H.; BARBAZETTO, I.; GRAGOUDAS, E. S.; ZOGRAFOS, L.; PIGUET, B.; POURNARAS, C. J.; DONATI, G.; LANE, A. M.; BIRNGRUBER, R.; VAN DEN BERG, H.; STRONG, H. A.; MANJURIS, U.; GRAY, T.; FSADNI, M.; BRESSLER, N. M. Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: Results of retreatments in a phase I and 2 study. **Archives of Ophthalmology**, v. 117, n. 9, p. 1177-1187, 1999.

SCHMIDT-ERFURTH, U.; HASAN, T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 3, p. 195-214, 2000.

SHI, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, J.; PAN, J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 11, p. 1215-1228, 2012.

SIVERY, A.; ANQUEZ, F.; PIERLOT, C.; AUBRY, J.; COURTADE, E. Singlet oxygen ($O_1(2)$) generation upon 1270 nm laser irradiation of ground state oxygen ($O_3(2)$) dissolved in organic solvents: Simultaneous and independent determination of $O_1(2)$ production rate and reactivity with chemical traps. **Chemical Physics Letters**, v. 555, p. 252-257, 2013.

SKUPIN-MRUGALSKA, P.; SOBOTTA, L.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M.; MIELCAREK, J.; DUZGUNES, N. Cellular changes, molecular pathways and the immune system following photodynamic treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 35, p. 4059-4073, 2014.

SMITH, A. M.; MANCINI, M. C.; NIE, S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. **Nat Nanotechnol**, v. 4, n. 11, p. 710-1, 2009.

SMITH, S.; RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N.; NORRIS, D.; SHELLMAN, Y.; CONN, P. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture**, v. 112, p. 361-368, 2012.

SORTINO, M.; FILHO, V.; CORREA, R.; ZACCHINO, S. N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: Time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 560-568, 2008.

SORTINO, M.; GARIBOTTO, F.; CECHELINEL, V.; GUPTA, M.; ENRIZ, R.; ZACCHINO, S. Antifungal, cytotoxic and SAR studies of a series of N-alkyl, N-aryl and N-alkylphenyl-1,4-pyrrolediones and related compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2823-2834, 2011.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145-158, 1998.

TIAN, W.; SHI, W.; YANG, H.; CUI, R.; DENG, L. Production of singlet oxygen by the reaction of non-basic hydrogen peroxide with chlorine gas. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 38, p. 13344-13349, 2012.

TONG, L.; CHUANG, C.; WU, S.; ZUO, L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 18-25, 2015.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J.; STEWART, F. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006.

UCHOA, A.; DE OLIVEIRA, K.; BAPTISTA, M.; BORTOLUZZI, A.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O. Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 8824-8832, 2011.

VALKO, M.; RHODES, C.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 237-251, 2012.

WILKINSON, F.; HELMAN, W.; ROSS, A. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution - an expanded and revised compilation. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 24, n. 2, p. 663-1021, 1995.

WINTERBOURN, C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WIRAWAN, E.; BERGHE, T.; LIPPENS, S.; AGOSTINIS, P.; VANDENABEELE, P. Autophagy: for better or for worse. **Cell Research**, v. 22, n. 1, p. 43-61, 2012.

XU, K.; THORNALLEY, P. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 165-177, 2001.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clin Endosc**, v. 46, n. 1, p. 7-23, 2013.

YUAN, F.; LEUNIG, M.; BERK, D.; JAIN, R. Microvascular permeability of albumin, vascular surface-area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma Is174t using dorsal chamber in scid mice. **Microvascular Research**, v. 45, n. 3, p. 269-289, 1993.

ZHOU, Z.; SONG, J.; NIE, L.; CHEN, X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. **Chem Soc Rev**, v. 45, n. 23, p. 6597-6626, 2016.

ANEXOS

Síntese da protoporfirina IX dimetil éster

Procedimento: Em um balão volumétrico foram adicionados 2,0 g de hematoporfirina (3,34 mmol), um litro (1000 mL) de clorobenzeno, além de 5 g de ácido p-toluensulfônico (APTS) (30 mmol) em refluxo durante 3 h a 140°C em atmosfera de nitrogênio (N₂). Após disso, o clorobenzeno foi evaporado sob pressão reduzida e adicionado à reação 670 ml de uma solução metanólica ácida (H₂SO₄ 5% (v/v)) durante 12 h com proteção da luz. Em seguida, a reação foi esfriada e neutralizada com hidróxido de amônia (NH₄OH). O produto da reação foi extraído com diclorometano (CH₂Cl₂) (4 x 100 mL) e a fase orgânica lavada com sulfato de sódio (Na₂SO₄). A PpIX dimetil éster foi obtida após evaporação do solvente e posterior cristalização com uma mistura CHCl₃:MeOH (1:3).

Rendimento: 1.59 g (2.70 mmol) 75%

Pp IX dimetil éster: ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: -3.69 (s, 2H), 3.28 (t, 4H, J = 7.7 Hz); 3.56 (s, 3H); 3.61 (s, 3H); 3.62 (s, 6H), 3.65 (s, 3H); 3.70 (s, 3H); 4.34 (t, 4H, J = 7.7 Hz); 6.16 (d, 2H, J = 11.5 Hz); 6.35 (d, 2H, J = 17.8 Hz), 8.27 (dd, 2H, J = 17.9 Hz, J = 11.3 Hz); 9.92 (s, 3H); 9.93 (s, 1H); 10.05 (s, 3H); 10.06 (s, 3H).

Síntese de 4,10-Dioxatriciclo[5.2.1.0]dec-8-eno-3,5-diona (3)

Procedimento: Em um balão de 100 ml foi adicionado 10.00 g (102 mmol) anidrido maleico (1), 50 ml tolueno e 7.5 ml (103.1 mmol) furano (2). A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente sob atmosfera inerte por 24 h. O produto foi obtido após filtração e lavado com dietil éter frio.

Rendimento: 13.57 g (81.73 mmol) 80%.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.56 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 3.29 (s, 2H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 172.0, 137.3, 82.1, 49.5.

Síntese de 4-(2-Hidroxi-etil)-10-oxa-4-aza-triciclo [5.2.1.0]-dec-8-eno-3,5-diona (4)

Procedimento: Em um balão de 50 ml adaptado com um condensador de refluxo foi adicionado 5.0 g (30.1 mmol) do composto 3 com 15 ml metanol seco. Após estabilizar a agitação foram adicionados 1.84 g (30.12 mmol) a 0°C lentamente e deixado por 24 h em refluxo. Ao final da reação, o metanol foi destilado sob pressão reduzida e o composto 4 foi recristalizado com dietil éter (-20°C).

Rendimento: 3.81 g (18.21 mmol) 61%.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.53 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.39 (s, 4H), 2.90 (s, 2H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 176.9, 136.9, 80.7, 57.7, 47.6, 41.0.

Síntese de 1-(2-Hydroxyethyl)-1H-pyrrole-2,5-diona (5)

Procedimento: Em um balão de 50 ml foi adicionado 2,30 g (10,99 mmol) e 30 ml de tolueno anidro por 7 h em agitação e refluxo. Em seguida, o produto foi filtrado e recristalizado em solvente tolueno.

Rendimento: 1.25 g (8.87 mmol) 81%.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.01 (s, 2H), 4.78 (br, 1H), 3.46 (br, 4H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 171.1, 134.5, 57.9, 39.9.

Síntese do ácido N-fenilpropil maleico

Procedimento: Em um balão de 50 ml foi colocado uma mistura de ácido maleico 1 (500 mg) e quantidades equimolares de Ph-(CH₂)₃-NH₂ dissolvido em 10 ml de clorofórmio (CHCl₃) durante 3 h sob agitação. O composto precipitado da reação foi filtrado e lavado lentamente com água.

Rendimento: 85%

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.96 (q, 2H), 2.70 (t, 2H), 3.42 (dd, 2H), 6.23 (d, 1H), 6.31 (d, 1H), 7.20 (m, 5H), 7,29 (m, 1H, NH)

Síntese de N-fenilpropil maleimida

Procedimento: Em um balão de 25 ml foi colocado o ácido N-fenilpropil maleico em refluxo com uma mistura de anidrido acético/acetato de sódio (10 ml) durante 4 h. o produto foi extraído com Et₂O e secado com Na₂SO₄, filtrado e o solvente evaporado.

Rendimento: 45%

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.94 (m, 2H), 2.63 (t, 2H), 3.58 (t, 2H), 6.65 (s, 2H), 7.18-7.26 (m, 5H)

Síntese dos compostos 10-a e 10-b

Procedimento: Foram misturados 60,0 mg (0,1 mmol) do composto **9**, em 5,0 mL de tolueno anidro/desoxigenado e 282,3 mg (2,0 mmol) do composto **5**, e em seguida foi adicionado quantidades catalíticas de BHT . A mistura reacional foi purgada com argônio e aquecida a 125°C sob agitação em tubo selado (sistema Sealed tube Aldrich®) durante 24h. Após este período a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica “flash” utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio:acetato de etila:etanol (5:4:1).Foram obtidos os dois produtos **10-a** e **10-b** os quais foram cristalizados com CH₂Cl₂ /hexano.

Rendimento global: 67%

Rendimento 10-a: 33%

Rendimento 10-b: 34%

Composto 10-a: ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): -2.49 (s, 2H₂); 2.01 (s, 3H); 3.13 - 3.17 e 3.20 - 3.24 (m, 9H); 3.40 (s, 3H); 3.42 - 3.45 (m, 2H); 3.50 (s, 3H); 3.54 (s, 3H); 3.66 e 3.69 (s, 6H); 3.75 - 3.79 (m, 1H); 4.18 (t, 2H, J=7.8 Hz); 4.31 (t, 2H, J=7.7 Hz), 4.51 (d, 1H, J=8.4 Hz); 6.15 (dd, 1H, J=1.4 Hz, J=11.5 Hz); 6.34 (dd, H, J= 1.4 Hz e J=17.8 Hz); 7.35 (t, 1H, J=5.3 Hz); 8.17 (dd, 1H, J=17.8 Hz e 11.5 Hz); 9.07 (s, 1H); 9.30 (s, 1H); 9.70 (s, 1H), 9.86 (s, 1H).

Composto 10-a: ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 11.4, 11.6; 12.3, 21.5, 21.9, 25.6, 26.5, 36.6, 37.0, 38.5, 50.1, 51.7, 51.8, 52.3, 90.4, 93.4, 97.9, 99.8, 115.6, 121.4, 129.2, 129.8, 130.9, 132.6, 133.7, 133.9, 136.2, 136.5, 138.3, 139.6, 149.5, 151.0, 151.3, 152.2, 165.9, 173.4, 173.8, 174.8, 178.5.

Composto 10-a HRMS (ESI-LTQ orbitrapvelos): m/z calculado [M+H]⁺ 732.33716; encontrado 732.33918.

Composto 10-b: ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): -2.45 (s, 2H₂); 2.01 (s, 3H); 3.13 - 3.18 e 3.20 - 3.25 (m, 9H); 3.41 (s, 3H); 3.41 (s, 3H); 3.45 (s, 3H); 3.50 - 3.57 (m, 2H); 3.62 (s, 3H); 3.64 e 3.65 (s, 6H); 3.74 e 3.79 (m, 1H); 4.17 (t, 2H, J=7.8 Hz); 4.30 (t, 2H, J=7.7 Hz), 4.50 (d, 1H, J=8.4 Hz); 6.12 (dd, 1H, J=1.4 Hz, J=11.5 Hz);

6.34 (dd, H, J=1.4 Hz, J=17.8 Hz); 7.34 (t, 1H, J=5.4 Hz); 8.13 (dd, 1H, J=6.3 Hz e 17.8 Hz); 9.23 (s, 1H); 9.24 (s, 2H), 9.69 (s, 1H), 9.76 (s, 1H).

Composto 10-b: $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 11.2, 11.7, 12.4, 21.6, 21.9, 25.6, 26.6, 36.7, 37.1, 38.6, 50.1, 51.7, 51.8, 52.2, 89.9, 94.1, 98.4, 99.4, 116.0, 120.9, 129.9, 130.4, 131.2, 133.3, 133.8, 135.9, 136.8, 137.3, 138.0, 139.7, 149.6, 150.6, 151.4, 152.8, 165.6, 173.4, 173.8, 174.7, 178.5.

Composto 10-b HRMS (ESI-LTQ orbitrapvelos): m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$ 732.33698; encontrado 732.33918.

Síntese dos compostos 11-a e 11-b

Procedimento: Foram misturados 60,0 mg (0,1 mmol) do composto 9, em 5,0 mL de tolueno anidro/desoxigenado e 430,5 mg (2,0 mmol) do composto 7, e em seguida foi adicionado quantidades catalíticas de BHT. A mistura reacional foi purgada com argônio e aquecida a 130°C sob agitação em tubo selado (sistema Sealed tube Aldrich[®]) durante 24h. Após este período a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica “flash” utilizando-se como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila:diclorometano (6:2:2). Foram obtidos os dois produtos **11-a** e **11-b** os quais foram cristalizados com CH_2Cl_2 /hexano.

Rendimento global: 64%

Rendimento 11-a: 32%

Rendimento 11-b: 32%

Composto 11-a: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): -2.44 (s, 2H); 2.04 (s, 3H); 2.99 - 3.12 e 3.15 - 3.25 (m, 10H); 3.38 (t, 2H); 3.41 (s, 3H); 3.45 (s, 3H); 3.53 (s, 3H); 3.67 (s, 3H); 3.71 (s, 4H); 4.19 (t, 2H, $J=7.8$ Hz); 4.33 (t, 2H, $J=7.7$ Hz), 4.38 (d, 1H, $J=8.4$ Hz); 6.15 (dd, 1H, $J=1.4$ Hz, $J=11.5$ Hz); 6.34 (dd, H, $J=1.4$ Hz e $J=17.8$ Hz); 6.40 (d, 2H); 6.78 (t, 2H); 6.91 (t, 1H); 7.34 (t, 1H, $J=5.3$ Hz); 8.18 (dd, 1H, $J=17.8$ Hz e 11.5 Hz); 9.08 (s, 1H); 9.24 (s, 1H); 9.70 (s, 1H), 9.86 (s, 1H).

Composto 11-a: $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 11.4, 11.6; 12.1, 21.5, 21.9, 25.5, 26.5, 28.3, 32.4, 36.5, 36.9, 38.3, 38.5, 46.0, 49.9, 51.6, 51.8, 52.2, 90.7, 93.7, 97.9, 99.7, 115.9, 121.5, 125.5, 127.7, 129.5, 129.8, 131.2, 132.7, 134.1, 136.6, 136.9, 138.7, 139.3, 140.5, 149.5, 173.4, 173.7, 175.7, 179.5.

Composto 11-a HRMS (ESI-LTQ orbitrapvelos): m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$ 806.38739; encontrado 806.39121.

Composto 11-b: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): -2.41 (s, 2H); 2.03 (s, 3H); 3.05 - 3.12 e 3.14 - 3.21 (m, 10H); 3.38 (s, 5H); 3.44 (s, 3H); 3.64 (s, 4H); 3.66 - 3.67 (ds, 7H); 4.20 (t, 2H); 4.31 (t, 2H, $J=7.8$ Hz); 4.35 (d, 1H, $J=8.4$ Hz); 6.13 (dd, 1H, $J=1.4$ Hz, $J=11.5$ Hz); 6.36 (dd, H, $J=1.4$ Hz, $J=17.8$ Hz); 6.42 (d, 2H); 6.78 (t, 2H); 6.91 (t, 1H); 7.33 (t, 1H, $J=5.4$ Hz); 8.16 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz e 17.8 Hz); 9.18 (s, 1H); 9.25 (s, 2H), 9.69 (s, 1H), 9.77 (s, 1H).

Composto 11-b: $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 11.2, 11.6, 12.4, 21.5, 21.8, 25.5, 26.6, 28.3, 29.7, 32.4, 33.2, 36.5, 36.7, 38.4, 38.6, 39.5, 41.3, 49.8, 51.6, 51.7, 52.2, 98.3, 99.2, 125.5, 126.2, 127.7, 127.8, 128.2, 128.4, 128.5, 129.7, 133.7, 134.3, 140.6, 149.5, 173.3, 173.5, 174.7, 175.6, 179.4.

Composto 11-b HRMS (ESI-LTQ orbitrapvelos): m/z calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$ 806.38831; encontrado 806.39121.

Anexo 1: Espectro de próton (RMN ^1H) da protoporfirina IX dimetil éster

Anexo 2: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da molécula 4,10-dioxatriciclo[5.2.1.0]dec-8-eno-3,5-diona (**3**)

Anexo 3: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da molécula 4-(2-hidroxi-etil)-10-oxa-4-aza-triciclo[5.2.1.0]-dec-8-eno-3,5-diona (**4**)

Anexo 4: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da molécula hidroxietil maleimida (5)

Anexo 5: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do ácido N-fenilpropil maleimida (**6**)

Anexo 6: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da molécula N-fenilpropil maleimida (**7**)

Anexo 7: Espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HRMS da molécula **10-a**

clorina2+_150305143450 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 7.35E5
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 8: Espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HRMS da molécula **10-b**

clorina1+ 150305143450 #4 RT: 0.13 AV: 1 NL: 1.14E6
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

clorina1+ 150305143450 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.10E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Anexo 9: Espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HRMS da molécula **11-a**

Clo2-2sintese_150615153424 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.37E7
T: FTMS + p ESI Full ms [700.00-900.00]

Clo2-2sintese_150615153424 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.37E7
T: FTMS + p ESI Full ms [700.00-900.00]

Anexo 10: Espectros de RMN ^1H , ^{13}C e HRMS da molécula 11-b

Clo1-2sintese_150615153424 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.67E7
T: FTMS + p ESI Full ms [700.00-900.00]

Clo2-2sintese_150615153424 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 1.37E7
T: FTMS + p ESI Full ms [700.00-900.00]

Anexo 11 – A: emissão de oxigênio a 1270 nm, usando soluções do composto 10-a em DMSO. $\lambda_{exc} = 420$ nm.

Anexo 11 – B: emissão de oxigênio a 1270 nm, usando soluções do composto 10-b em DMSO. $\lambda_{exc} = 420$ nm.

Anexo 12 – A: emissão de oxigênio a 1270 nm, usando soluções do composto 11-a em DMSO. $\lambda_{exc} = 420$ nm.

Anexo 12 – B: emissão de oxigênio a 1270 nm, usando soluções do composto 11-b em DMSO. $\lambda_{exc} = 420$ nm.

Anexo 13 – A: fotodegradação da clorina **10-b** em solvente CH_2Cl_2 .

Anexo 13 – B: fotodegradação da clorina **11-b** em solvente CH_2Cl_2 .

Anexo 14 – A: absortividade molar (ϵ) da clorina **10-a** em DMSO e PBS

Anexo 14 – B: absortividade molar (ϵ) da clorina **10-b** em DMSO e PBS

Anexo 15 – A: absorvidade molar (ϵ) da clorina **11-a** em DMSO e PBS

Anexo 15 – B: absorvidade molar (ϵ) da clorina **11-b** em DMSO e PBS