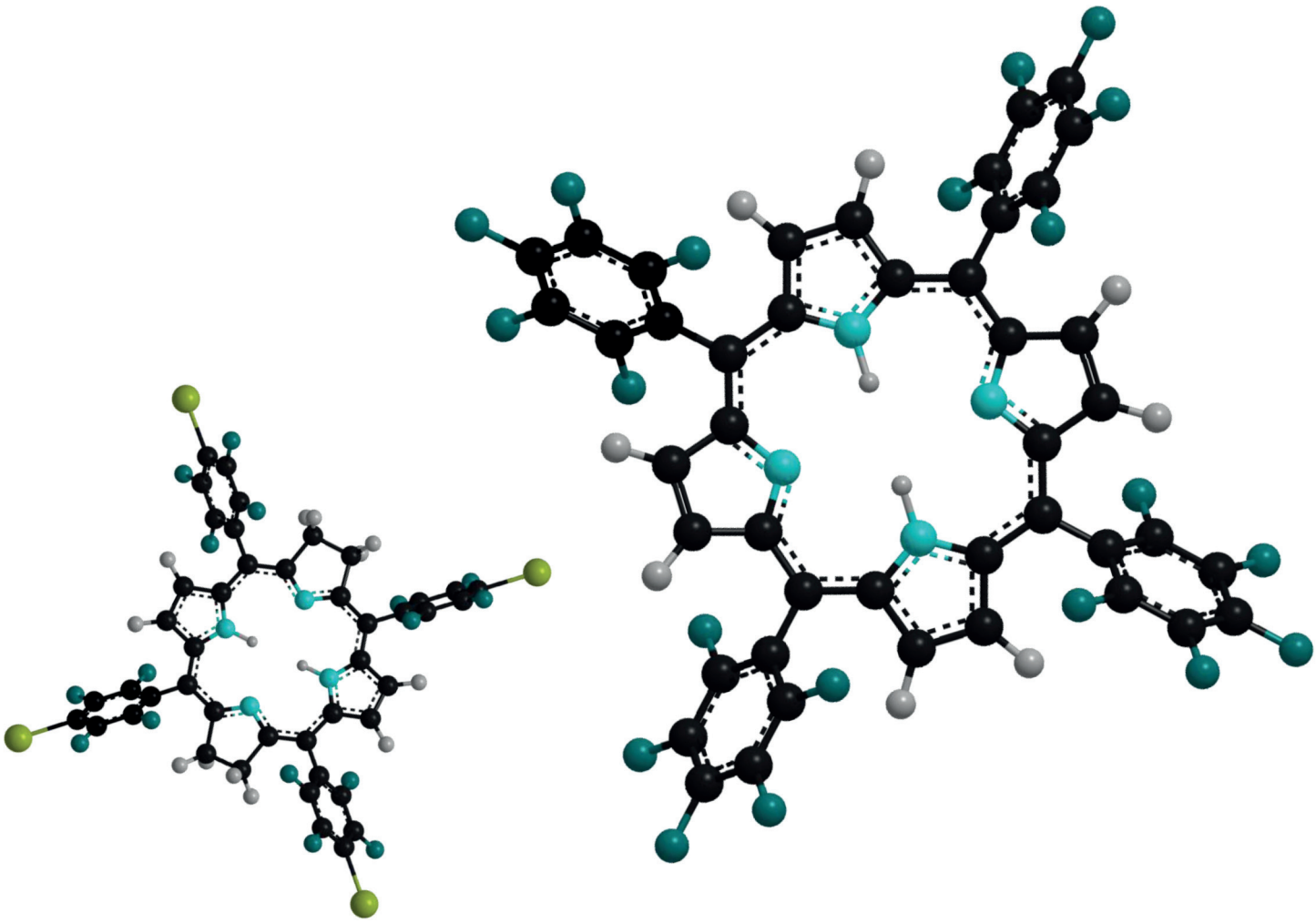


Sara Filipa Fernandes de Almeida

MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS COM POTENCIAIS APLICAÇÕES MÉDICAS: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

2017

· U C ·

Universidade de Coimbra

Sara Filipa Fernandes de Almeida

MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS COM POTENCIAIS APLICAÇÕES MÉDICAS: síntese e caracterização

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Orientador: Prof. Doutora Mariette Pereira

Co-orientador: Doutora Sara Pinto

Junho, 2017

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

O caminho percorrido durante este mestrado permitiu-me adquirir conhecimentos em diversas áreas, levando a um enorme crescimento pessoal e profissional. No entanto, nada disto seria possível sem a presença de várias pessoas às quais quero agradecer.

À minha orientadora, Professora Doutora Mariette Pereira, agradeço toda a disponibilidade, ajuda, motivação, apoio, compreensão, empenho e orientação científica para a concretização deste trabalho.

À Doutora Sara Pinto e ao Doutor Mário Calvete agradeço a orientação científica, disponibilidade, dedicação, paciência, constante ajuda e apoio prestado no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também por toda a confiança depositada em mim, incentivos, conselhos e força para seguir em frente mesmo quando tudo parecia não correr bem.

Ao Doutor Carlos Serpa agradeço a orientação científica, os esclarecimentos e discussões de todas as dúvidas de fotoquímica.

Ao Professor Doutor Luís Arnaut agradeço a oportunidade de adquirir novos conhecimentos numa área diferente e complementar à síntese orgânica.

Ao Mestre Hélder Soares agradeço todo o apoio, orientação, ensinamentos e apoio disponibilizado para a realização dos estudos *in vitro*.

Aos colegas do grupo de fotoquímica, em especial à Catarina, agradeço a disponibilidade e possibilidade que me deram de adquirir novos conhecimentos. Ao Doutor Fábio Schaberle agradeço o apoio nos estudos fotofísicos e esclarecimento de algumas dúvidas.

À Professora Doutora Maria João Moreno agradeço a disponibilidade e o apoio prestado.

Ao Doutor João Pina agradeço toda a disponibilidade e auxílio nas questões fotofísicas.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Catálise e Química Fina, César, Fábio, Lucas, Lili, Rafael, Guisy e Rui, agradeço todos os bons momentos, companheirismo, ensinamentos transmitidos e paciência. Um agradecimento especial à Carolina e à Vanessa por todas as conversas, bons momentos, incentivo, ajuda sempre que necessário, amizade desenvolvida,

apoio nos maus momentos e principalmente paciência e conselhos nesta fase final de trabalho.

Aos colegas da Luzitin e, em especial, ao Nuno agradeço todo o apoio na síntese das bacterioclorinas.

A todos os meus amigos, à Inês Fonseca, à Ana Tomé, à Ana Rita, à Joana Tocha Lima, ao André, à Cátia, à Melanie, à Adriana Carvalho e ao Hugo, agradeço por todos os bons momentos, as conversas, o apoio e os incentivos ao longo destes cinco anos, sem vocês nada teria tanta piada e tudo seria mais difícil de ultrapassar. Ao pessoal de Condeixa, principalmente ao Nando e ao Tiago, por todos os cafés e saídas que permitiram descontrair sempre que necessário. Em especial às minhas amigas, Maria Inês, Inês Guerra e Adriana Mamede, agradeço todas as conversas, bons momentos, doideiras, apoio, conselhos, paciência, força e energia positiva que me transmitiram principalmente nos momentos mais difíceis destes últimos anos. Ao JP, por ser a pessoa especial e única que é, agradeço todo o carinho, apoio, conversas, passeios e momentos únicos que passamos juntos. Sem vocês nada disto seria a mesma coisa!

A toda a minha família, em especial, aos meus pais agradeço o apoio incondicional, incentivo, paciência e confiança que me transmitiram sempre. São um exemplo a seguir, a vocês devo a pessoa que sou e sem vocês nada disto seria possível! À minha madrinha agradeço todos os conselhos, orientação e exemplo que também é para mim.

Agradeço também os serviços prestados pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química, em especial ao Pedro, por toda a disponibilidade, bem como ao Grupo Colling pelo apoio prestado na liofilização dos compostos.

Índice

Índice i
Abreviaturas iii
Resumo vii
Abstract ix
Nomenclatura xi
Capítulo 1: Introdução 1
1.1. Modelação estrutural dos macrociclos tetrapirrólicos 2
1.2. Aplicações dos macrociclos tetrapirrólicos em biomedicina 6
Terapia fotodinâmica 6
Imagiologia médica 11
1.3. Objetivos 12
Referências 14
Capítulo 2: Síntese e caracterização estrutural de bioconjugados de macrociclos tetrapirrólicos fluorados 19
2.1. Flúor em Química Medicinal 19
2.2. Síntese de porfirinas 20
Caracterização estrutural 24
2.3. Síntese de metaloporfirina de Mn (III) 31
2.4. Síntese de bacterioclorinas 32
Estudos preliminares da síntese de um bioconjugado de bacterioclorina fluorada com um peptídeo 37
Caracterização estrutural 39
Referências 42
Capítulo 3: Avaliação das propriedades fotofísicas dos macrociclos tetrapirrólicos fluorados e funcionalizados e estudos *in vitro* da bacterioclorina BFTetraPEG 45
3.1. Espectroscopia de absorção UV-visível 45
3.2. Espectroscopia de fluorescência 50
3.3. Determinação do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto 53
3.4. Fotoestabilidade 55
3.5. Estudos *in vitro* 60
Internalização celular 60
Citotoxicidade 62

Fototoxicidade 64
Referências 66
Capítulo 4: Conclusões 69
Capítulo 5: Experimental 73
5.1. Reagentes e solventes 73
5.2. Técnicas e Instrumentação 73
5.3. Síntese e caracterização estrutural dos compostos sintetizados no capítulo 2 76
5.4. Caracterização fotofísica e fotoquímica 80
5.5. Estudos *in vitro* 82
Referências 85

Abreviaturas e símbolos

ε	Coeficiente de absorção molar
δ	Desvio químico
λ	Comprimento de onda
τ_Δ	Tempo de vida de oxigénio singleto
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
ϕ_{pb}	Rendimento quântico de fotodegradação
ϕ_Δ	Rendimento quântico de formação de oxigénio singleto
$^1O_2$	Oxigénio singleto
$^3O_2$	Oxigénio tripleto
BFMonoPEG-peptideo	5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-peptídeo)fenil]-15,20-di-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro) fenil]bacterioclorina
BFTetraPEG	5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] bacterioclorina
dd	Duplo dupleto
DL_{50}	Dose letal a 50% (do inglês "lethal dosis 50%")
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium" do inglês
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por "electrospay" (do inglês "electrospray ionization")
FI	Imagiologia de fluorescência (do inglês "fluorescence imaging")
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfónico
HOMO	Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês "highest occupied molecular orbital")
HpD	Hematoporfirina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês "high performance liquid cromatography")
IC_{50}	Concentração inibitória a 50 % (do inglês "half maximal inhibitory concentration")
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês "International Union of Pure and Applied Chemistry")

J	Constante de acoplamento
LUMO	Orbital molecular desocupada de menor energia (do inglês "Lowest unoccupied molecular orbital")
m	Multipleto
$[M]^+$	Ião molecular
m/z	Razão massa/carga
MRI ^{19}F	Imagiologia de ressonância magnética nuclear de flúor (do inglês "fluorine magnetic resonance imaging")
MRI	Imagiologia de ressonância magnética (do inglês "magnetic resonance imaging")
m-THPC	5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)clorina
NaH	Hidreto de sódio
NaY	Zeólito
OI	Imagem ótica (do inglês "optical imaging")
PBS	Tampão fosfato pH=7,4 (do inglês "phosphate buffer saline")
Pc4	Ftalocianina de silício
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês "photodynamic therapy")
PEG	Polietilenoglicol
PEG-HP	Hematoporfirina-polietilenoglicol
PenStrep	Penicilina-streptomicina
PET	Tomografia de emissão de positrões (do inglês "tomography positron emission")
PFMonoPEG	5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina
PFTetraPEG	5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol) fenil]porfirina
PFTetraPEG-Mn(III)	5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] porfirinato de manganésio (III)
pH	Potencial Hidrogeniónico
ppm	Partes por milhão
PS	Fotossensibilizador
PS*	Estado excitado do fotossensibilizador
p-THPP	*meso*-tetra(hidroxifenil)porfirina
Redaporfin	5,10,15,20-tetra-(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil) bacterioclorina
RMN ^{19}F	Ressonância magnética nuclear de flúor

RMN ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de protão
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio
s	Singleto
S0	Estado fundamental singleto
S1	Estado excitado singleto
SnAr	Substituição nucleofílica aromática
t	Tripleto
T_1	Estado excitado tripleto
T1	Tempo de relaxação longitudinal
T2	Tempo de relaxação transversal
$TCBSO_3H$	5,10,15,20-tetra(2-cloro-5-sulfofenil)bacterioclorina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês "thin-layer chromatography")
TOF	Espectrómetro de massa de tempo de voo (do inglês "time-of-flight")
TPFPP	5,10,15,20-tetra(pentafluorfenil)porfirina
TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina
t_R	Tempo de retenção
US	Ultrasonografia (do inglês "ultrasonography")
UV-visível	Ultravioleta-visível

Resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação tinha como objetivo global desenvolver macrociclos tetrapirrólicos – porfirinas e bacterioclorinas - conjugadas com polietilenoglicol e avaliar algumas das suas propriedades fotofísicas, RMN de flúor e estudos *in vitro* para avaliar as suas potenciais aplicações como agentes de contraste para imagiologia de ressonância magnética e fotossensibilizadores vetorizados.

No capítulo 1 desta dissertação apresenta-se uma revisão geral das diferentes metodologias de síntese de bioconjugados de macrociclos tetrapirrólicos. Além disso, apresentam-se também as possíveis aplicações dos macrociclos tetrapirrólicos em biomedicina, incluindo uma breve revisão bibliográfica dos fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica bem como alguns fundamentos teóricos acerca de imagiologia médica por ressonância magnética, especificamente no que refere a agentes de contraste de flúor e sondas redox.

No capítulo 2 apresentam-se os resultados de otimização da síntese de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina e de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina, que se obtiveram com os rendimentos de 93 % e 49 % respetivamente. Preparou-se ainda o complexo de manganésio, obtendo-se 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] porfirinato de manganésio (III), com um rendimento de 78%. A porfirina 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina foi reduzida a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]bacterioclorina, com um rendimento de 44%. Além disso, a 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina foi também reduzida a bacterioclorina e conjugada com um peptídeo, tendo-se obtido a 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-peptídeo)fenil]-15,20-di-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]bacterioclorina. Neste capítulo descreve-se também a caracterização estrutural de todos os compostos sintetizados, utilizando as técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

Integram também o trabalho, os resultados apresentados no capítulo 3 referentes à avaliação das propriedades fotofísicas, que incluem a determinação dos coeficientes de absorção molar, os rendimentos quânticos de fluorescência e de formação de oxigénio singleto, e também a realização de estudos *in vitro* relativos à internalização celular, à

citotoxicidade e à fototoxicidade de uma das bacterioclorinas conjugadas com polietilenoglicol para avaliar a sua potencial aplicação como fotossensibilizador para PDT.

Por fim, no capítulo 5 apresenta-se detalhadamente os procedimentos experimentais referentes a todos os capítulos da tese, bem como a caracterização completa de todas as moléculas sintetizadas ao longo deste trabalho (^{1}H RMN, ^{19}F RMN, espectrometria de massa e absorção UV-visível).

Abstract

The main goal of the work presented in this dissertation was the development of new tetrapyrrolic macrocycles – porphyrins and bacteriochlorins – conjugated with polyethylene glycol and the evaluation of their photophysical properties, fluorine NMR and *in vitro* studies, in order to assess their potential application as contrast agents in magnetic resonance imaging and as vectorised photosensitizers.

In chapter 1 of this dissertation, an overview of the different synthetic methodologies of bioconjugated tetrapyrrolic macrocycles is shown. Additionally, possible applications of tetrapyrrolic macrocycles in biomedicine are also presented, including a brief bibliographic review of photosensitizers in photodynamic therapy as well as some theoretical fundamentals about medical imaging by magnetic resonance, specifically regarding fluorine contrast agents and redox probes.

In chapter 2 results of synthesis optimization of 5,10,15,20-tetra[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]porphyrin and 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]-10,15,20-tri[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin which were obtained with 93% and 49% yield , respectively, are presented. The complexation with manganese of porphyrin 5,10,15,20-tetra[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]porphyrinis is also described in this chapter and Mn(III)-5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyeneglycol)phenyl]porphyrin, was obtained with a yield of 78 %. Also, porphyrin 5,10,15,20-tetra[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]porphyrin was further reduced to 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]bacteriochlorin, with a yield of 44%. Furthermore, 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]-10,15,20-tri[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin was also reduced to bacteriochlorin and conjugated with a peptide, obtaining 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polyethyleneglycol)phenyl]-10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-peptide)phenyl]-15,20-di-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]bacteriochlorin. In this chapter is also described the structural characterization of all synthetized compounds, using nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry.

In chapter 3 it is presented the results referring to the evaluation of photophysical properties, which include the determination of the molar absorption coefficients, fluorescence and singlet oxygen, and the performance of *in vitro* studies of cellular uptake,

cytotoxicity and phototoxicity of one of the bacteriochlorins conjugated with polyethylene glycol in order to evaluate its potential application as photosensitizer in PDT.

Lastly, in chapter 5, the experimental procedures related to all the chapters of this thesis are described in detail, as well as complete chemical characterization of all synthesized compounds (^{1}H NMR, ^{19}F NMR, mass spectrometry and UV-vis absorption).

Nomenclatura

Os macrociclos tetrapirrólicos podem ser classificados de acordo com a nomenclatura de *Fischer*[i] ou a nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). *Fischer* atribuiu nomes triviais aos macrociclos tetrapirrólicos e designou o macrociclo tetrapirrólico conjugado apresentado na figura I A por porfirina. Para além disso, classificou as posições periféricas por posições β e as pontes metilénicas interpirrólicas por posições *meso*. De acordo com este autor, as posições β pirrólicas podem ser numeradas de 1 a 8, as posições *meso* são designadas através de letras gregas α, β, γ, δ e os anéis pirrólicos denominados de A, B, C e D. No entanto, devido à enorme expansão que se deu na área da química das porfirinas foi necessário o aparecimento de um outro sistema de nomenclatura - recomendações da IUPAC - onde todos os carbonos dos macrociclos tetrapirrólicos devem ser numerados de 1 a 20 e os azotos pirrólicos de 21 a 24 (figura I B).[ii,iii]

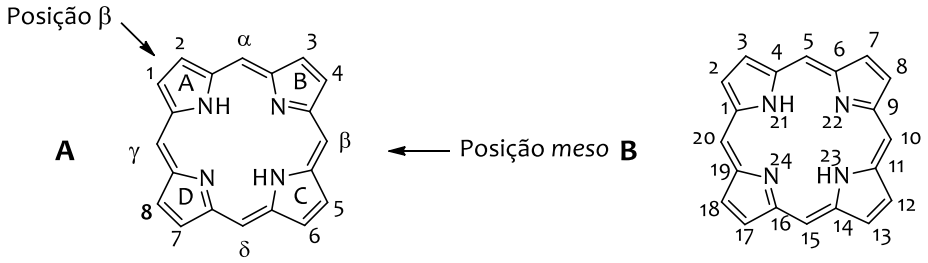


Figura I. Numeração dos macrociclos tetrapirrólicos segundo a nomenclatura de A: Fischer B: IUPAC

Ainda de acordo com as recomendações da IUPAC, as porfirinas reduzidas são designadas de 2,3-di-hidroporfirinas e 7,8,17,18-tetrahidroporfirinas. As 2,3-di-hidroporfirinas, trivialmente designadas por clorinas, sofrem redução apenas na ligação dupla existente entre os carbonos 7 e 8 dos anéis pirrólicos (figura II A). No caso das 7,8,17,18-tetrahidroporfirinas os carbonos saturados surgem em duas unidades pirrólicas diametralmente opostas, ocorrendo a redução de duas ligações duplas e são designadas normalmente por bacterioclorinas (figura II B).

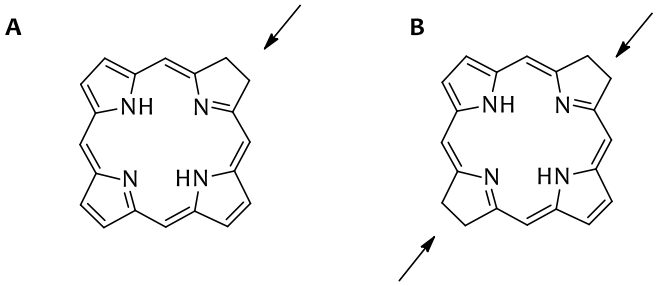


Figura II. Estrutura química dos macrociclos tetrapirrólicos reduzidos: clorina A e bacterioclorina B

Por uma questão de simplicidade, nesta dissertação ambas as nomenclaturas serão adotadas. As porfirinas substituídas são numeradas de acordo com as recomendações da IUPAC, no entanto, a nomenclatura de *Fischer* também é utilizada. Através desta nomenclatura referenciam-se as posições onde se encontram os átomos no macrociclo tetrapirrólicos, nomeadamente posições β-pirrólicas ou *meso* e também se designam os derivados hidroporfírinicos pelos seus nomes vulgares, clorinas e bacterioclorinas.

[i] Fischer H., Orth H., *Die Chemie des Pyrrols*, **1934**, Akad. Verlagsges, Germany.

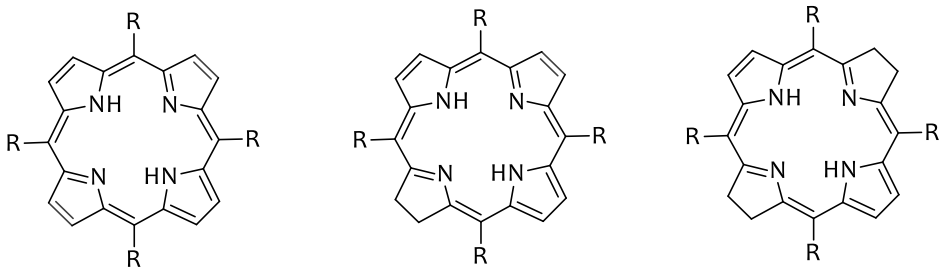
[ii] Moss G.P., *Pure & Appl. Chem.*, **1998**, 70, 143 - 216.

[iii] Moss G.P., *Pure & Appl. Chem.*, **1986**, 59, 779 - 832.

Capítulo 1

Introdução

Os macrociclos tetrapirrólicos são compostos químicos de estrutura cíclica formados por quatro unidades de pirrol ligadas entre si através de quatro unidades metilénicas.[1] As suas propriedades físico-químicas e a relativa facilidade de modelação estrutural tem atraído bastante atenção nas últimas décadas, na comunidade científica[2,3,4], essencialmente por permitir uma fácil introdução de grupos funcionais, metalação com diferentes metais ou redução de uma ou duas ligações duplas dos anéis pirrólicos, obtendo-se clorinas e bacterioclorinas respetivamente, figura 1.1.[5,6,7,8]



Porfirina - 22 eletrões π **Clorina** - 20 eletrões π **Bacterioclorina** - 18 eletrões π

Figura 1.1 Estrutura química geral de uma porfirina, clorina e bacterioclorina

Nas secções seguintes apresentar-se-á uma revisão geral das metodologias existentes para obtenção de bioconjugados de macrociclos tetrapirrólicos, bem como uma visão geral dos fundamentos das possíveis aplicações médicas, nomeadamente na terapia fotodinâmica (PDT) e na imagiologia médica.

1.1. Modelação estrutural dos macrociclos tetrapirrólicos

A conjugação covalente de grupos hidrofílicos com moléculas de interesse tem desempenhado um papel importante na terapêutica moderna, uma vez que permite melhorar a solubilidade em água, a estabilidade metabólica e a entrega ou libertação direcionada dos fármacos ou sondas em locais específicos do corpo.[9]

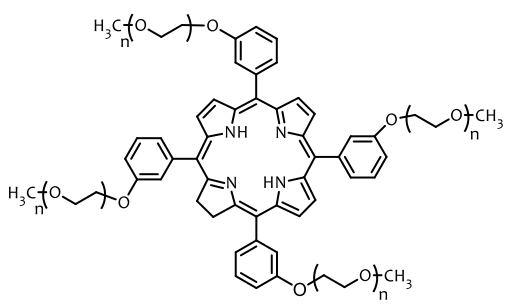
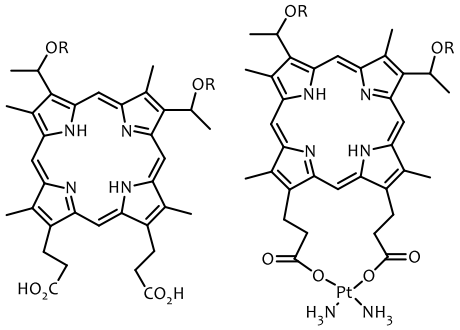
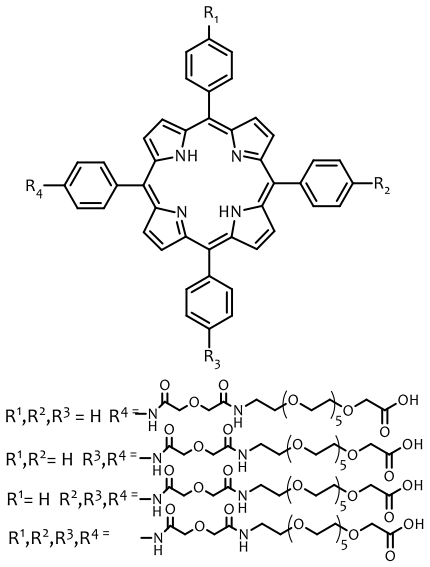
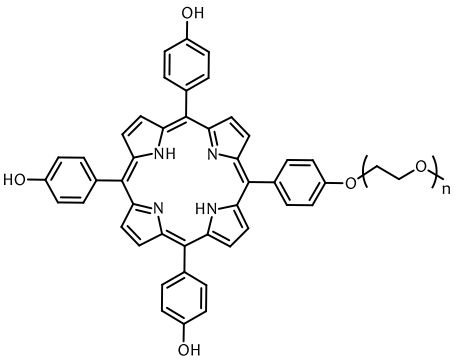
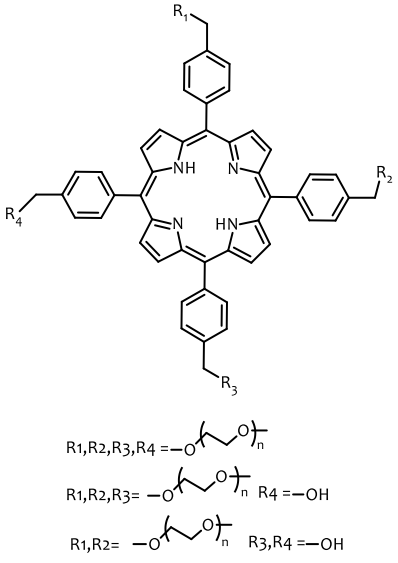
Na literatura, existem diversas estratégias de conjugação com grupos hidrofílicos das quais se destaca, a introdução de cargas negativas por conjugação com grupos carboxilo, sulfonilo ou hidroxilo, a introdução de cargas positivas, através da formação de aminas quaternárias, ou a conjugação com grupos não-iónicos como peptídeos, hidratos de carbono (açucares), glicerol ou polietilenoglicol (PEG).[10,11,12,13,14] É de salientar que apesar de todas as estratégias referidas permitirem o aumento da solubilidade em água, na indústria farmacêutica a ligação covalente com cadeias PEG é a mais utilizada, uma vez que permite de forma eficiente aumentar a biocompatibilidade.[15]

A reação de pegilação foi pela primeira vez descrita por *Abuchowski et al.* [16,17,18], em 1970, onde demonstraram que a conjugação de polietilenoglicol com a albumina e a catalase, alterava as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos e permitia uma melhor libertação das moléculas terapêuticas no organismo humano.[9,17] Para além disso, outros autores[19,20,21,22] observaram que a pegilação de compostos de interesse farmacêutico conduzia a diversas vantagens, nomeadamente, a diminuição da imunogenotoxicidade e da frequência de administração do composto, o aumento da especificidade e, devido a melhorar a eficiência da internalização celular, a acumulação nos tecido tumorais era mais eficiente.

Na literatura, existem diversos exemplos de conjugação de lipossomas, peptídeos, hidratos de carbono, enzimas ou pequenas moléculas orgânicas com PEG.[23] Contudo, nos últimos anos vários exemplos da conjugação com macrociclos tetrapirrólicos surgiram tal como é observado na tabela 1.1. *Hornung et al*.[24,25] estudaram uma clorina, meso-tetra-(hidroxifenil)clorina (*m*-THPC) conjugada com quatro cadeias PEG (2000 Da), observaram alta seletividade para células cancerígenas num modelo de cancro em ratos e demonstraram que dentro da dose necessária para o tratamento do tumor por PDT a clorina pegilada parecia ser um fotossensibilizador seguro. *Grahn et al*. [20,26,27] estudaram quatro produtos diferentes, usando PEG com pesos moleculares de 2000 e de 5000 Da ligados à *m*-THPC através de grupos carbonato ou triazina. Os estudos *in vivo* mostraram que a cadeia PEG tinha relativamente pouco efeito nos padrões de bioatividade, o que concluíram ser em grande parte uma consequência da estabilidade dos grupos de ligação entre os PEG e a clorina.

Lottner et al.[20,28,29] propuseram a síntese de potenciais fotossensibilizadores baseados numa hematoporfirina (PEG-HP) ou num complexo de platina e tetraarilporfirina (PEG-HPPt) conjugados com duas ou três cadeias PEG. Concluíram que o fotossensibilizador PEG-HPPt era bastante promissor para PDT, uma vez que apresentava citotoxicidade intrínseca, especificidade para as células tumorais e uma internalização celular eficiente.[29] *Sibrian-Vazquez et al.*[22] sintetizaram a meso-tetrafenilporfirina funcionalizada com uma, duas, três e quatro cadeias PEG de baixo peso molecular (400Da) e observaram que os derivados que continham uma ou duas cadeias PEG tinham maior acumulação na linha celular humana HEp2 do que os derivados com três ou quatro cadeias PEG. Para além disso, descobriram também que apenas os conjugados com uma ou duas cadeias PEG apresentavam fototoxicidade. Tal facto foi justificado por existir uma elevada internalização celular e pelos conjugados apresentarem uma localização preferencial a nível celular, especificamente, nas mitocôndrias e no reticulo endoplasmático. *Nawalany et al.*[21,30] obtiveram a porfirina, 5,10,15,20-tetra-(4-hidroxifenil)porfirina (*p*-THPP) conjugada com PEG com diferentes pesos moleculares (350, 2000 e 5000 Da), concluindo que a conjugação ao polímero resulta numa redução significativa da citotoxicidade no escuro em relação à porfirina de partida. *Kim et al*[19] reportaram a síntese de uma porfirina, a meso-tetra(*p*-bromometilfenil)porfirina conjugada com polietilenoglicol, obtendo produtos tetra-, tri- e di- funcionalizados, demonstrando que estas porfirinas são úteis na terapia fotodinâmica por apresentarem melhor solubilidade em água e elevada eficiência na formação de oxigénio singleto. A elevada eficiência na formação de oxigénio singleto foi justificada pelo facto de os fotossensibilizadores na presença de radiação desencadearem reações fotoquímicas do tipo II. Estas reações produzem oxigénio singleto quando o fotossensibilizador no seu estado excitado tripleto reage com o oxigénio molecular.

Tabela 1.1. Exemplos de bioconjugados macrociclos tetrapirrólicos-PEG descritos na literatura para aplicação em PDT

Estrutura química	Ref.	Estrutura química	Ref.
	24,25	 R = $(CH_2CH_2O)_{17}CH_3$	28,29
	22		21,30
	19		

A vectorização por bioconjugação de moléculas orgânicas não seletivas a moléculas bio-orgânicas específicas é uma estratégia bastante utilizada para direcionar os compostos químicos para alvos específicos, uma vez que aumenta a especificidade aos locais de interesse, com a consequente redução dos efeitos tóxicos associados a acumulação em órgãos e tecidos que não os alvo.[31,32] Estas estratégias são cada vez mais utilizadas para solucionar problemas de saúde pública podendo contribuir para a melhoria do tratamento de algumas doenças. De entre elas salienta-se as arritmias cardíacas. Esta patologia surge pelo facto de as células musculares cardíacas – os miócitos (células excitáveis que permitem a contração e o relaxamento do coração) – baterem de forma anormal, arrítmica.[33] Esta doença representa uma das maiores causas de morte em todo o Mundo.[34] Atualmente, as estratégias terapêuticas anti-arrítmicas englobam a utilização de fármacos anti-arrítmicos, cirurgias, ablações por cateter ou dispositivos implantados.[35,36] A farmacoterapia foi durante vários anos o pilar da terapia para esta patologia, no entanto verifica-se que existem alguns problemas na sua eficácia, nos efeitos secundários sistémicos e nos efeitos pró-arrítmicos que levam algumas vezes ao aumento da mortalidade.[35] Desta forma, é essencial o aparecimento de terapias alternativas mais eficazes para o tratamento desta patologia. Recentemente, *Avula et al.*[37,38] demonstraram *in vivo* a viabilidade de uma ablação seletiva dos miócitos através da utilização da terapia fotodinâmica. Essa seletividade foi conseguida pela bioconjugação de um fotossensibilizador vetorizado com um peptídeo (CTP) que se direciona especificamente para os miócitos e que por ação de terapia fotodinâmica permite destruir seletivamente as células disfuncionais, mantendo inalterado o tecido periférico, abrindo a possibilidade de uma nova terapia para as arritmias cardíacas. Estudos preliminares de síntese de potenciais fotossensibilizadores bioconjugados com peptídeos serão descritos nesta dissertação abrindo perspetivas para esta nova área de aplicação.

Seguidamente e porque o objetivo do trabalho era a obtenção de novas entidades químicas baseadas em macrociclos tetrapirrólicos para aplicação em terapia fotodinâmica e em imagem por ressonância magnética nuclear, apresentar-se-á nas próximas secções uma visão geral dos fundamentos da terapia fotodinâmica e da imagiologia de ressonância magnética nuclear de flúor.

1.2. Aplicações dos macrociclos tetrapirrólicos em biomedicina

Terapia fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica é uma metodologia terapêutica seletiva e pouco invasiva utilizada maioritariamente no tratamento oncológico, mas que cada vez mais tem sido explorada para o tratamento de outras patologias, tais como, doenças cardiovasculares, dermatológicas, oftálmicas e infeciosas.[39,40,41] A PDT envolve a administração de fotossensibilizadores, que ao serem irradiados com luz na região do infravermelho próximo (600 nm), transferem energia para o oxigénio molecular, gerando espécies reativas de oxigénio (ROS) dando inicio a uma série de cascatas bioquímicas que provocam a destruição das células alvo.[42,43,44]

O processo fotodinâmico que ocorre na terapia fotodinâmica, envolve a absorção de um fotão no comprimento de onda adequado, por parte do fotossensibilizador para o primeiro estado excitado singleto (S1) ocorrendo a transição para o primeiro estado excitado tripleto (T1), por cruzamento intersistema. Aqui, poderá ocorrer emissão para o estado fundamental singleto (S0) por fosforescência ou a interação com o oxigénio molecular, através de duas vias diferentes. Na primeira, a reação do tipo I, ocorre a transferência de eletrões para substratos celulares que formam radicais capazes de interagir com o oxigénio molecular e originar espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como, anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), etc. A segunda, a reação do tipo II, consiste na transferência direta de energia do estado excitado tripleto para o estado fundamental do oxigénio (estado tripleto $^3O_2$), levando à formação de oxigénio singleto (estado excitado $^1O_2$) (figura 1.2), sendo esta a espécie que irá reagir com as células alvo, destruindo-as. [39,40,41,45,46,47]

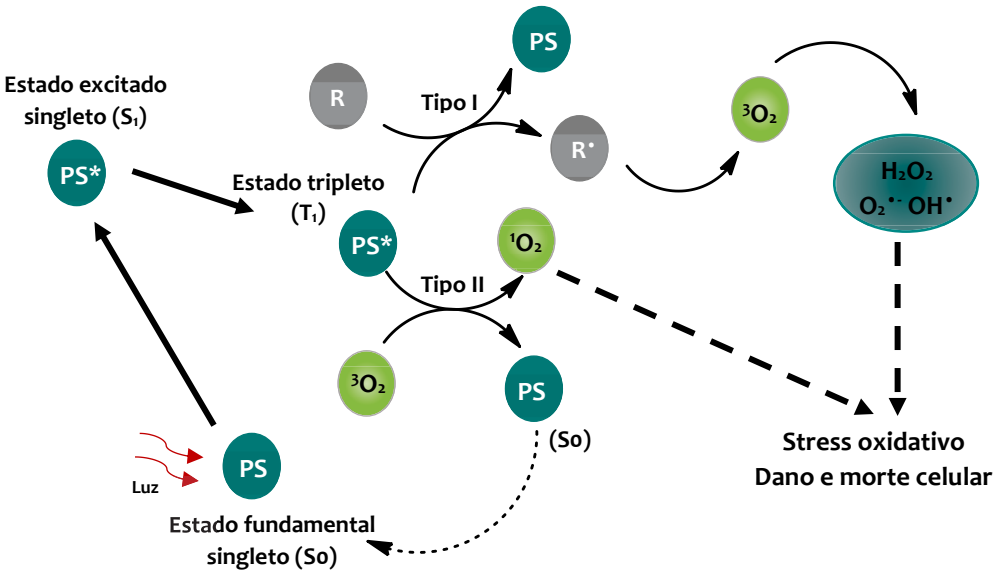


Figura 1.2. Esquema geral de terapia fotodinâmica[41]

Para que um fotossensibilizador possa ser considerado ideal para uma determinada aplicação médica, é necessário que apresente determinadas caraterísticas como por exemplo, uma síntese fácil e com elevado rendimento, elevada pureza e estabilidade, baixa toxicidade na ausência de luz, elevado coeficiente de absorção molar na "janela fototerapêutica" (600 – 850 nm), elevado rendimento quântico de formação de oxigénio singleto, baixo rendimento quântico de fluorescência, fotodegradação adequada, acumulação seletiva nas células desejadas e facilidade de excreção e eliminação após o tratamento.[39,45,48]

Nos últimos anos tem-se verificado uma intensa investigação no que se refere ao estudo e *design* de fotossensibilizadores para PDT, que se subdividem em três gerações cada vez mais específicas e seletivas.[49,50,51,52,53] Os fotossensibilizadores de primeira geração baseiam-se em porfirinas de origem natural, mas como principais limitações apresentam reduzida eliminação do organismo e baixa absorção na região do infravermelho próximo. Os de segunda geração são baseados em compostos de natureza sintética desenhados conceptualmente para ultrapassar os problemas associados aos de primeira geração. Este tipo engloba compostos do tipo porfirinas[39,54,55,56], clorinas[57], bacterioclorinas[58,59] e ftalocianinas[60]. Nos últimos anos surgiram os de terceira geração que através da formação de ligações com anticorpos monoclonais, proteínas ou lipossomas[61,62,63] permitem o aumento da seletividade e acumulação nas células cancerígenas.[49,64]

Em particular, as bacterioclorinas têm vindo a ser extensivamente estudadas uma vez que apresentam uma forte absorção na região do infravermelho e são capazes de transferir energia do estado tripleto para moléculas de oxigénio molecular.[49,65]

Na tabela 1.2 apresentam-se alguns exemplos de fotossensibilizadores úteis em terapia fotodinâmica, bem como algumas das suas propriedades fotofísicas relevantes, como por exemplo, rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto (ϕ_Δ) ou comprimento de onda máximo de absorção de radiação na região do infravermelho.

De entre os fotossensibilizadores apresentados na tabela 1.2 destaca-se a Redaporfin, uma bacterioclorina sintética que resultou do trabalho de investigação desenvolvido no grupo e culminou na criação de uma empresa no departamento de Química da Universidade de Coimbra – Luzitin, S.A.. Este fotossensibilizador trouxe vantagens relativamente a outros, uma vez que apresenta uma forte absorção na região entre os 740 – 780 nm, baixo rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico de formação de oxigénio singleto de 0,43, elevada fotoestabilidade gerada pela presença de átomos de flúor nas posições *orto* dos grupos fenilo e anfifilicidade resultante da presença de grupos sulfonamida nas posições *meta* dos grupos fenilo.[42,66] Além disso, os ensaios *in vitro* foram positivos, apresentando baixa toxicidade no escuro e elevado efeito fotodinâmico, o que permitiu que este fotossensibilizador prosseguisse para ensaios *in vivo*. Os resultados dos ensaios clínicos têm sido bastante positivos encontrando-se em fase II perspetivando-se aplicação breve na clínica.

Tabela 1.2. Exemplos de alguns fotossensibilizadores relevantes em PDT

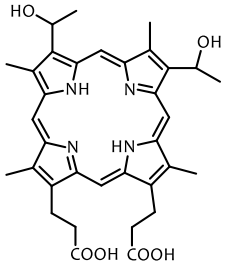
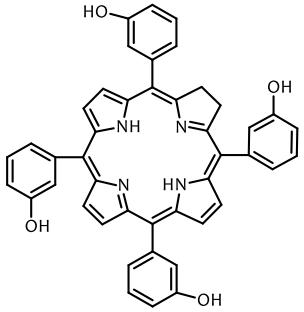
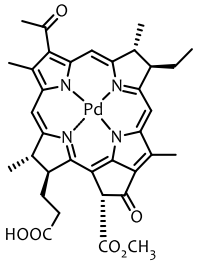
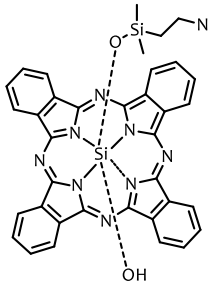
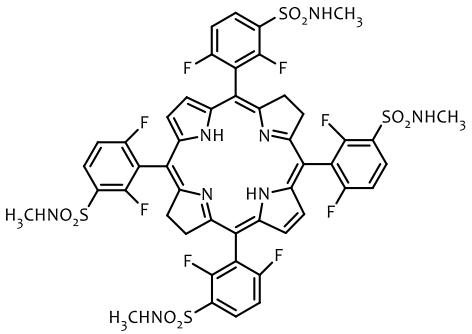
	Estrutura química	ε (M^{-1} cm^{-1})	ϕ_Δ	$\lambda_{máx.}$ (nm)	Obs.	Ref.
Photofrin Hematoporfirina HpD		3500	0,65	630	Clínica	[47]
Temoporfin Foscan mTHPC		30000	0,43	652	Clínica	[47]
Tookad *Palladium Bacteriopheroph orbide* WST09		100000	-	763	Clínica	[52]

Tabela 1.2. Exemplos de alguns fotossensibilizadores relevantes em PDT (cont.)

Ftalocianina de silício Pc4		200000	-	675	Clínica	[42,67]
Redaporfin LUZ11		140000	0,43	746	Ensaios clínicos	[66]

Imagiologia médica

A imagiologia médica tem emergido como uma área multidisciplinar resultado da interação da biologia molecular e da imagiologia *in vivo*. As principais potencialidades desta área são centradas no diagnóstico de doenças neurológicas, cardiovasculares ou cancro.[4,68,69] A imagiologia tem beneficiado de várias modalidades de diagnóstico que incluem a radiografia por raios-X e a tomografia computarizada (raios-X CT), a tomografia de emissão de positrões (PET), a ressonância magnética nuclear (MRI), a ressonância magnética nuclear de flúor (^{19}F MRI), a ultrassonografia (US), a imagem ótica (OI) e a imagiologia por fluorescência (FI).[2,4]

No âmbito do trabalho desenvolvido destaca-se a modalidade de imagiologia de ressonância magnética nuclear de flúor (^{19}F MRI).

O flúor (^{19}F) tem um núcleo com abundância natural próxima dos 100 % e um spin nuclear de ½. Este elemento químico existe no organismo imobilizado em fase sólida nos dentes e ossos, no entanto, essa imobilização conduz a tempos de relaxação transversal (T_2) curtos e a um sinal de fundo muito abaixo dos limites de deteção da imagiologia de ressonância magnética (MRI).[70,71] Assim, os sinais detetados por ^{19}F MRI vão estar apenas relacionados com os núcleos de flúor associados aos agentes de contraste.[72,73] Esse facto torna o flúor, um dos núcleos mais promissores para imagiologia, podendo ser útil como marcador biológico.[74,75,76,77] Estas vantagens tornam a técnica bastante atrativa para o estudo da estrutura e funções de proteínas e ácidos nucleicos, para a análise do metabolismo, biodistribuição e farmacocinética de moléculas bioativas, bem como para a imagiologia médica dada a fácil deteção de compostos fluorados.[78,79]

Contrariamente, ao que acontece em ^{1}H MRI em que as imagens provêm da alteração das relaxividade molar das moléculas de água, no caso de ^{19}F MRI os sinais provêm apenas dos átomos de flúor presentes nos compostos fluorados que funcionam como sondas.[71] Por isso, elevada densidade de núcleos de flúor 19 na sonda e elevadas concentrações dos compostos fluorados nos tecidos biológicos permitem obter melhor contraste nas imagens de ^{19}F MRI.

Neste sentido a utilização de sondas com características físico-químicas adequadas é crucial para a obtenção de bons resultados. Alguns autores[71,80] referem que as sondas ideais devem ser caracterizadas por apresentarem alto teor de flúor, síntese e formulações fáceis, elevada estabilidade química e biológica e baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Além disso, consideram que o espectro de RMN de flúor 19 deve ser simples e ter picos intensos e bem

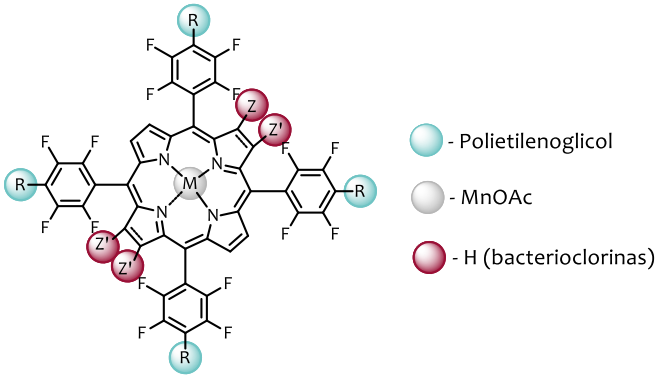
definidos e que as sondas devem conduzir a tempos de relaxação longitudinal (T_1) curtos e transversais longos (T_2).

Os compostos fluorados têm também vindo a ser sintetizados e estudados como potenciais candidatos a agentes de contraste inteligentes (sondas redox).[81,82,83,84] Estes referem-se a sistemas paramagnéticos capazes de detetar alterações a nível biológico, sendo sensíveis a parâmetros como o pH, a temperatura, a pressão de oxigénio, o potencial de oxidação-redução ou a concentração de iões específicos.[85,86] As alterações específicas na pressão parcial do oxigénio estão muitas vezes associadas a patologias, como acidentes vasculares cerebrais ou tumores.[82,87] Por isso, o desenvolvimento de agentes de contraste inteligentes capazes de detetar essas alterações pode permitir o diagnóstico desse tipo de doenças.[72]

As sondas redox podem ser baseadas na atividade redox dos ligandos, no qual podem ocorrer alterações na estrutura dos ligandos ou na rotação molecular enquanto o estado de oxidação do ião metálico paramagnético se mantém inalterado ou podem ser baseados no uso de iões metálicos paramagnéticos, tais como o európio ou manganésio, no qual o estado de oxidação têm propriedades paramagnéticas diferentes.[82] Ambas as sondas devem cumprir vários requisitos, tais como, serem biocompatíveis, apresentarem um potencial redox no interior das células que seja acessível a agentes redutores biológicos, possuírem ligandos que estabilizem os estados redox de tal modo que a redução e oxidação não resulte na decomposição da sonda, apresente forte mudança de sinal após ativação ou aumentar o sinal na presença da patologia, de forma a ser úteis para aplicação *in vivo*.

1.3. Objetivos

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver macrociclos tetrapirrólicos fluorados e funcionalizados, através da introdução de cadeias de polietetilenoglicol, para serem potencialmente utilizados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica ou como agentes de contraste em imagiologia médica. Mais especificamente pretendia-se preparar novas moléculas do tipo porfirinas conjugadas com PEG para potencial aplicação em imagiologia de ressonância magnética de flúor 19 (RMN ^{19}F). Como segundo objetivo tencionava-se desenvolver fotossensibilizadores do tipo bacterioclorinas vetorizadas para aplicação em PDT.[37] (figura 1.3)



Agentes de contraste ou fotossensibilizadores

Figura 1.3. Esquema resumo da proposta de trabalho apresentada nesta dissertação

De acordo com o que foi exposto neste capítulo nesta dissertação pretende-se sintetizar macrociclos tetrapirrólicos fluorados e conjugados com polietilenoglicol de forma a contribuírem para a melhoria do diagnóstico e da terapêutica de algumas doenças. No capítulo 2 apresentar-se-ão as metodologias sintéticas e caracterização estrutural de bioconjugados de macrociclos tetrapirrólicos fluorados e no capítulo 3 a avaliação das propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores e estudos *in vitro.*

Referências

[1] Chandra R., Tiwari M., Kaur P., Sharm M., Jain R., Dass S., *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **2000**, 15, 183 – 199.

[2] Calvete M.J.F., Pinto S.M., Pereira M.M., Geraldes C.F.G.C., Coordination Chemistry Reviews, **2017**, 333, 82 -107.

[3] Zheng W., Shan N., Yu L., Wang X., Dyes and Pigments, **2008**, 77, 153 – 157.

[4] Calvete M.J.F., Simões A.V.C., Henriques C.A., Pinto S.M.A., Pereira M.M., *Current Organic Synthesis*, **2014**, 11, 127 – 140.

[5] Calvete M., Yang G.Y., Hanack M., *Synthetic Metals*, **2004**, 141, 231 – 243.

[6] Huang H., Song W., Rieffel J., Lovell J.F., *Frontiers in Physics*, **2015**, 3, 1 – 15.

[7] Samaroo D., Vinodu M., Chen X., Drain C.M., *J. Comb. Chem*., **2007**, 9, 998 – 1011.

[8] Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Arnaut L.G., Sá G.F.F., Silva E.F.F., Rocha L.B., Simões S., Formosinho S.J., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2009**, 13, 567 – 573.

[9] Banerjee S.S., Aher N., Patil R., Khandare J., *Hindawi Publishing Corporation: Journal of Drug Delivery*, **2012**, 2012, 1 – 17.

[10] James B.R., Meng G.G., Posakony J.J., Ravensbergen J.A., Ware C.J., Skov K.A., *Porphyrins and Metalloporphyrins*, **1996**, 3, 85 – 89.

[11] Pinto S.M.A., Tomé V.A., Calvete M.J.F., Pereira M.M., Burrows H.D., Cardoso A.M.S., Pallier A., Castro M.M.C.A., Tóth E., Geraldes C.F.G.C., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2016**, 154, 50 – 59.

[12] Ongarora B.G., Zhou Z., Okoth E.A., Kolesnichenko I., Smith K.M., Vicente M.G.H., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2014**, 18, 1021 – 1033.

[13] Li H., Jensen T.J., Fronczek F.R., Vicente M.G.H., J. *Med. Chem.*, **2008**, 51, 502 – 511.

[14] Li H., Fronczek F.R., Vicente M.G.H., *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 6675 – 6678.

[15] Matsukuma D., Otsuka H., *Elsevier*, **2014**, 261 – 283.

[16] Abuchowski A.,Es T.V.,Palczuk N.C., Davis F.F., *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 252, 3578 – 3581.

[17] Harris J.M., Martin N.E., Modi M., *Clin Pharmacokinet*, **2001**, 40, 539 – 551.

[18] Veronese F.M., Pasut G., *Drug Discovery Today*, **2005**, 10, 1451 – 1458.

[19] Kim W.J., Kang M.S., Kim H.K., Kim Y., Chang T., Ohulchanskyy T., Prasad P.N., Lee K.S., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2009**, 9, 7130 – 7135.

[20] Rissanen S., Kumorek M., Martinez-Seara H., Li Y.C., Jamróz D., Bunker A., Nowakowska M., Vattulainen I., Kepczynski M., Róg T., *J. Phys. Chem. B*., **2014**, 118, 144 – 151.

[21] Nawalany K., Kozik B., Kepczynski M., Zapotoczny S., Kumorek M., Nowakowska M., Jachimska B., *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 12231 – 12239.

[22] Sibrian-Vazquez M., Jensen T.J., Vicente M.G.H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2007**, 86, 9 – 21.

[23] Mishra P., Nayak B., Dey R.K., *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2016**, 11, 337 – 348

[24] Hornung R., Fehr A.K., Monti-Fraynel J., Krasieva T.B., Tromberg B.J., Berns M.W.,Tadir Y., *Photochemistry and Photobiology*, **1999**, 70, 624 - 629.

[25] Hornung R., Fehr M.K., Walt H., Wyss P., Berns M.W., Tadir Y., *Photochemistry and Photobiology*, **2000**, 72, 696 – 700.

[26] Grahn M.F., Giger A., McGuinness A., Jode M.L., Stewart J.C.M., Ris H.B., Altermatt H.J., Williams N.S., *Lasers Med Sci*, **1999**, 14, 40 – 46.

[27] Grahn M.F., McGuinness A., Jode M.L., Giger A., Dhiman A.S., Cheung C.M., Pavitt S., Williams N.S., *SPIE- International Society for Optical engineering*, **1997**, 3191, 180 -186.

[28] Lottner C., Bart K.C., Bernhardt G., Brunner H., *American Chemical Society*, **2002**, 45, 2079 – 2089.

[29] Lottner C., Knuechel R., Bernhardt G., Brunner H., *Cancer Letters*, **2004**, 215, 167 – 177.

[30] Nawalany K., Rusinc A., Kepczynskia M., Filipczakc P., Kumoreka M., Kozika B., Weitmand H., Ehrenbergd B., Krawczykc Z., Nowakowsk M., *International Journal of Pharmaceutics*, **2012**, 430, 129 – 140.

[31] Liu M., Li M., Wang G., Liu X., Liu D., Peng H., Wang Q., *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **2014**, 10, 2038 – 2062.

[32] Giuntini F., Alonso C.M.A., Boyle R.W., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 10, 759 - 791.

[33] Pellman J., Zhang J., Sheikh F., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **2016**, 1 – 23.

[34] Greener I., Donahue J.K., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **2011**, 50, 759 – 765.

[35] Gepsein L., Feld Y., Yankelson L., *Am J. Physiol Heart Circ. Physiol*., **2004**, 286, 815 – 822.

[36] Cho H.C., Marba E., *Gene Therapy in Heart Failure*, **2008**, 102, 1458 - 1470

[37] Avula U.M.R, Kim G., Lee Y.E.K., Morady F., Kopelman R., Kalifa J., *Heart Rhythm Society*, **2012**, 1504 – 1509.

[38] Avula U.M.R., Yoon H.K., Lee C.H., Kaur K., Ramirez R.J., Takemoto Y., Ennis S.R., Morady F., Herron T., Berenfeld O., Kopelman R., Kalifa J., *Science Translational Medicine*, **2015**, 7, 1 – 10.

[39] Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K., *Chem. Soc. Rev*., **2011**, 40, 340 – 362.

[40] Nyman E.S., Hynninen P.H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2004**, 73, 1 – 28.

[41] Juarranz A., Jaeu P., Sanx-Rodriguez F., Cuevas J., Gonzalez S., *Clin. Transl. Oncol*., **2008**, 10, 148 – 154.

[42] Dabrowski J.M., Arnaut L.G, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, 14, 1765 – 1780.

[43] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbańska K., Simões S., Stochel G., Cortes L., *Free Radical & Medicine*, **2012**, 52, 1188 – 1200.

[44] Debele T.A., Peng S., Tsai H.C., *Int. J. Mol. Sci*., **2015**, 16, 22094 – 22136.

[45] Agostins P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J., *Ca Cancer J. Clin.,* **2011**, 61, 250 – 281.

[46] Josefsen L.B., Boyle R.W., *Theranostics*, **2012**, 2, 916 – 966.

[47] Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E., *DDT*, **1999**, 4, 507 – 517.

[48] Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Arnaut L.G., Sá G.F.F., Silva E.F.F., Rocha L.B., Simões S., Formosinho S.J., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 567 – 573.

[49] Silva E.F.F., Dabrowski J.M., Monteiro C.J.P., Formosinho S.J., Stochel G., Urbanska K., Simões S., Pereira M.M., Arnaut L.G., *Chem. Eur. J*., **2010**, 16, 9273 – 9286.

[50] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Urbanska K., Simões S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2010**, 5, 1770 – 1780.

[51] Chen Y., Li G., Pandey R.K., *Current Organic Chemistry*, **2004**, 8, 1105 – 1134.

[52] Santosa V., Limantara L., *Indo J. Chem*., **2008**, 8, 279 – 291.

[53] O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T., *Photochemistry and Photobiology*, **2009**, 85, 1053 – 1074.

[54] Sternberg E.D., Dolphin D., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151 – 4202.

[55] Vicente M.G.H., *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents,* **2001**, *1,* 175 – 194.

[56] Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.O., Angellpetersen E., Warloe T., Frandsen N., Hogset A., *Journal of Microscopy*, **2005**, 218, 133 – 147.

[57] Privalova V.A., Lappab A.V., Bigbov E.N., *Proc. SPIE*, **2002**, 4612, 178 – 189.

[58] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Urbanska K., Simões S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.,* **2010**, 5, 1770 – 1780.

[59] Monteiro C.J.P., Pina J., Pereira M.M., Arnaut L.G., *Photochem. Photobiol. Sci*., **2012**, 11, 1233 – 1238.

[60] Tedesco A.C., Rotta J.C.G., Lunardi C.N., *Current Organic Chemistry*, **2003**, 7, 187 - 196.

[61] Konan Y.N., Gurny R., Alléman E., *J. Photochem Photobiol. B: Biol*., **2002**, 66, 89 – 106.

[62] van Dongen G.A.M.S, Visser G.W.M., Vrouenraets M.B., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 31 - 52.

[63] Mainardes R.M., Silva L.P., *Curr. Drug Targ.*, **2004**, 5, 449 – 455.

[64] Josefsen L.B., Boyle R.W., *British Journal of Pharmacology*, **2008**, 154, 1 -3.

[65] Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Abreu A.R., Sá G.F.F., Silva E.F.F., Rocha L.B., Dabrowski J.M., Formosinho S.J., Simões S., Arnaut L.G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545 – 9551.

[66] Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 5346 – 5357.

[67] Abrahamse H., Hamblin M.R., *Biochem. J.*, **2016**, 473, 347 – 364.

[68] Weissleder R.,Pittet M.J., *Nature*, **2008**, 452, 580 – 589.

[69] Rudin M., Weissleder R., *Nature Reviews*, **2003**, 2, 123 – 131.

[70] Ruiz-Cabello J., Barnett B.P., Bottomley P.A., Bulte J.W.M., *NMR Biomed.*, **2011**, 24, 114 – 129.

[71] Tirotta I., Dichiarante V., Pigliacelli C., Cavallo G., Terraneo G., Bombelli F.B., Metrangolo P., Resnati G., *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 1106 – 1129.

[72] Yu J.X., Hallac R.R., Chiguru S., Mason R.P., *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2013**, 70, 25 – 49.

[73] Zhang C., Moonshi S.S., Peng H., Puttick S., Reid J., Bernardi S., Searles D.J., Whittaker A.K., *ACS Sens.*, **2016**, 1, 757 – 765.

[74] Simões A.V.C., Adamowicz A., Dabrowski J.M., Calvete M.J.F., Abreu A.R., Stochel G., Arnaut L.G., Pereira M.M., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 8797 – 8772.

[75] Knight J.C., Edwards P.G., Paisey S.J., *RSC Advances*, **2011**, 1, 1415 – 1425.

[76] Dolbier W.R., *Guide to fluorine NMR for organic chemists*, John Wiley & Sons Inc., 2° ed., New Jersey, **2016**.

[77] Bartusik D., Tomanek B., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, 65, 1056 – 1064.

[78] Belle C., Béguin C., Hamman S., Pierre J.L., *Coordination Chemistry Reviews*, **2009**, 253, 963 - 976.

[79] Chen H., Viel S., Ziarelli F., Peng L., *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 7971 – 7982.

[80] Srinivas M., Heerschap A., Ahrens E.T., Figdor C.G., Vries I.J.M., *Trends in Biotechnology*, **2010**, 28, 363 – 370.

[81] Que E.L., Chang C.J., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 51 – 60.

[82] Do Q.N., Ratnakar J.S., Kovacs Z., Sherry A.D., *Chem. Med Chem.*, **2014**, 9, 1116 – 1129.

[83] Tsitovich P.B., Burns P.J., McKay A.M., Morrow J.R., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2014**, 133, 143 – 154.

[84] Hingorani D.V., Bernstein A.S., Pagel M.D., *Contrast Media Mol. Imaging*, **2015**, 10, 245 – 265.

[85] Rolla G.A., Tei L., Fekete M., Arena F., Gianolio E., Botta M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 1115 – 1122.

[86] Geraldes C.F.G.C., Laurent S., *Contrast Media Mol. Imaging*, **2009**, 4, 1 -23.

[87] Davies G.L., Kramberger I., Davis J.J., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 9704 – 9721.

Capítulo 2

Síntese e caracterização estrutural de bioconjugados de macrociclos tetrapirrólicos fluorados

2.1. Flúor em Química Medicinal

A incorporação do flúor em compostos orgânicos com potencial aplicação em farmacologia tem sido cada vez mais explorada ao longo dos anos.[1] A presença deste elemento químico permite alterar a reatividade e, consequentemente, as propriedades químicas, biológicas e a atividade fisiológica, levando a alterações significativas das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos compostos químicos que o incluem.[2,3] Desta forma, a utilização dos átomos de flúor torna-se muito útil no âmbito da Química Medicinal, sobretudo na síntese de compostos orgânicos com potencial aplicação farmacêutica. [4,5] A substituição de átomos de hidrogénio por átomos de flúor não afeta significativamente a conformação dos compostos, dada a semelhança entre os raios atómicos, mas a polaridade é afetada devido à diferença de eletronegatividade do flúor. [5,6,7] Para além disso, o facto de as ligações carbono-flúor serem muito fortes permite melhorar a estabilidade metabólica deste tipo de compostos orgânicos.[2,8,9]

Adicionalmente, a utilização do flúor pode ainda ser relevante para outro tipo de aplicações, nomeadamente, no diagnóstico médico. O facto de possuir características favoráveis, como alta sensibilidade ou spin nuclear adequado, à técnica de RMN faz com que os compostos que o incluem possam ser usados, por exemplo, como agentes de contraste na técnica de imagiologia por ressonância magnética de flúor 19.[3,10] Além disso, encontra-se descrito que as porfirinas fluoradas são capazes de se acumular preferencialmente nos tumores, facto pelo qual têm sido amplamente utilizados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica para o tratamento de situações oncológicas.[3]

Aliar a potencialidade dos macrociclos tetrapirrólicos em biomedicina e a utilidade do flúor em farmacologia é uma área bastante promissora e desafiante. Assim, ao longo deste capítulo apresentar-se-á a síntese de macrociclos tetrapirrólicos, nomeadamente porfirinas e bacterioclorinas, fluorados e conjugados com polietilenoglicol e/ou com peptídeo e as suas

respetivas caracterizações estruturais. É de referir ainda que a conjugação destas moléculas com polietilenoglicol permite que estes compostos sejam mais biocompatíveis.

2.2. Síntese de porfirinas

A modelação estrutural de macrociclos tetrapirrólicos é um tópico de elevado interesse em Química Medicinal porque as modificações permitem não só alterar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas, mas também a sua biodisponibilidade.[11] Desta forma, este trabalho iniciou-se com a síntese de 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP) que será utilizada como porfirina base para a preparação dos bioconjugados. A escolha desta porfirina baseou-se no facto de possuir flúores em posições *para* dos grupos fenilo que são suscetíveis de sofrer reações de substituições nucleofílicas aromáticas.[12] Para além disso, a presença dos flúores altera as características fotofísicas dos compostos que os incluem levando a um aumento do cruzamento intersistemas através do efeito do átomo pesado com consequente diminuição dos rendimentos quânticos de fluorescência e aumento do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto.[13,14,15]

A 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina foi sintetizada de acordo com o método recentemente melhorado por *Pereira et al.*[16,17,18] e aqui designado por método de nitrobenzeno/NaY. Desta forma, colocou-se em solução o pentafluorobenzaldeído em ácido acético/nitrobenzeno (2:1) na presença do zeólito NaY. Posteriormente, adicionou-se, gota a gota, um equivalente molar de pirrol, mantendo a mistura em refluxo a 120°C durante 2 horas (figura 2.1). Após arrefecimento da solução até à temperatura ambiente, procedeu-se à filtração do zeólito e a uma destilação a pressão reduzida, de forma a remover o nitrobenzeno e o ácido acético. De seguida, procedeu-se à purificação do composto com recurso a duas colunas cromatográficas de sílica com aplicação a seco usando como eluente inicialmente hexano, de seguida, uma mistura de 10:1, 8:1 e 4:1 de hexano: diclorometano e terminando com diclorometano.

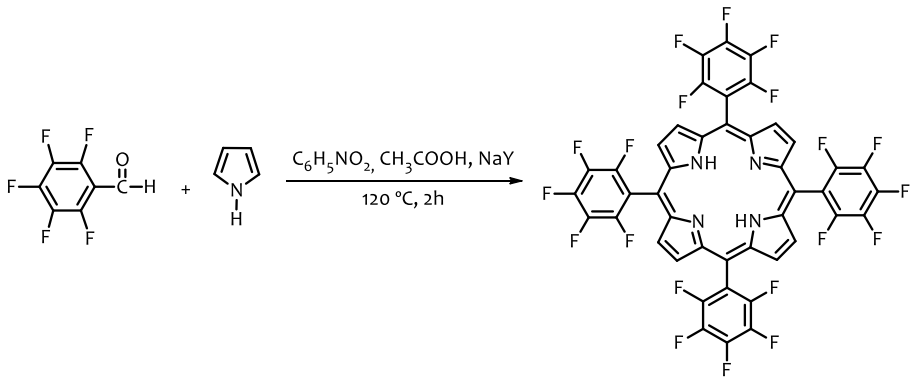


Figura 2.1. Síntese de 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP)

A utilização do método do nitrobenzeno/NaY permite obter um rendimento de 15 %. Esta metodologia sintética recorre à utilização de um catalisador sólido, o zeólito NaY, que sendo um ácido de Lewis permite ativar o grupo carbonilo do aldeído, facilitando a reação e permitindo melhores rendimentos reacionais. A porfirina foi caracterizada estruturalmente por ressonância magnética de protão e de flúor. De referir que o rendimento obtido por esta metodologia é aproximadamente o dobro do obtido utilizando o método do nitrobenzeno.[16,17] Os dados encontram-se descritos na seção experimental e está de acordo com o descrito na literatura.[17]

A funcionalização dos macrociclos tetrapirrólicos com grupos funcionais que lhes possibilitem ter uma maior solubilidade em meios biológicos e, consequentemente, uma melhor biocompatibilidade é necessária, uma vez que se pretende que estes compostos tenham potenciais aplicações ao nível da biomedicina. Os polietilenoglicóis são oligómeros hidrofílicos ou polímeros constituídos por unidades repetitivas de $[-(CH_2CH_2O)_n]$ que podem ser lineares ou ramificados.[19,20,21] Estes polímeros são sintetizados numa larga gama de pesos moleculares e apresentam diversos grupos funcionais terminais, que lhes possibilita terem uma enorme capacidade de se ligarem a diferentes compostos químicos. Quando os PEGs apresentam um tamanho e peso molecular bem definido são classificados de monodispersivos, no entanto se as suas cadeias variarem de tamanho são classificados como polidispersivos.[22,23] Optou-se pela utilização de um polímero com peso molecular médio de 500 g/mol e com um grupo metilo na posição terminal, de forma a garantir que as reações ocorressem seletivamente no grupo terminal hidroxilo. Assim, tendo como objetivo a síntese de porfirinas e bacterioclorinas biocompatíveis recorreu-se a metodologias sintéticas que permitissem a conjugação desses macrociclos tetrapirrólicos com o polietilenoglicol.

A síntese destes derivados biocompatíveis ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica aromática (SNAr). Esta reação ocorre na presença de nucleófilos fortes, como os grupos hidroxilos (-OH), tióis (-SH), aminas (-NH_2), entre outros, e segue um mecanismo de adição/eliminação – duas etapas.[24] A etapa de adição é o passo lento e determinante da reação, uma vez que envolve a perda de aromaticidade do composto.[25] A presença de grupos atractores de eletrões, como, por exemplo, grupos nitro ou halogénios, tornam os carbonos mais eletropositivos e, consequentemente, mais suscetíveis ao ataque nucleofílico, facilitando assim a ocorrência da reação.[26] Além disso, o facto de os flúores nas posições *para* do grupo fenilo estarem mais ativados relativamente aos outros flúores faz com que a funcionalização das porfirinas seja seletiva.

A funcionalização da porfirina de partida foi iniciada com a síntese de uma porfirina tetrassubstituída. Para a síntese de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina (PFTetraPEG) foi necessário ajustar a estequiometria da reação, utilizando-se para isso quatro equivalentes molares de polietilenoglicol (PEG 500 Da). Colocou-se em solução a TPFPP**,** o PEG e o hidreto de sódio (NaH) dissolvidos em dimetilformamida seca (DMF). A mistura permaneceu à temperatura ambiente e após 24 h observou-se por TLC o total consumo da porfirina de partida TPFPP com concomitante formação da porfirina tetrassubstituída PFTetraPEG. O crude foi purificado por extração com diclorometano: água (5x) de forma a eliminar o polietilenoglicol que se encontrava livre. Após purificação obteve-se a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina com um rendimento de 93,3 % (figura 2.2).

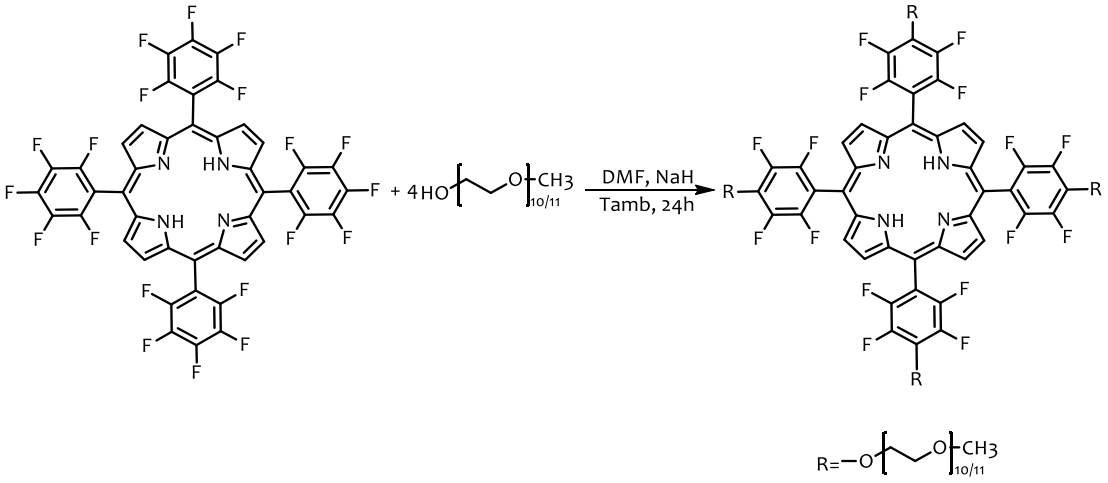


Figura 2.2. Síntese de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] porfirina (PFTetraPEG)

No entanto, a introdução de apenas um grupo polietilenoglicol nestes macrociclos tetrapirrólicos torna-se também interessante, no sentido em que podem ocorrer subsequentes funcionalizações. Com isso é possível funcionalizar as posições livres nos macrociclos com substâncias, como anticorpos monoclonais, biotina, ácido fólico, ácido hialurónico ou oligopeptídeos, capazes de direcionar para alvos específicos. Esse direcionamento é possível, uma vez que este tipo de ligandos têm grande afinidade para recetores endógenos sobreexpressos nalguns tipos de células.[27,28]

Assim, a porfirina monossubstituída, 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina (PFMonoPEG), foi sintetizada por uma metodologia sintética similar ao descrito para a porfirina anterior. Recorreu-se à utilização de PEG (0,9 equivalentes molares de PEG) e de NaH dissolvidos em DMF seco, no entanto, essa mistura foi adicionada lentamente à porfirina TPFPP, de forma a conseguir uma introdução seletiva do polietilenoglicol. A mistura foi deixada com agitação à temperatura 80°C e após 48 horas observou-se por TLC a presença de produtos correspondentes às porfirinas mono- e dissubstituídas. A purificação do crude foi efetuada através de coluna cromatográfica de óxido de alumina, eluindo-se inicialmente com diclorometano e, de seguida, com diclorometano: 5 % metanol. No entanto, o composto monossubstituído apresentava ainda polietilenoglicol livre procedendo-se, por isso, a uma extração com diclorometano: água (5x). A 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina foi obtida com um rendimento de 48,5 % (figura 2.3).

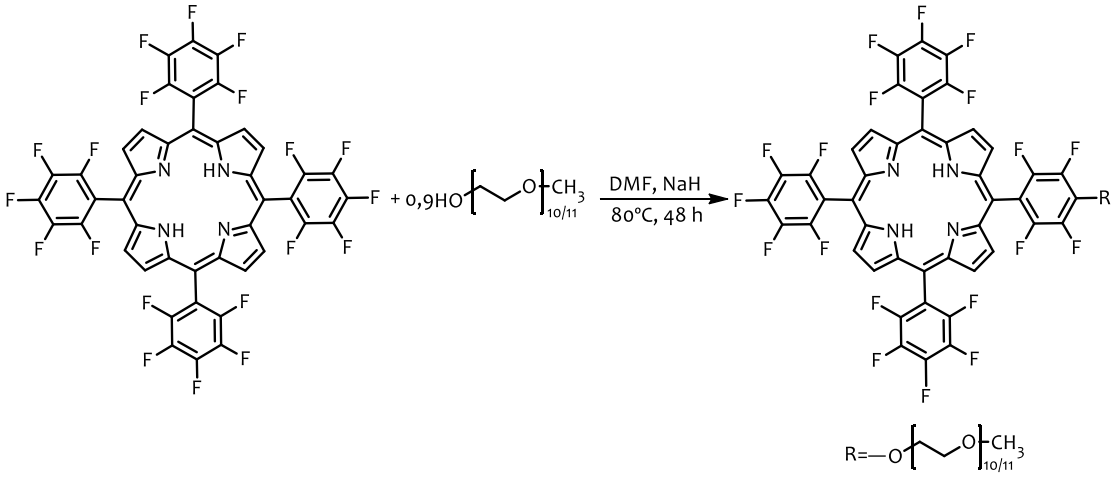


Figura 2.3. Síntese de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina (PFMonoPEG)

Caracterização estrutural

Para a caracterização estrutural dos compostos, foram obtidos espectros de RMN de protão (^{1}H) e flúor (^{19}F) para todos os compostos sintetizados. De forma a facilitar a interpretação da análise efetuada aos espectros, na figura 2.4 encontra-se uma esquematização da nomenclatura utilizada para definir os diferentes tipos de protões e flúores presentes nas porfirinas.

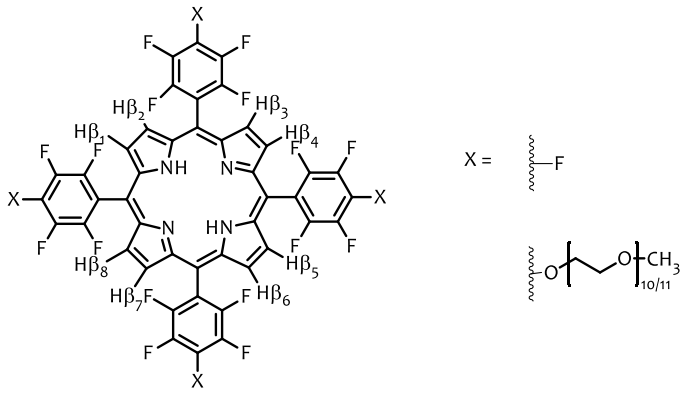


Figura 2.4. Nomenclatura proposta para definir os tipos de flúores presentes nas porfirinas sintetizadas

Na figura 2.5 apresenta-se o espectro de RMN protónico da porfirina TPFPP, onde se observam dois sinais característico: um sinal em forma de singleto a 8,93 ppm e um sinal também em forma de singleto a -2,90 ppm. O sinal a 8,93 ppm é atribuído aos protões situados no exterior do anel - protões β-pirrólicos (H_{β}) –, enquanto que o sinal a -2,90 ppm é atribuído aos protões dos NH do interior do anel. Os protões situados no exterior do anel encontram-se numa região onde as correntes de anel do macrociclo tetrapirrólicos reforçam o campo magnético externo, logo, estes protões estão menos protegidos, surgindo com maiores desvios químicos, tipicamente entre 8 – 9 ppm. Os protões do interior do anel sofrem uma grande blindagem, uma vez que o campo magnético gerado pelas correntes de anel tem sentido oposto ao campo magnético externo e, consequentemente, estes protões apresentam desvios químicos negativos, tipicamente -2 a -4 ppm.

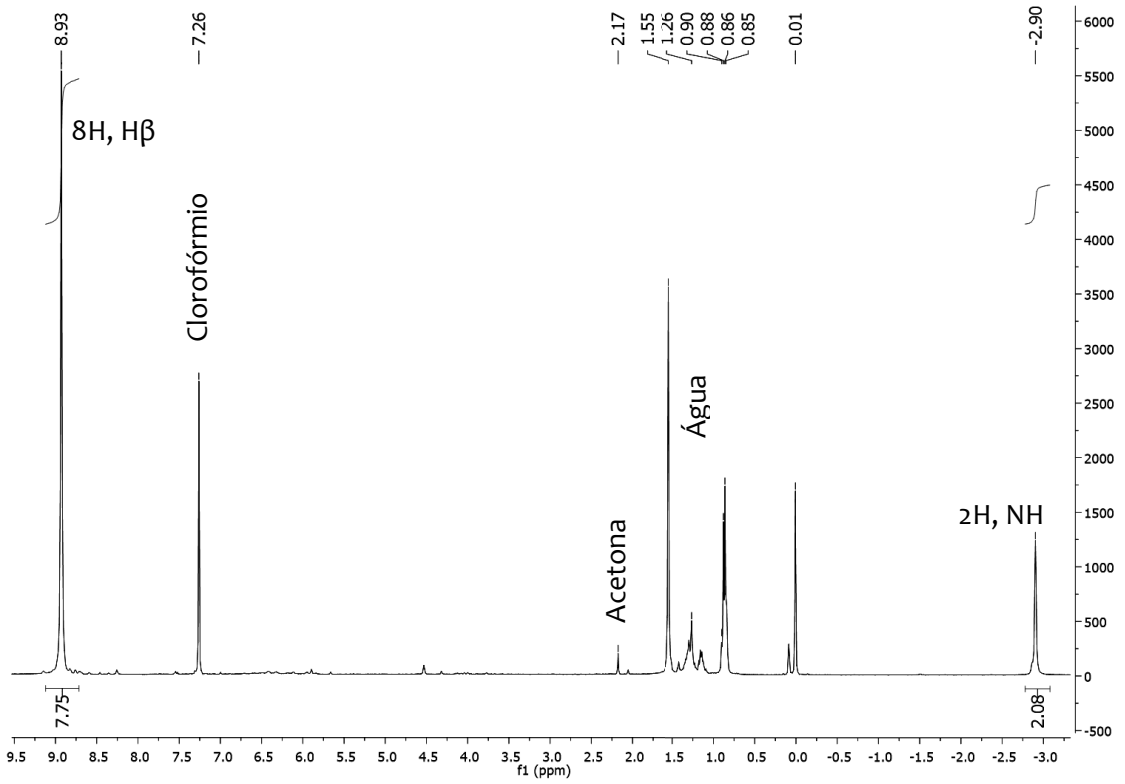


Figura 2.5. Espectro de RMN protónico para a porfirina TPFPP em clorofórmio

Para além da análise feita por RMN de ^{1}H, procedeu-se também a análise do espectro de RMN de ^{19}F dos compostos obtidos. Para uma melhor compreensão da atribuição feita aos picos do espectro encontra-se na figura 2.6 a numeração atribuída aos átomos de flúor da dos grupos benzoicos nas posições *meso* do macrociclo tetrapirrólico.

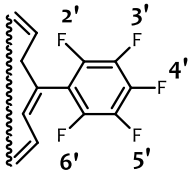


Figura 2.6. Numeração dos átomos de flúor de 5,10,15,20-tetra (pentafluorofenil) porfirina

Na figura 2.7 apresenta-se o espectro de RMN de flúor da porfirina TPFPP onde se observam três sinais característicos: um sinal em forma de duplo dupleto a -135,35 a -135,43 ppm, um tripleto a -150,05 a -150,16 ppm e um multipleto a -160,14 a -160,28 ppm. O primeiro duplo dupleto (-135,35 a -135,43 ppm) deve-se à ressonância dos oito átomos de flúor das posições *orto* (2' e 6') dos grupos fenilo, o tripleto à ressonância dos quatro átomos de flúor

da posição *para* (4') dos grupos fenilo e o multipleto corresponde aos restantes oito átomos de flúor das posições *meta* (3' e 5'). O acoplamento *J* surge da interação entre dois spins nucleares e pode ser classificado de curta ou longa distância. O acoplamento a curta distância com os átomos vizinhos (J^3) apresenta valores elevados, contrariamente o acoplamento a longas distâncias com o átomo que se encontra em posição *para* relativamente a si (J^5) apresenta valores mais baixos.[29] Cada átomo de flúor na posição 2' e 6' acopla com o seu átomo adjacente e com o átomo em posição oposta originando o duplo dupleto; o mesmo ocorre com cada átomo de flúor que se encontra na posição 3' e 5', no entanto neste caso ainda ocorre um acoplamento com o flúor da posição *para* fazendo com que se origine um multipleto. Por sua vez, cada átomo de flúor na posição *para* vai acoplar com os átomos adjacentes das posições 3' e 5' originando um tripleto.

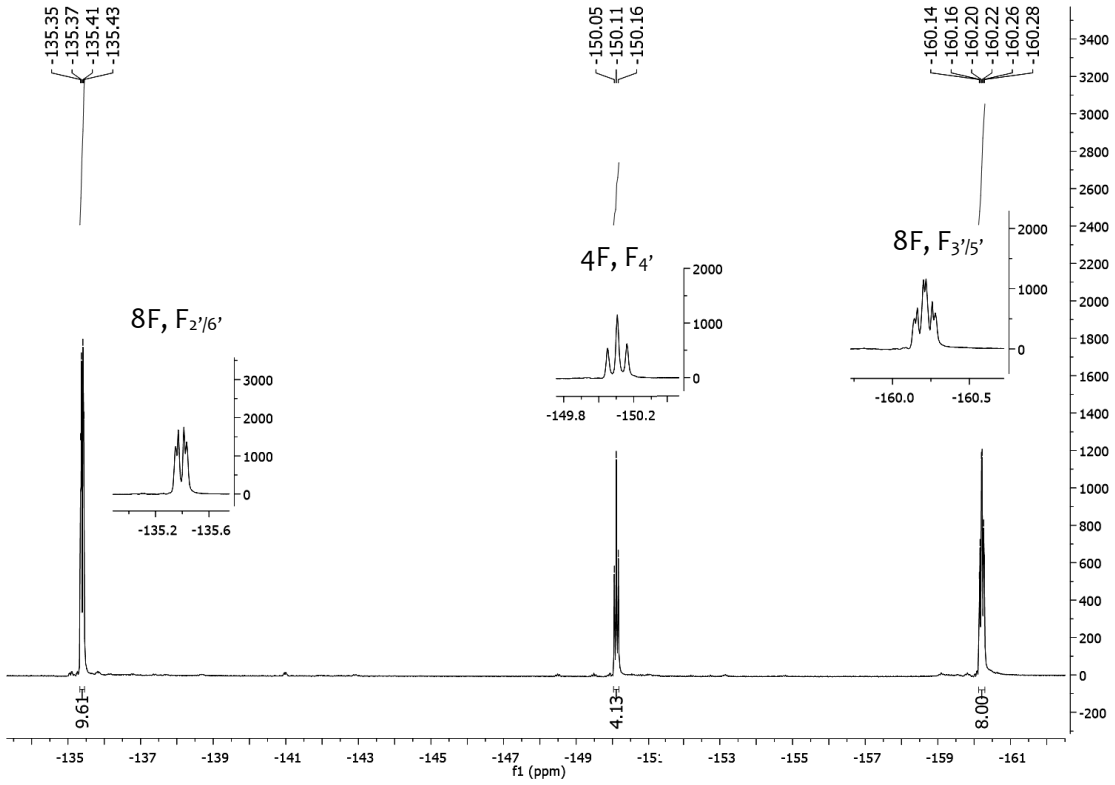


Figura 2.7. Espectro de RMN de flúor para a porfirina TPFPP em clorofórmio

As porfirinas PFTetraPEG e PFMonoPEG foram também caracterizadas através de RMN de ^1H e de ^{19}F; no entanto, é através dos espectros de RMN de flúor que se consegue interpretar quais os tipos de substituições que ocorreram nas porfirinas – mono ou tetrassubstituição.

Na figura 2.8 apresenta-se o espectro de RMN de flúor da porfirina PFTetraPEG, onde se observam apenas dois sinais: dois duplos dupletos a -138,84 a -138,92 ppm e a -156,95 a -157,03 ppm. Esses sinais são atribuídos aos dezasseis flúores que se encontram nas posições *orto* e *meta*, verificando-se um desaparecimento do sinal corresponde aos flúores que se encontravam nas posições *para*. O desaparecimento do sinal a -150,05 a -150,16 ppm confirma a substituição desses flúores pelo polietilenoglicol, comprovando a substituição total das quatro posições.

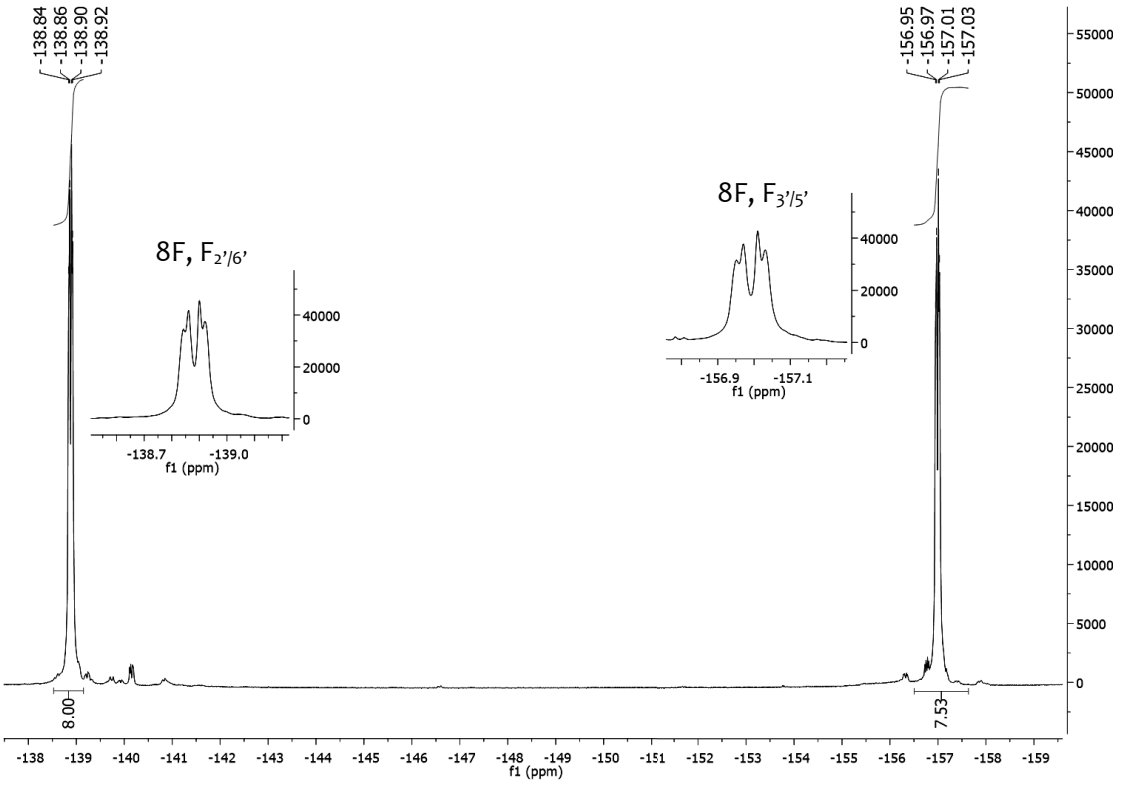


Figura 2.8. Espectro de RMN de flúor para a porfirina PFTetraPEG em clorofórmio

No espectro de RMN de flúor da porfirina PFMonoPEG surgem quatro sinais (figura 2.9): um duplo dupleto a -136,50 a -136,53 e três multipletos a -140,03 a -140,22 ppm, a -151,21 a -152,07 ppm e a -161,31 a -161,54 ppm. O primeiro duplo dupleto é atribuído aos seis flúores das posições *orto* dos grupos fenilos não substituídos, uma vez que acoplam com o seu átomo adjacente e com o átomo em posição oposta, situação apenas possível na existência de flúores na posição *para*. O multipleto a -140,03 a -140,22 ppm é atribuído aos três flúores das posições *para* dos grupos fenilos não substituídos. O multipleto, a -151,21 a -152,07 ppm, corresponde aos quatro flúores das posições *orto* e *meta* do grupo fenilo cujo flúor na posição *para* foi substituído pelo polietilenoglicol. Neste pico a presença do polietilenoglicol

com grupos eletronegativos, como o oxigénio, faz com que ocorra desblindagem dos flúores surgindo com maiores desvios químicos relativamente ao que acontece com os restantes flúores nestas posições dos grupos fenilos não substituídos. Por fim, o multipleto, a -161,31 a -161,54 ppm, é atribuído aos seis flúores das posições *meta* dos grupos fenilos não substituídos.

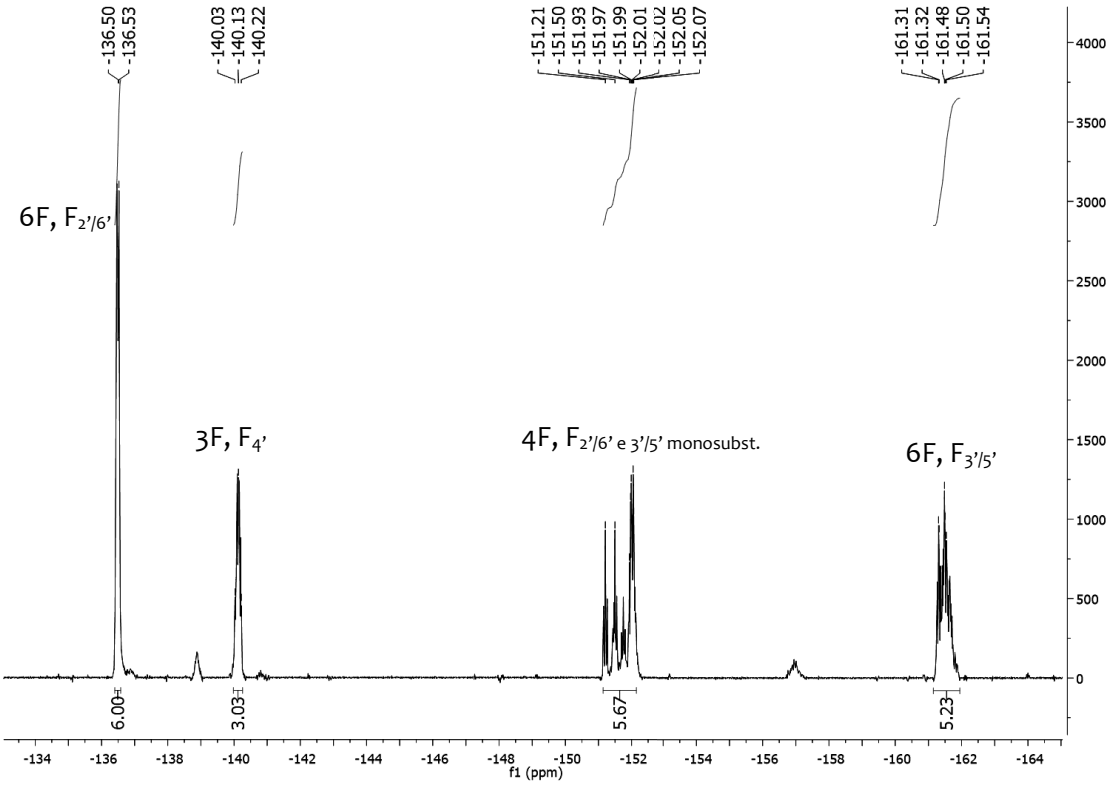


Figura 2.9. Espectro de RMN de flúor para a porfirina PFMonoPEG em clorofórmio

De seguida, apresentam-se duas tabelas resumo (tabela 2.1 e 2.2) com as propostas de atribuição dos valores referentes aos desvios químicos e, sempre que possível, as respetivas constantes de acoplamento e multiplicidades de spin para as porfirinas sintetizadas relativamente aos espectros de RMN protónico e de flúor.

Tabela 2.1. Desvios químicos (ppm) de RMN de ^{1}H das porfirinas fluoradas e funcionalizadas

Porfirina	H_{β}	H_{PEG}	$H_{NH\ pirrólicos}$
	8,93		-2,90
TPFPP	-	--------	-
	s		s
	8,93	3,65 a 3,60	-2,90
PFTetraPEG	-	-	-
	s	m	s
	8,91	3,63 a 3,30	-2,90
PFMonoPEG	-	-	-
	m	m	s

δ (desvio químico - ppm) em $CDCl_3$; *J* (constante de acoplamento - Hz); Multiplicidade de spin

Tabela 2.2. Desvios químicos (ppm) de RMN de ^{19}F das porfirinas fluoradas e funcionalizadas

Porfirina	$F_{3'/5'}$	$F_{4'}$	$F_{2'/6'\ e\ 3'/5'\ monosubst.}$	$F_{2'/6'}$
	-160,14 a -160,28	-150,05 a -150,16		-135,35 a -135,43
TPFPP	-	20,8	--------	4,0;12,0
	m	t		dd
	-156,95 a -157,03			-138,84 a -138,92
PFTetraPEG	4,0;22,0	--------	--------	4,0;12,0
	dd			dd
	-161,31 a -161,54	-140,03 a -140,22	-151,21 a -152,07	-136,50 a -136,53
PFMonoPEG	-	-	-	6,0;14,0
	m	m	m	dd

δ (desvio químico - ppm) em $CDCl_3$; *J* (constante de acoplamento - Hz); Multiplicidade de spin

De forma a complementar a caracterização dos compostos apresentados nesta dissertação recorreu-se a espectrometria de massa, obtendo-se espectros de massa com a técnica de ionização ESI-TOF. A título de exemplo, apresenta-se os resultados obtidos para a porfirina PFTetraPEG (figura 2.10).

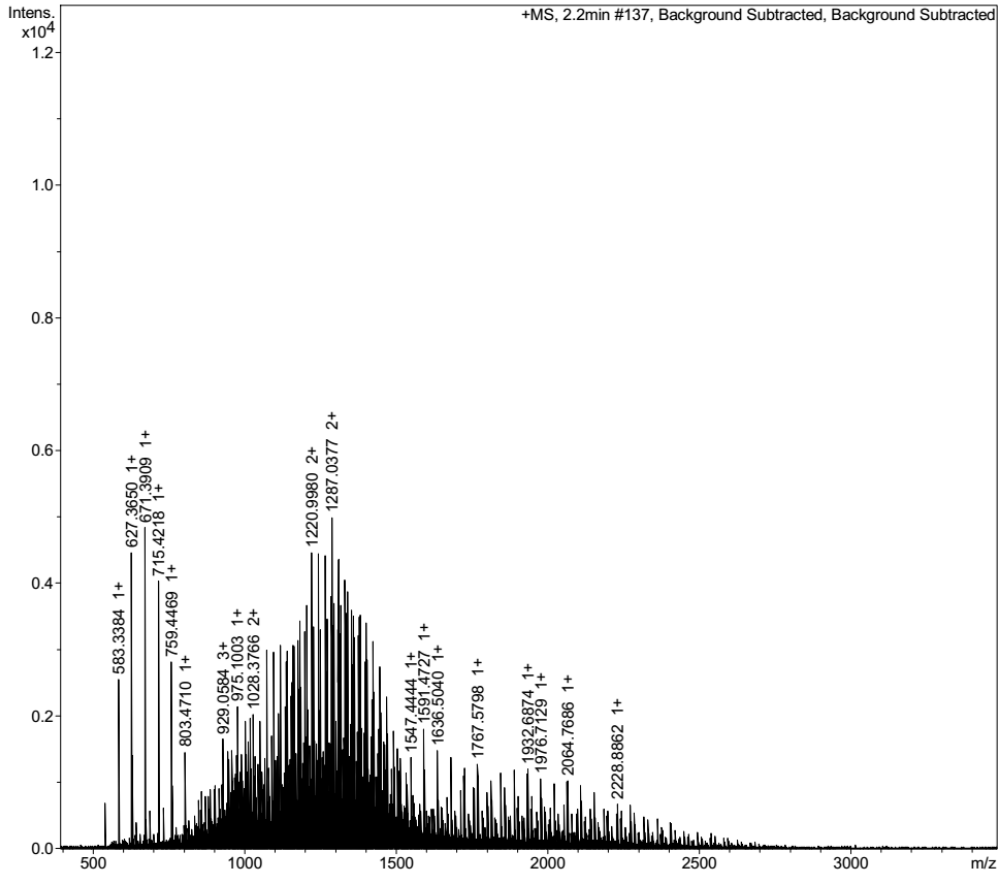


Figura 2.10. Espectro de massa ESI-TOF para a porfirina PFTetraPEG

O espectro de massa mostra a presença de uma distribuição polidispersiva do polietilenoglicol com relação massa/carga (m/z) 1028,3720; 1220,9980; 1287,0377; 1491,1818 correspondente ao ião molecular $[M]^{2+}$ da porfirina PFTetraPEG.

Para a porfirina PFMonoPEG também se observou o padrão de distribuição polidispersiva confirmando assim a substituição com uma unidade de polietilenoglicol. Os resultados encontram-se descritos na seção experimental (capítulo 5).

Estes compostos foram posteriormente estudados no que diz respeito às suas propriedades fotofísicas para potencial aplicação em terapia fotodinâmica (capítulo 3). Os seus espectros de RMN de flúor com elevada intensidade também abrem potencialidades

para aplicação como sondas em MRI. Resultados *in vivo* estão a ser desenvolvidos, mas estavam fora dos objetivos desta dissertação.

2.3. Síntese de metaloporfirina de Mn(III)

As porfirinas são ligandos macrocíclicos de excelência, uma vez que podem formar complexos metálicos com inúmeros metais, como por exemplo, o magnésio (II), o manganésio (II), o cobre (II), o ferro (III) ou o zinco (II).[30] A preparação de complexos metálicos possibilita a modelação da reatividade dos macrociclos tetrapirrólicos, permitindo, por exemplo, alterar os comprimentos de onda e a intensidade das bandas nos espectros de absorção UV-visível e de fluorescência.[31,32] Além disso, as metaloporfirina são muito estáveis apresentando um reduzido risco de transmetalação, isto é, são capazes de evitar a libertação do metal na avaliação por imagiologia de ressonância magnética, evitando problemas de toxicidade.[11,33] Neste trabalho procedeu-se ainda à preparação do complexo de manganésio da porfirina anfifílica PFTetraPEG, integrado num projeto em curso no grupo de Catálise e Química Fina da UC, que tem como objetivo a sua potencial aplicação como sonda redox para imagiologia de ressonância magnética.[34]

Para a síntese de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirinato de manganésio (III) (PFTetraPEG-Mn(III)) dissolveu-se a porfirina PFTetraPEG em acetato de sódio e ácido acético e adicionou-se um excesso de acetato de manganésio (II) tetrahidratado, deixando-se em refluxo à temperatura de 80 °C durante 2 horas (figura 2.11). A evolução da reação foi efetuada utilizando espectroscopia de absorção UV-visível, uma vez que quando a porfirina se encontra na forma de complexo metálico ocorre um desvio da absorção para o vermelho da banda Soret de (413 nm para 457 nm) e a transformação das quatro bandas Q da porfirina de base livre em duas bandas Q (555 e 741 nm), como é possível observar na figura 2.12. Além disso, no caso dos complexos de manganésio, observa-se ainda o aparecimento de uma banda adicional, entre os 350 nm e os 400 nm, que surge dada a ocorrência de transferência de carga do metal para o ligando. Após as duas horas verificou-se a conversão completa da porfirina a metaloporfirina. O crude foi purificado por extração com diclorometano: água de forma a remover o sal em excesso, tendo-se obtido o complexo de manganésio (III) com um rendimento de 82 %.

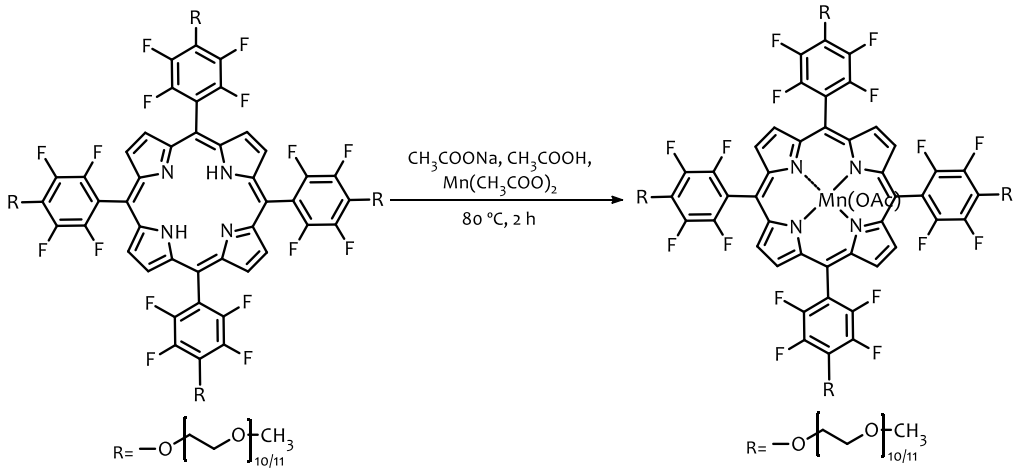


Figura 2.11. Síntese do complexo de manganésio PFTetraPEG-Mn(III)

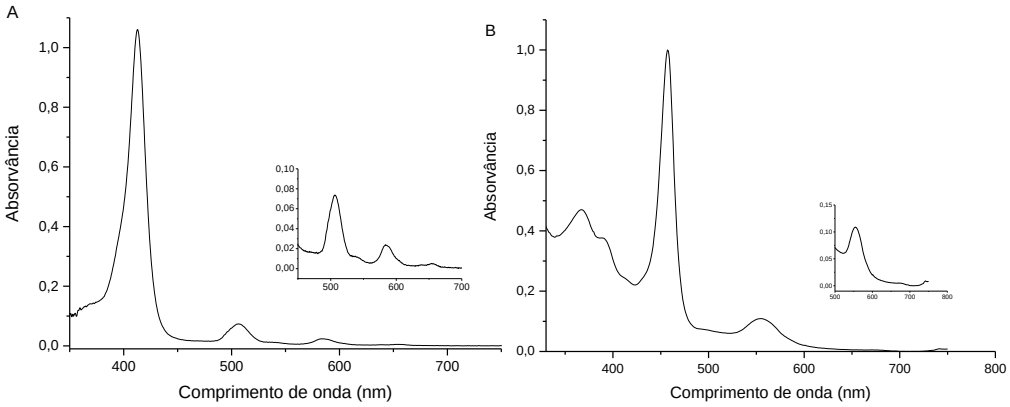


Figura 2.12. Espectro de absorção UV-visível **A:** porfirina PFTetraPEG (C= 3,42 x 10^{-6} M) **B:** porfirina complexada PFTetraPEG-Mn(III)

O complexo de Mn(III) foi caracterizado através de espectrometria de massa, apresentando também uma distribuição polidispersiva dada a presença do polietilenoglicol. Os resultados encontram-se descritos na seção experimental (capítulo 5).

2.4. Síntese de bacterioclorinas

A redução de uma ou duas ligações duplas das porfirinas a clorinas ou bacterioclorinas é bastante vantajosa, uma vez que estes compostos passam a absorver numa gama de comprimentos de onda na janela terapêutica (600 – 900 nm), onde a maior parte dos tecidos biológicos são transparentes.[35,36,37] Para além disso, apresentam ainda uma

maior capacidade de produção de oxigénio singleto e uma maior tendência para acumulação nas células tumorais.[38] Deste modo, é de elevado interesse a redução das porfirinas biocompatíveis anteriormente apresentadas, de forma a originar compostos que absorvam preferencialmente em regiões do infravermelho próximo.[39]

Para a redução recorreu-se a um método sustentável sem solvente que recorre à utilização de hidrazinas desenvolvido por *Pereira et al.*[40]. De acordo com este método, misturou-se a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina (PFTetraPEG) com um excesso de *p*-toluenossulfonilhidrazina num tubo de *Schlenk* e colocou-se sob vácuo de forma a remover o oxigénio presente (P = 0,1 Torr). De seguida, num banho a 140 ° C aqueceu-se o sólido de forma a ser atingida a temperatura de fusão da hidrazina. Quando ocorreu a sua fusão, o líquido dissolveu-se com a porfirina e ao fim de uma hora deu-se o término da reação (figura 2.13).

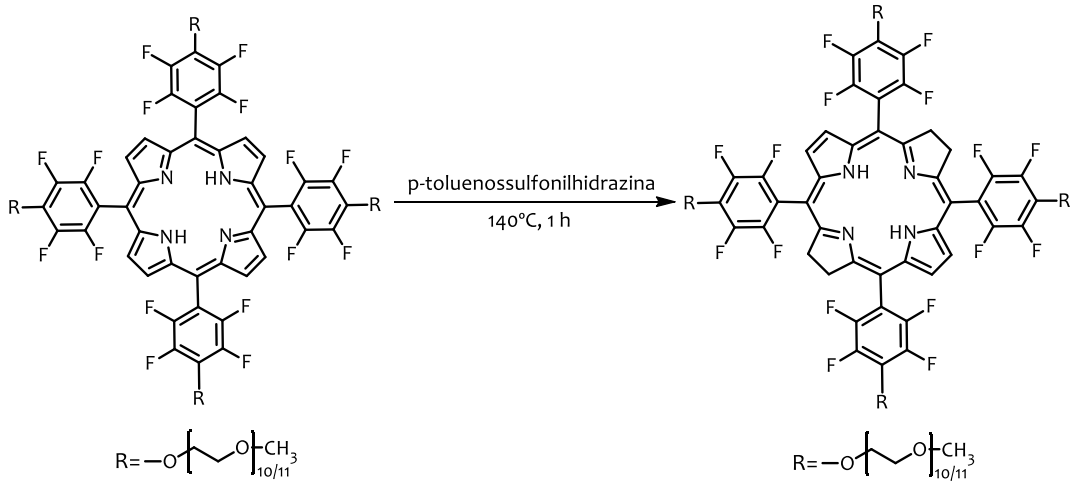


Figura 2.13. Síntese de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] bacterioclorina (BFTetraPEG)

Deixou-se arrefecer a mistura até à temperatura ambiente e retirou-se uma pequena amostra de crude, de forma a ser possível o controlo da reação por espectroscopia UV-visível (figura 2.14). Pela análise deste espectro observou-se a presença maioritária de bacterioclorina.

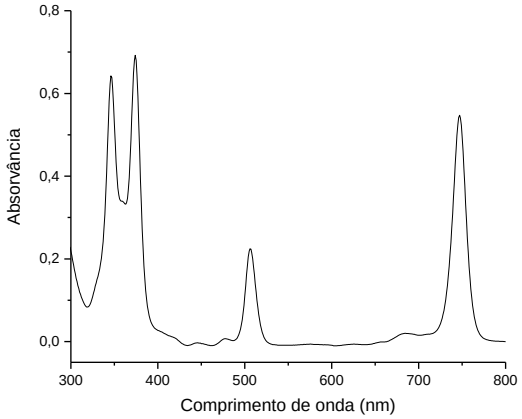


Figura 2.14. Espectro de absorção UV-visível do crude da reação de formação da bacterioclorina tetrafuncionalizada

Na purificação da bacterioclorina BFTetraPEG utilizaram-se as seguintes técnicas: i) extração com diclorometano e água ii) cromatografia em coluna com óxido de alumina usando como eluentes diclorometano e diclorometano: 5% metanol e, numa segunda tentativa, a mistura de 3:1 diclorometano:hexano iii) cromatografia em coluna com sílica usando como eluente diclorometano e, numa segunda aproximação, diclorometano e diclorometano: 3% trietilamina, procedendo-se sempre à lavagem da sílica no final. Salienta-se que em nenhum destes processos se conseguiu a separação do ácido *p*-toluenossulfónico e da *p*-toluenossulfonilhidrazina da respetiva bacterioclorina. Em seguida recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para otimizar as condições de separação dos vários componentes da mistura da reação. Os estudos de otimização do método de separação dos componentes da mistura BFTetraPEG apresentam-se na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Otimização das condições de separação por HPLC dos diferentes componentes da mistura reacional

Fase móvel	Componente na mistura	t_R (min)
50 % acetonitrilo 50% água	Ácido *p*-toluenossulfónico	1,82
	Bacterioclorina BFTetraPEG	2,46
	p-toluenossulfonilhidrazina	13,58
60 % acetonitrilo 40% água	Ácido *p*-toluenossulfónico	1,71
	Bacterioclorina BFTetraPEG	2,21
	p-toluenossulfonilhidrazina	7,43
70 % acetonitrilo 30% água	Ácido *p*-toluenossulfónico	1,75
	Bacterioclorina BFTetraPEG	3,3
	p-toluenossulfonilhidrazina	4,63
90 % acetonitrilo 10% água	Ácido *p*-toluenossulfónico	1,74
	Bacterioclorina BFTetraPEG	2
	p-toluenossulfonilhidrazina	6,77

Em todas as fases móveis utilizadas verifica-se que o ácido p-toluenossulfónico é o que fica menos retido, uma vez que este componente é o mais polar da mistura, de seguida, a bacterioclorina e, por fim, a p-toluenosulfonilhidrazina que é o componente mais apolar. Através da análise dos dados apresentados na tabela 2.3 e dos espectros de absorção UV-visível adquiridos em cada pico cromatográfico observa-se que a separação dos componentes na mistura é mais eficiente quando se recorre à utilização do eluente 70 % acetonitrilo: 30 % água. Após otimização do método de separação no HPLC e não tendo disponível um HPLC preparativo decidiu-se proceder à purificação da bacterioclorina BFTetraPEG por cromatografia de exclusão molecular em *Sephadex G-10* com fluxo de 2,5 mL/min. O processo de purificação foi monitorizado por HPLC de fase reversa usando as condições previamente otimizadas (fluxo de 1 mL/min e um eluente de 70 % acetonitrilo e 30 % água) (figura 2.15 A). Da análise do cromatograma da bacterioclorina BFTetraPEG purificada por Sephadex e apresentado na figura 2.15 B é possível concluir que o processo de purificação foi eficiente porque se observou apenas um pico com tempo de retenção de aproximadamente 3,3 min, cujo espectro de absorção UV-visível também apresentado na

figura 2.15 C é característico da 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]bacterioclorina (BFTetraPEG).

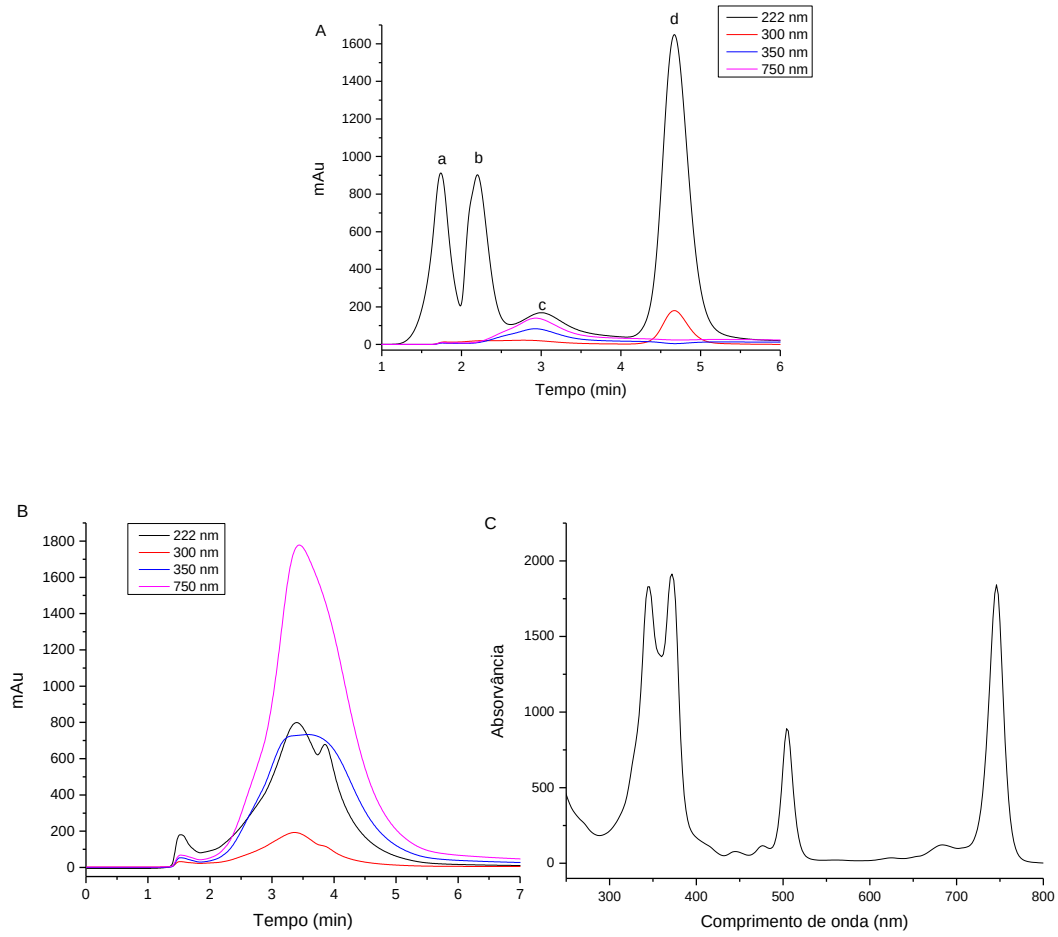


Figura 2.15. Cromatogramas **A:** separação da mistura com fase móvel 70 % acetonitrilo: 30 % água a – frente do solvente; b – ácido p-toluenossulfónico; c – bacterioclorina BFTetraPEG; d – p-toluenossulfonilhidrazina **B:** de controlo da purificação feita através de cromatografia de exclusão molecular com fluxo 2,5 mL/min **C:** Espectro de absorção UV-visível

A fração recolhida em água da cromatografia Sephadex foi liofilizada e após pesagem concluiu-se que o rendimento da bacterioclorina BFTetraPEG purificada foi de 43,6 %.

Estudos preliminares da síntese de um bioconjugado de bacterioclorina fluorada com um peptídeo

Para modular a anfifilicidade do composto e permitir futuras derivatizações procedeu-se também à síntese da bacterioclorina monofuncionalizada com PEG. A redução da porfirina PFMonoPEG à bacterioclorina monofuncionalizada foi efetuada através do mesmo método sem solvente previamente descrito, figura 2.16.

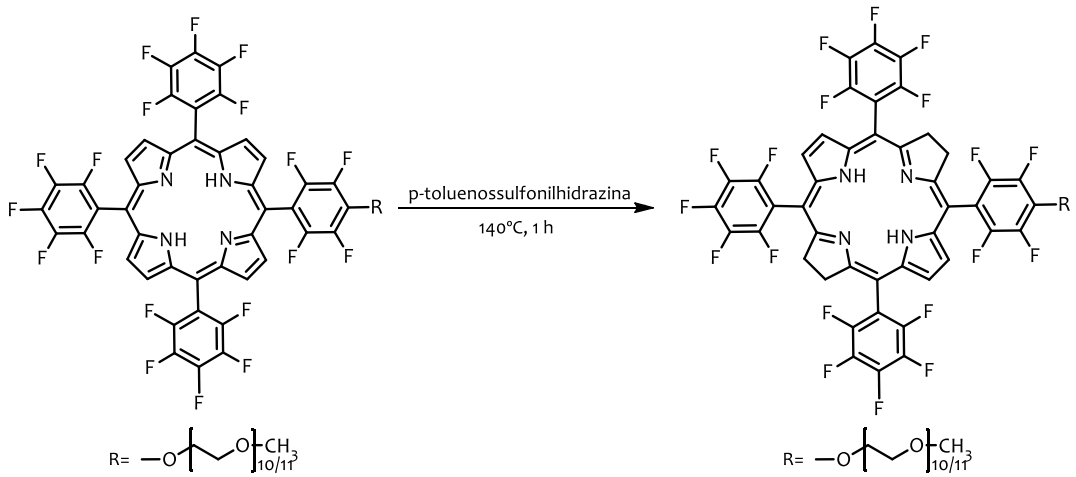


Figura 2.16. Síntese de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]bacterioclorina

Tal como anteriormente, após arrefecimento da mistura de reação até à temperatura ambiente, retirou-se uma pequena amostra de crude, de forma a ser possível o controlo da reação por espectroscopia UV-visível (figura 2.17).

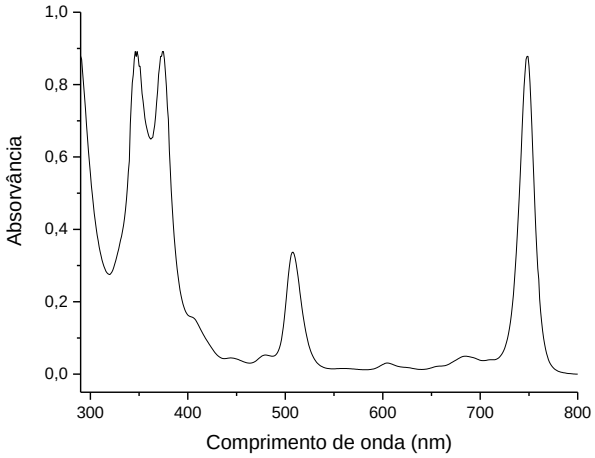


Figura 2.17. Espectro de absorção UV-visível do crude da reação de formação da bacterioclorina monofuncionalizada

A bacterioclorina monofuncionalizada apresenta três flúores em posições *para* livres suscetíveis à ocorrência de novas reações de substituição nucleofílica aromática. Assim, num processo sequencial sem purificação da bacterioclorina conjugou-se com um peptídeo que por questões de confidencialidade será designado de BFMonoPEG-peptídeo. Num estudo preliminar, a conjugação com a bacterioclorina foi efetuada através dos grupos nucleofílicos presentes no peptídeo, nomeadamente através dos grupos tiol dos resíduos de cisteína, dos grupos hidroxilo dos resíduos de tirosina e dos grupos amina dos resíduos de triptofano. Colocou-se em solução a 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]bacterioclorina com o peptídeo na presença de carbonato de césio, usando tetrahidrofurano seco (THF) como solvente. A mistura permaneceu com agitação em atmosfera inerte à temperatura ambiente durante 72 h observando-se por TLC o consumo total de bacterioclorina de partida. Contrariamente ao que acontece com a bacterioclorina de partida - monofuncionalizada, o produto conjugado apresenta elevada solubilidade em água. Essa solubilidade permitiu que a purificação do crude por cromatografia de exclusão molecular, usando a resina Sephadex G-10 e água destilada como eluente. Após purificação o composto foi liofilizado e obteve-se um sólido com cor bege. Na figura 2.18 encontra-se representado o espectro de absorção UV-visível da bacterioclorina conjugada com o peptídeo BFMonoPEG-peptídeo. A banda a 422 nm é resultado de uma pequena oxidação à correspondente clorina ou porfirina durante o processo de purificação. A preparação em maior escala e a caracterização completa, assim como a sua aplicação

futura como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica para arrítmicas cardíacas é objeto de estudo confidencial a decorrer no grupo.

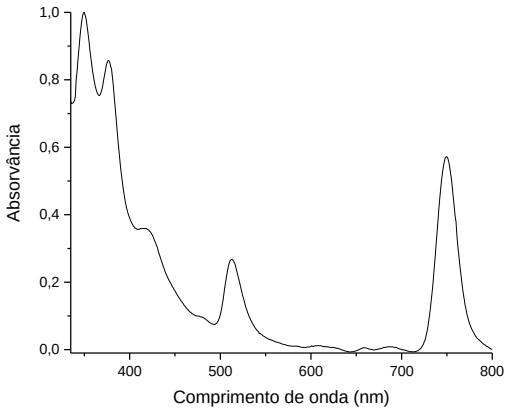


Figura 2.18. Espectro de absorção UV-visível da bacterioclorina conjugada com o peptídeo (BFMonoPEG-peptídeo)

Caracterização estrutural

Tal como as porfirinas também a bacterioclorina BFTetraPEG foi caracterizada por RMN de protão e de flúor. Na figura 2.19 apresenta-se o espectro de RMN protónico da bacterioclorina BFTetraPEG, onde se observam quatros sinais característicos: um singleto a 8,11 ppm, um tripleto a 4,63 ppm, um multipleto a 3,66 a 3,63 ppm e um singleto a -1,43 ppm. Desta forma, relativamente aos protões β-pirrólicos observa-se um sinal singleto a 8,11 ppm e um sinal a 4,63 ppm correspondente aos oito protões das posições reduzidas. Os protões do interior do anel sofrem uma menor blindagem uma vez que a corrente gerada pelo anel do macrociclo tetrapirrólicos é inferior ao que se verifica no caso das porfirinas. Sendo o normal sinal a -2,90 ppm desviado para os -1,43 ppm, devido à diminuição da conjugação resultante da redução de dois dos anéis da porfirina. Para além disso, surge o multipleto a 3,66 a 3,63 ppm correspondente aos protões dos quatro grupos de polietilenoglicol existentes nas posições *para*.

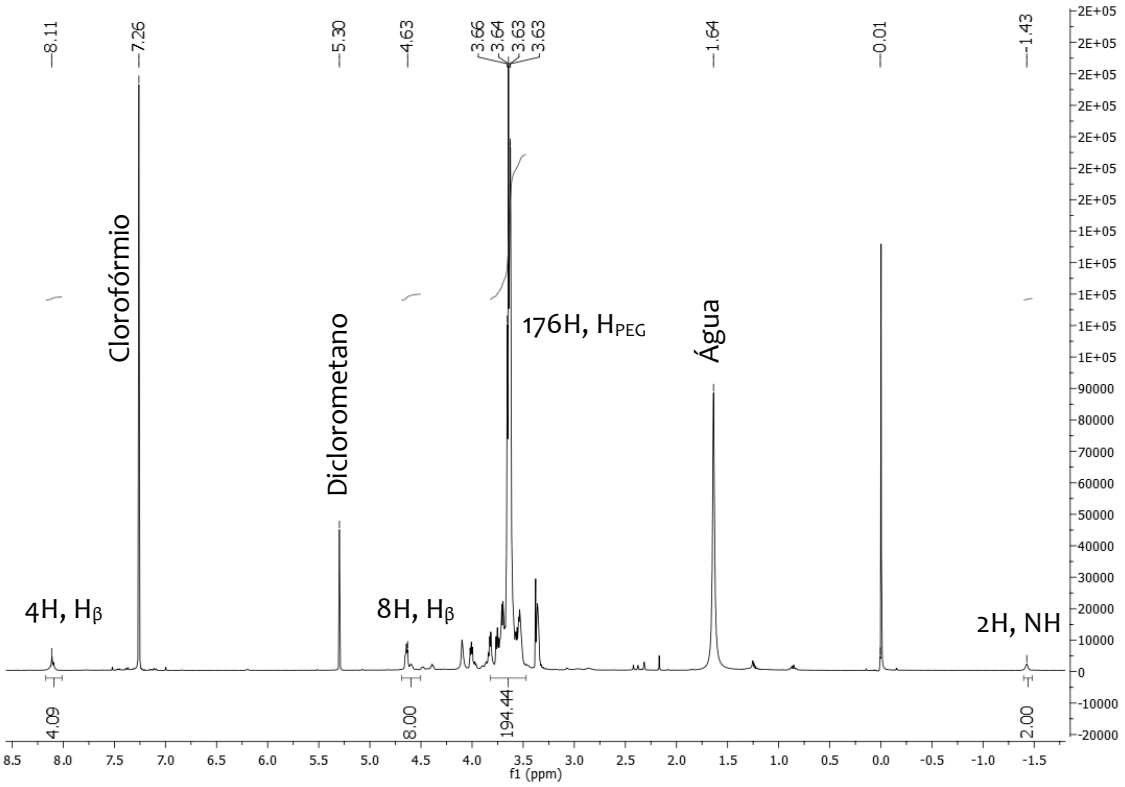


Figura 2.19. Espectro de RMN protónico para a bacterioclorina BFTetraPEG em clorofórmio

Procedeu-se também à análise do espectro de RMN de ^{19}F da bacterioclorina BFTetraPEG. O espectro apresentado na figura 2.20 é semelhante ao da porfirina tetrassubstituída que lhe deu origem, apresentando, por isso, dois multipletos, correspondentes aos oito fluores das posições *orto* e aos oito flúores das posições *meta* dos grupos fenilo o que corrobora a simetria da nova molécula e que não ocorreu nenhuma decomposição dos polietilenoglicois aquando da reação de preparação da bacterioclorina.

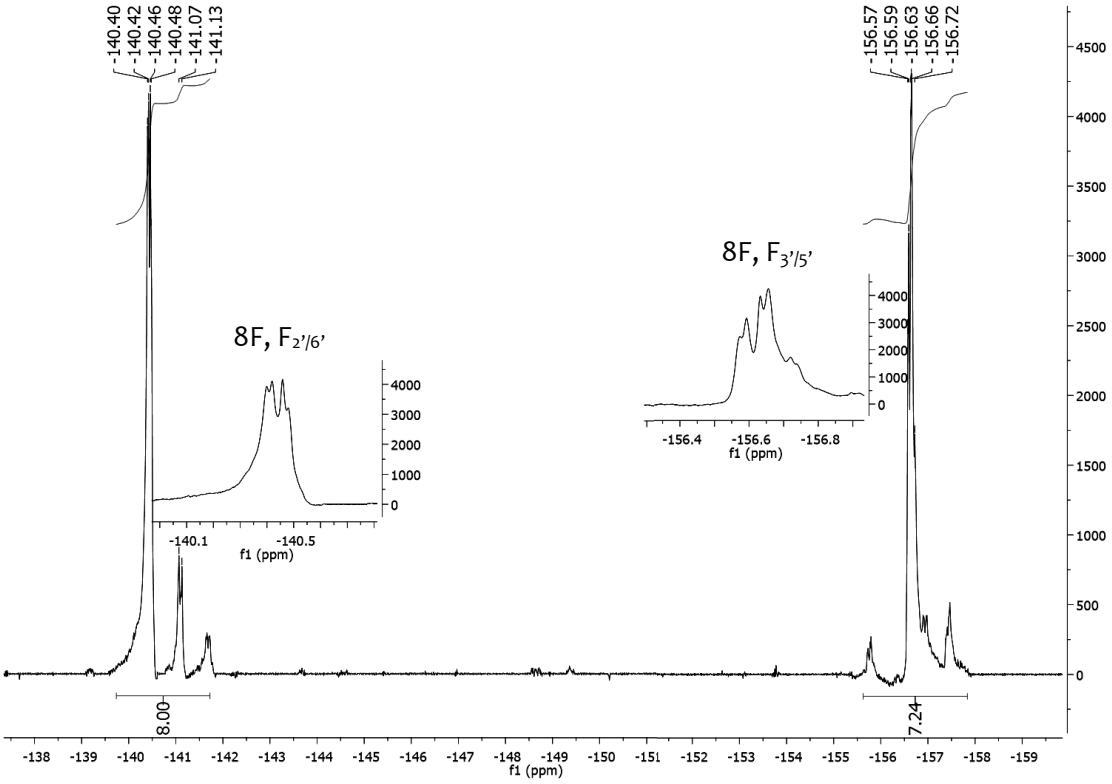


Figura 2.20. Espectro de RMN de flúor da bacterioclorina BFTetraPEG em clorofórmio

Referências

[1] Vinagreiro C.S., Gonçalves N.P.F., Calvete M.J.F., Schaberle F.A., Arnaut L.G., Pereira M.M., *Journal of Fluorine Chemistry*, **2015**, 180, 161 – 167.

[2] Unzner T. A., Magauer T., *Tetrahedron Letters*, **2015**, 56, 877 – 883.

[3] Goslinski T., Piskorz J., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2011**, 12, 304 – 321.

[4] Meanwell N. A., Eastman K. J., Gillis E. P., Fluorine in Heterocyclic Chemistry: 5-Membered Heterocycles and Macrocycles, *Springer*, 1, **2014.**

[5] Hagmann W.K., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 4359 - 4369.

[6] Purser S., Moore P.R., Swallow S. e Gouverneur V., *Chem. Soc. Rev*., **2008**, 37, 320 – 330.

[7] Yerien D.E., Bonesi S.M., Postigo A., *Org. Biomol. Chem*., **2016**,14, 8398 - 8427.

[8] O'Hagan D., *Chem. Soc. Rev*., **2008**, 37, 308 - 319.

[9] Vulpetti A., Dalvit C., *Drug Discovery Today*, **2012**, 17, 890 – 897.

[10] Tirotta I., Dichiarante V., Pigliacelli C., Cavallo G., Terraneo G., Bombelli F.B., Metrangolo P., Resnati G., *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 1106 – 1129.

[11] Bryden F., Boyle R.W., *Advances in Inorganic Chemistry*, **2016**, 68, 141 – 221.

[12] Kadish K.M., Araullo-McAdams C., Han B.C., Franzen M.M., *J. Am. Chem. Soc.,* **1990**, 112, 8364-8368.

[13] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbanska K., Simões S., Stochel G., Cortes L., *Free Radical Biology & Medicine*, **2012**, 52, 1188 – 1200.

[14] Bonnett R., Harriman A., Kozyrev A.N., *J. Chem. Soc. Faraday Trans*., **1992**, 88, 763 – 769.

[15] Jeong H.G., Choi M.S., *Isr. J. Chem*., **2016**, 56, 110 – 118.

[16] Rocha Gonsalves A.M.A., Varejão J.M.T.B., Pereira M.M., *J. Heterocyclic Chem*., **1991**, 28, 635 – 640.

[17] Grancho J.C.P., Pereira M.M., Miguel M. G., Rocha Gonsalves A.M., Burrows H.D., Photochemistry *and Photobiology*, **2002**, 75, 249 – 256.

[18] Silva M., Fernandes A., Bebiano S.S., Calvete M.J.F., Ribeiro M.F., Burrows H.D., Pereira M.M., *Chem. Commun*., **2014**, 50, 6571 – 6573.

[19] D'Souza A.A., Shegokar R., *Expert Opin Drug Deliv.*, **2016**, 13,1257 - 1275.

[20] Harris J.M., Poly(ethylene) glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, *Spinger Science and Business Media - LLC*, **1992**.

[21] Harris J.M., Chess R.B., *Nature*, **2003**, 2, 214 – 221.

[22] Hutanu D., Frishberg M.D., Guo L., Darie C.C., *Mod. Chem*., **2014**, 2, 1 -6.

[23] Veronese F.M., *Biomaterials*, **2001**, 22, 405 – 417.

[24] Staegemann M.H., Grafe S., Haag R., Wiehe A., *Org. Biomol. Chem*., **2016**, 14, 9114 – 9132.

[25] Clayden J., Greeves N., Warren S., Organic Chemistry, *Oxford: University Press*, 2º ed., **2012**.

[26] Neumann C.N., Hooker J.M., Ritter T., *Nature*, **2016**, 534, 369 – 373.

[27] Chen S., Zhao X., Chen J., Chen J., Kuznetsova L., Wong S.S., Ojima I. , *Bioconjug Chem*., **2010**, 21, 979 – 987.

[28] Yang W., Cheng Y., Xu T., Wang X., Wen L.P., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 862 – 868.

[29] Vinagreiro C., *Síntese de conjugados de sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com potencial aplicação dual em químio- e fototerapia*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, **2015.**

[30] Huang H., Song W., Rieffel J., Lovell J.F., *Frontiers in Physics*, **2015**, 3, 1 – 15.

[31] Papkovsky D.B., O'Riordan T.C., *Journal of Fluorescence,* **2005**, 15, 569 – 584.

[32] Zheng W., Shan N., Yu L., Wang X., *Dyes and Pigments*, **2008**, 77, 153 – 157.

[33] Koifman O.I., Ageeva T.A., *Russian Chemical Bulletin - International Edition,* **2015**, 64, 2001 – 2011.

[34] Cooperação Portugal/França Programa Pessoa - FCT/4061/4/4/2017/S - 2017/2018

[35] Silva E.F.F., Dabrowski J.M., Monteiro C.J.P., Formosinho S.J., Stochel G., Urbanska K., Simões S., Pereira M.M., Arnaut L.G., *Chem. Eur. J*., **2010**, 16, 9273 – 9286.

[36] Kim H.J., Lindsey J.S., *J. Org. Chem*., **2005**, 70, 5475 – 5486.

[37] Calvete M.J.F., Simões A.V.C., Henriques C.A., Pinto S.M.A., Pereira M.M., *Current Organic Synthesis*, **2014**, 11, 127 – 140.

[38] Chen Y., Li G., Pandey R.K., *Current Organic Chemistry*, **2004**, 8, 1105 – 1134.

[39] Muthiah C., Taniguchi M., Kim H.J., Schmidt I., Kee H.L., Holten D., Bocian D.F., Lindsey J.S., *Photochemistry and Photobiology*, **2007**, 83, 1513 – 1528.

[40] Pereira M.M., Abreu A.R., Goncalves N.P.F., Calvete M.J.F., Simões A.V.C., Monteiro C.J.P., Arnaut L.G., Eusébio M.E., Canotilho J., *Green Chem*., **2012**, 14, 1666 – 1672.

Capítulo 3

Avaliação das propriedades fotofísicas dos macrociclos tetrapirrólicos fluorados e funcionalizados e estudos *in vitro* da bacterioclorina BFTetraPEG

Com o objetivo de avaliar a potencialidade dos novos compostos sintetizados e apresentados nesta tese como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, efetuou-se a correspondente caracterização fotofísica, incluindo a determinação dos rendimentos quântico de fluorescência e de formação de oxigénio singleto. Para além disso, estudou-se ainda a fotoestabilidade e realizaram-se ensaios *in vitro* de forma a avaliar a citotoxicidade, a fototoxicidade e a internalização celular.

3.1. Espectroscopia de absorção UV-visível

As porfirinas possuem um sistema deslocalizado e conjugado de eletrões π que lhes permite absorver radiação na zona do UV-visível, apresentando espectros UV-visível únicos.[1,2] O espectro de absorção UV-visível de base livre de uma porfirina carateriza-se pela presença de uma banda de forte intensidade localizada a cerca de 400 nm, designada de banda B ou Soret, e por quatro bandas de menor intensidade localizadas entre os 500 – 700 nm, designadas de bandas Q, segundo a terminologia descrita por *Platt*.[3,4,5] No início da década de 60, *Gouterman*[6,7,8] propôs um modelo simplificado designado por modelo das quatro orbitais, que é, ainda hoje, o mais consensual para a explicação deste tipo de espectros.

Neste modelo os espectros de absorção UV-visível são interpretados com base nas transições eletrónicas entre quatro orbitais: duas orbitais ocupadas de maior energia – HOMO, designadas de b_1 e b_2 (orbitais π) e duas orbitais desocupadas de menor energia – LUMO, designadas por c_1 e c_2 (orbitais π*). Segundo *Gouterman*, pode arbitrar-se um sistema de eixos cartesianos x e y sobre o macrociclo das porfirinas, podendo ocorrer transições B_x, B_y, Q_x e Q_y. A banda Q_y resulta da transição entre as orbitais b_1 e c_1 e a banda Q_x da transição

entre as orbitais b_1 e c_2. As bandas B_x e B_y resultam, respetivamente, das transições b_2 - c_1 e b_2 - c_2 (figura 3.1) De referir que estas bandas podem ainda ser representadas por B_x (0,0), B_y (0,0), Q_x (0,0) e Q_y (0,0), uma vez que as transições se efetuam entre o nível vibracional zero do estado fundamental e o nível vibracional zero do estado excitado. Além disso, pode ainda surgir um *overtone* vibrónico nas bandas Q surgindo as transições representadas por Q_x (1,0) e Q_y (1,0).

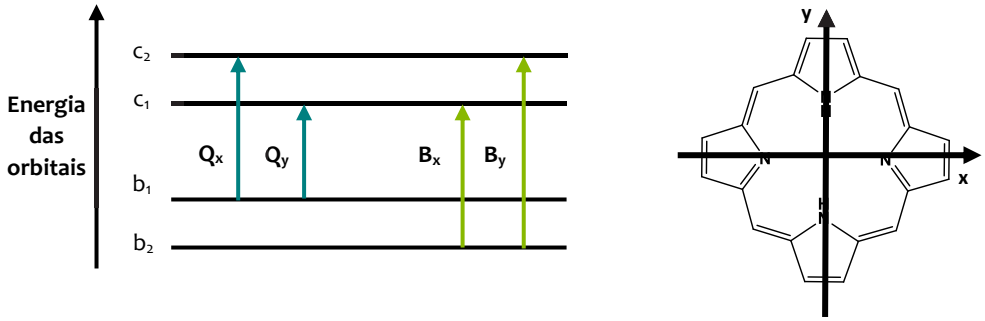


Figura 3.1. Representação das transições eletrónicas entre o estado fundamental e o estado excitado de porfirinas segundo modelo de *Gouterman* e sistemas de eixos coordenados nas porfirinas

No espectro de UV-Visível de uma porfirina observam-se quatro bandas Q individualizadas e apenas uma banda Soret ou B, o que se deve ao facto de a diferença de energia entre as bandas B_x e B_y ser pequena, aparecendo apenas uma banda B alargada. [6,7] A intensidade das bandas Q varia com a natureza e a posição dos grupos substituintes no macrociclo, o que levou *Stern et al.*[9,10] a propor uma classificação dos espectros de acordo com essa intensidade relativa. Essa classificação engloba quatro tipos de espectros: *etio, rhodo, oxorhodo e filo*.

Na figura 3.2 A, B, C e D, surgem representados os espectros de absorção UV-visível das porfirinas PFMonoPEG em THF, da porfirina PFTetraPEG em THF e PBS e da bacterioclorina BFTetraPEG em THF.

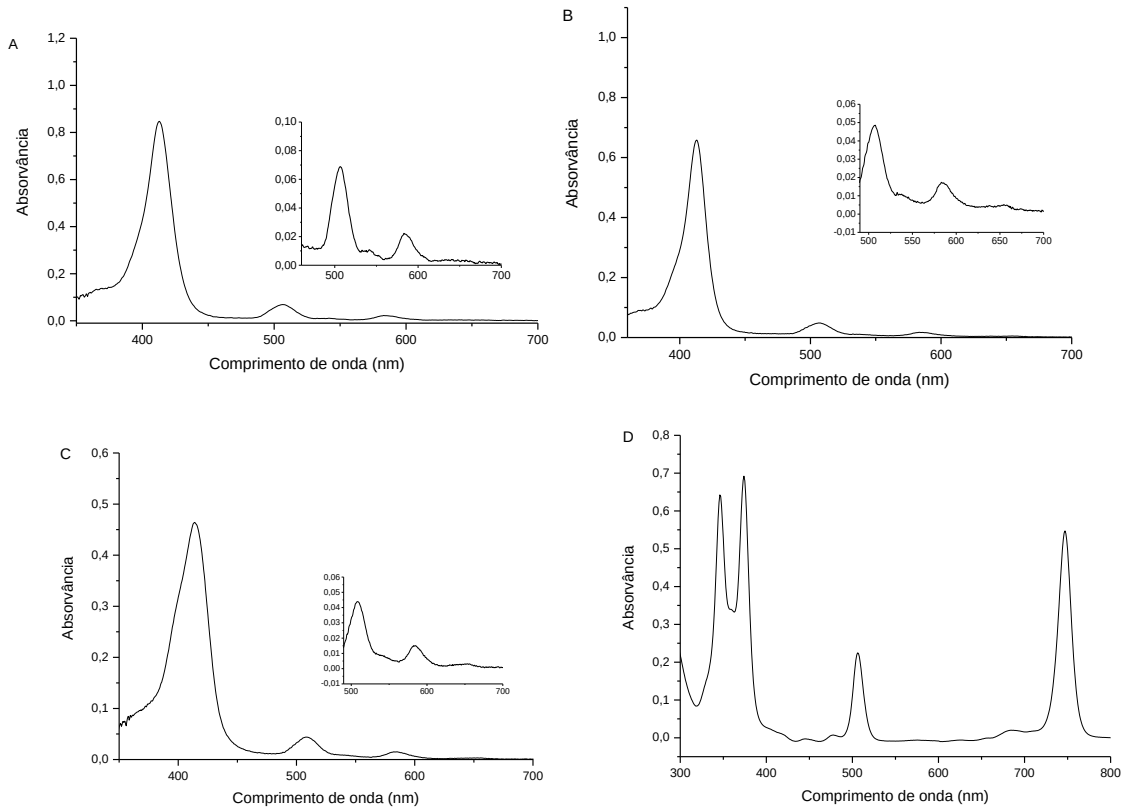


Figura 3.2. Espectro de absorção UV-visível **A:** porfirina PFMonoPEG em THF (C = 3,16 x 10^{-6} M) **B:** porfirina PFTetraPEG em THF (C = 2,28 x 10^{-6} M) **C:** porfirina PFTetraPEG em PBS (C = 3,32 x 10^{-6} M) **D:** bacterioclorina BFTetraPEG em THF (C = 7,03 x 10^{-6} M)

As porfirinas PFTetraPEG e PFMonoPEG (figura 3.2 A, B e C) têm uma banda de maior intensidade (banda Soret ou B) a cerca de 410 nm e quatro bandas de menor intensidade (bandas Q) entre os 500 – 650 nm atribuídas às transições vibracionais (0,0) e (1,0) das bandas Q_x e Q_y. No caso da bacterioclorina BFTetraPEG (figura 3.2 D) surgem duas bandas B a 346 nm e a 374 nm, a banda Q_x a 506 nm e a banda intensa Q_y a 747 nm, observando-se assim que a redução da porfirina a bacterioclorina resulta num desvio batocrómico das bandas Q. Com esse desvio este composto passa a absorver fortemente na região do infravermelho próximo (600 – 700 nm), o que lhe possibilita uma melhor aplicabilidade em fotomedicina.[11]

Segundo *Stern*, a substituição de um grupo nas posições *meso* de uma porfirina vai alterar a energia do estado fundamental b_1, sem afetar b_2. Como o estado b_1 está diretamente relacionado com a intensidade das bandas Q uma perturbação das orbitais moleculares do estado eletrónico vai contribuir para a alteração da intensidade relativa das bandas Q. Assim,

a introdução de halogénios no anel do grupo fenilo das posições *meso* das porfirinas faz com que ocorram perturbações nas orbitais moleculares de b1, alterando o espectro do tipo *etio* para *filo* no caso das porfirinas em estudo.[12]

A lei de Beer-Lambert indica que existe uma dependência logarítmica entre a intensidade de luz incidente numa amostra (I_o) e a intensidade de luz transmitida por essa amostra (I). Para além disso, permite ainda relacionar a fração de luz incidente absorvida, num determinado comprimento de onda, com o coeficiente de absorção molar (em M^{-1} cm^{-1}), com a concentração da amostra (em M) e com o comprimento do percurso ótico (em cm), tal como se representa na equação (*I*).[13,14]

$$A\,(\lambda) = log\frac{I_o}{I} = \varepsilon(\lambda)lc \Leftrightarrow \varepsilon\,(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{lc} \quad \textbf{(I)}$$

Com base nesta lei e fixando o comprimento do percurso ótico em 1 cm, determinaram-se os coeficientes de absorção molar de cada um dos compostos. Para isso, foram preparadas soluções com concentrações que variam entre 10^{-6} e 10^{-7} M em THF para os diferentes compostos sintetizados, com exceção da porfirina PFTetraPEG que foram também preparadas soluções em tampão fosfato pH=7,4 (*Posphate Buffer Saline* - PBS). De seguida, representou-se graficamente as absorvâncias em função da concentração das soluções previamente preparadas, efetuando, posteriormente, um ajuste linear. O declive da recta para esse ajuste corresponde ao coeficiente de absorção molar para cada banda em análise.

Na figura 3.3 apresenta-se, a título de exemplo, uma representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda Soret (a 413 nm) da porfirina PFTetraPEG em THF.

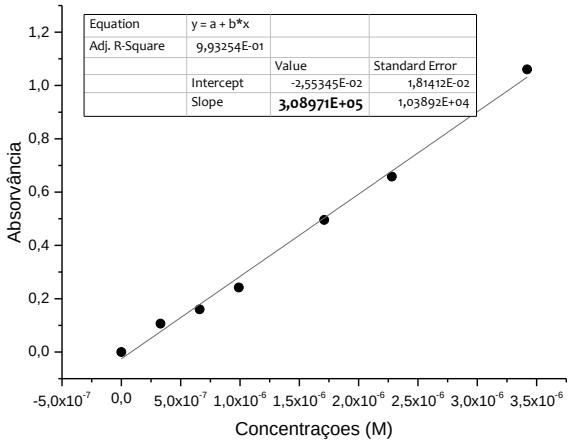


Figura 3.3. Representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda Soret (λ=413 nm) da porfirina PFTetraPEG em THF

Os comprimentos de onda de absorção máxima e os correspondentes coeficientes de absorção molar surgem representados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Propriedades de absorção dos compostos fluorados funcionalizados: 1 - porfirina PFTetraPEG em THF; 2 – porfirina PFTetraPEG em PBS; 3 – porfirina PFMonoPEG em THF 4 - bacterioclorina BFTetraPEG em THF

	Absorção λ (nm); ε (M^{-1} cm^{-1})					
	B (0,0)		**Q_y (1,0)**	**Q_y (0,0)**	**Q_x (1,0)**	**Q_x (0,0)**
	413		**507**	**535**	**583**	**654**
1	$3{,}1 \times 10^5$		$2{,}2 \times 10^4$	$3{,}7 \times 10^3$	$7{,}0 \times 10^3$	$1{,}7 \times 10^3$
	414		**508**	**539**	**582**	**653**
2	$1{,}5 \times 10^5$		$1{,}4 \times 10^4$	$3{,}0 \times 10^3$	$4{,}7 \times 10^3$	$1{,}1 \times 10^3$
	413		**505**	**537**	**585**	**658**
3	$2{,}8 \times 10^5$		$2{,}1 \times 10^4$	$3{,}4 \times 10^3$	$7{,}0 \times 10^3$	$8{,}1 \times 10^2$
	346	**374**	**-**	**506**	**-**	**747**
4	$9{,}4 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^5$	-	$3{,}2 \times 10^4$	-	$8{,}2 \times 10^4$

A determinação dos coeficientes de absorção molar foi feita com uma boa correlação em THF, indicando que na gama de concentrações utilizadas não se observam desvios à lei de Beer-Lambert e, consequentemente, não ocorrem processos de agregação.[15] Através da análise da tabela 3.1, observa-se que os valores dos coeficientes de absorção molar são da mesma ordem de grandeza do que os descritos na literatura para a 5,10,15,20-tetra(pentafluorfenil)porfirina, percursor base destas porfirinas.[16] No entanto, por comparação dos valores determinados para a porfirina PFTetraPEG em THF e em PBS, observa-se que ocorre uma diminuição do coeficiente de absorção molar para a porfirina PFTetraPEG em PBS. Esta diminuição pode ser atribuída a processos de agregação, verificando-se um pequeno desvio na lei de Beer-Lambert em PBS (figura 3.4 A). [17] Essa agregação pode ser também denotada pelas alterações nos espectros de absorção UV-Visível da porfirina, verificando-se um pequeno alargamento da banda Soret nos espectros da porfirina PFTetraPEG em PBS relativamente à porfirina PFTetraPEG em THF (figura 3.4 B). [3,17]

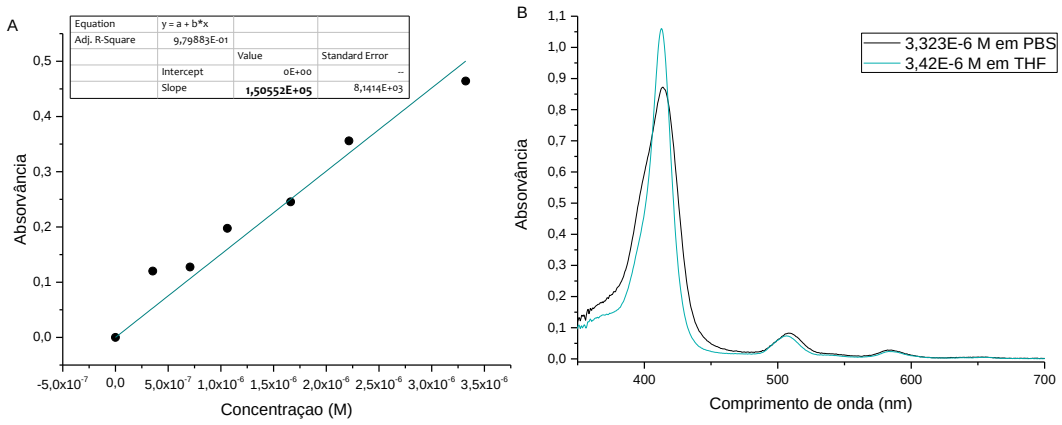


Figura 3.4. A: Ajuste linear da absorvância em função da concentração para a banda Soret (λ=413 nm) da porfirina PFTetraPEG em PBS **B:** espectro de absorção UV-visível da porfirina PFTetraPEG em THF e em PBS

3.2. Espectroscopia de fluorescência

Uma molécula no estado fundamental S_0 pode absorver radiação e transitar para estados eletrónicos de maior energia S_n. No entanto, estes estados são instáveis para a molécula e esta facilmente perde o excesso de energia, decaindo para o estado fundamental. Esse decaimento pode ocorrer através de fenómenos radiativos ou não. A molécula pode transitar do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 libertando energia sob a forma de luz – fluorescência – ou pode sofrer cruzamento intersistema e passar para o estado tripleto. Além disso, a transição pode envolver colisões com moléculas vizinhas.[13,18,19]

No caso específico das porfirinas aplica-se a regra de *Kasha*, que considera que a emissão de fotões ocorre apenas a partir de estados vibracionais mais baixos do primeiro estado eletrónico excitado (S_1).[20] Assim, os espectros de fluorescência apresentam apenas bandas de emissão do tipo Q e não do tipo B, por não existir emissão a partir de estados eletrónicos superiores ao estado S_1. Estes espectros apresentam uma banda de maior energia Q (0,0), resultante da transição entre o nível vibracional mais baixo do estado excitado c_1 e o nível vibracional mais baixo do estado fundamental b_1. Para além dessa banda, podem ainda surgir bandas adicionais que resultam de transições para níveis vibracionais superiores ao do estado fundamental – bandas Q (0,n), onde n representa o estado vibracional do estado fundamental para o qual se dá a transição (n= 0, 1, 2…).[21] No caso das bacterioclorinas estas transições não são significativas.[11] Na figura 3.5 surge representado os espectros de emissão

de fluorescência dos compostos fluorados funcionalizados, assim como a atribuição das bandas de emissão.

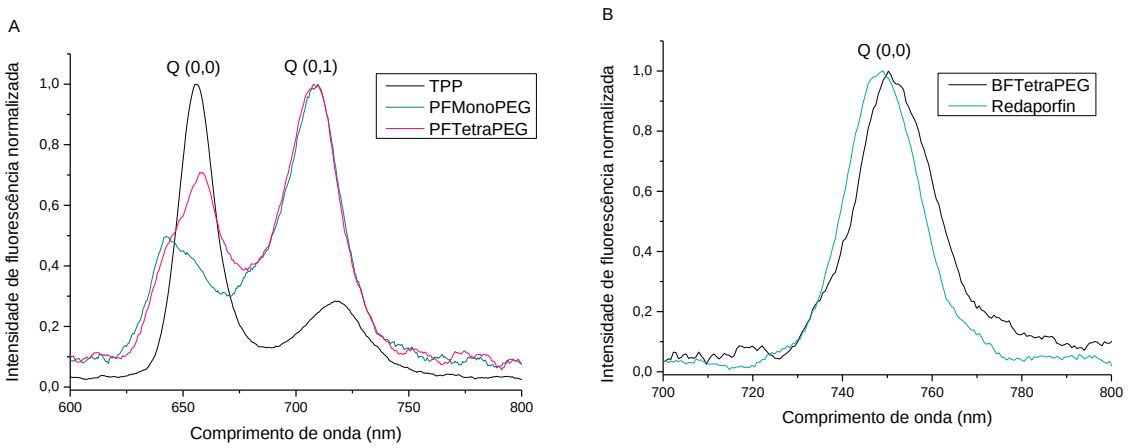


Figura 3.5. Espectros de emissão de fluorescência normalizados **A:** das porfirinas PFMonoPEG e PFTetraPEG em THF e da referência TPP em tolueno **B:** da bacterioclorina BFTetraPEG em THF e da sua referência *Redaporfin* em etanol

Os compostos sintetizados não são exceção, apresentando por isso, no caso das porfirinas PFTetraPEG e PFMonoPEG (figura 3.5 A), duas bandas no espectro de emissão de fluorescência: uma banda em comprimentos de onda menores correspondente à transição Q (0,0) e uma banda adjacente correspondente à transição Q (0,1). No caso da bacterioclorina BFTetraPEG, verifica-se a existência apenas de uma banda Q (0,0) de elevada intensidade a 749 nm. Os espectros de fluorescência das porfirinas são semelhantes, no entanto, verifica-se que a banda correspondente à transição Q (0,0) é inferior em intensidade à banda Q (0,1), contrariamente ao que ocorre com a referência – TPP. A diferença de intensidade relativa das bandas pode ser explicada pela presença de átomos de halogénio na estrutura química dos compostos que podem introduzir diferenças de geometria dos estados excitados e fundamental.[12]

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados através da metodologia proposta por *Parker et al.*[22], que compara os espectros de emissão de fluorescência dos compostos em estudo com os espectros de fluorescência de uma referência. Para as porfirinas utilizou-se como referência 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) em tolueno (ϕ_F = 0,10 ± 0,01) [23] e no caso da bacterioclorina utilizou-se como referência a 5,10,15,20-tetra-(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina (*Redaporfin*) em etanol (ϕ_F = 0,138 ± 0,011).[24]

Prepararam-se soluções com uma absorvância de aproximadamente 0,1 no comprimento de excitação de 415 nm para porfirinas PFTetraPEG e PFMonoPEG e de 749 nm para a bacterioclorina BFTetraPEG. Na tabela 3.2 apresenta-se o comprimento de onda máximo de cada uma das bandas de emissão de fluorescência e o rendimento quântico de fluorescência dos compostos sintetizados.

Tabela 3.2. Comprimento de onda máximo das bandas do espectro de fluorescência ($\lambda_{máx.}$) e rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) para os compostos biocompatíveis em THF: 1 – porfirina PFTetraPEG; 2 – porfirina PFMonoPEG; 3 – bacterioclorina BFTetraPEG

	Fluorescência $\lambda_{máx}$ (nm)		
	Q_x (0,0)	**Q_x (0,1)**	**ϕ_F**
TPP	653	717	0,10[23]
1	660	711	0,061
2	642	709	0,052
3	749	-	0,097

Através da análise dos valores apresentados na tabela 3.2 observa-se que os rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos sintetizados são inferiores aos apresentados para a TPP.[23] A supressão da fluorescência, que se observa através da diminuição dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos sintetizados em relação à TPP, pode estar diretamente relacionada com a presença de átomos pesados, nomeadamente de halogénios - efeito do átomo pesado interno. Estes elementos químicos podem otimizar os processos de cruzamento intersistema e, consequentemente, levar a uma maior conversão de estados excitados singleto para estados excitados tripleto resultando numa diminuição da fluorescência. [25,26,27,28] Estes valores revelam-se favoráveis para a potencial aplicação dos compostos fluorados funcionalizados em terapia fotodinâmica. No caso da bacterioclorina verifica-se também uma diminuição do rendimento quântico de fluorescência em relação à *Redaporfin.* A bacterioclorina BFTetraPEG apresenta na sua estrutura mais dois flúores do que a *Redaporfin* esse facto pode justificar a diminuição do rendimento quântico de fluorescência.

3.3. Determinação do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto

A presença do oxigénio molecular pode estimular a ocorrência de reações fotodinâmicas de dois tipos I e II.[29] A reação do tipo I envolve a interação do estado excitado tripleto com substratos celulares e formação de radicais livres. Esta reação ocorre por processos de transferência de eletrões e/ou iões H^+, de forma a originar espécies radicalares que, ao reagirem com o oxigénio ou outros aceitadores de eletrões, produzem espécies reativas de oxigénio (ROS), como aniões superóxido ou radicais. A reação do tipo II envolve a transferência direta de energia entre a molécula no estado excitado tripleto e o oxigénio molecular, no seu estado fundamental, levando à produção de oxigénio singleto. A produção dessa espécie altamente reativa pode provocar danos ou morte celular, podendo ser útil ao nível da terapia fotodinâmica.[30,31,32,33]

A técnica utilizada para a determinação do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto consiste na excitação das moléculas por intermédio de um laser e na utilização de um detetor sensível à radiação na zona do infravermelho próximo, nomeadamente a 1270 nm, estudando assim a intensidade de fosforescência do oxigénio singleto. O arranjo experimental permite obter decaimentos com uma resolução temporal de cerca de 20 ns. Através desses decaimentos e por um ajuste exponencial retira-se o valor da intensidade de fosforescência do oxigénio singleto logo após o pulso laser e, de seguida, representa-se em função da energia do laser. A gama de intensidade de luz laser utilizada permitiu obter relações lineares intersectadas no zero com boa correlação linear. A determinação dos rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto (ϕ_Δ) foi efetuada experimentalmente comparando-se o declive da recta obtida para a referência - a fenalona em acetonitrilo com um ϕ_Δ de 1,00 ± 0,03[34] com a recta obtida para cada um dos compostos em estudo.

Na figura 3.6 apresenta-se, a título de exemplo, o gráfico cuja recta foi utilizada nos cálculos para obtenção do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto da porfirina PFTetraPEG em THF.

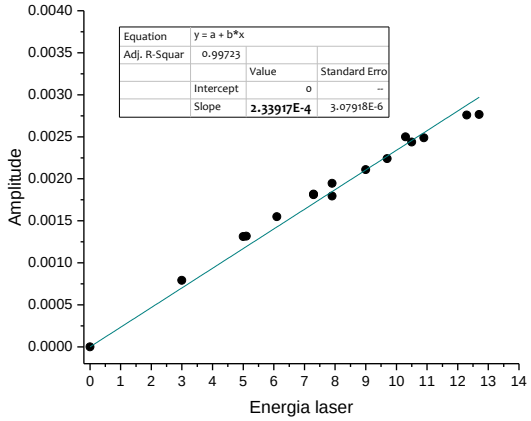


Figura 3.6. Ajuste linear do valor de pré-exponencial em função da energia do laser para a porfirina PFTetraPEG em THF

Na figura 3.7, surge, a título de exemplo, uma representação gráfica de um ajuste exponencial da intensidade de fosforescência em função do tempo para a porfirina PFTetraPEG em THF.

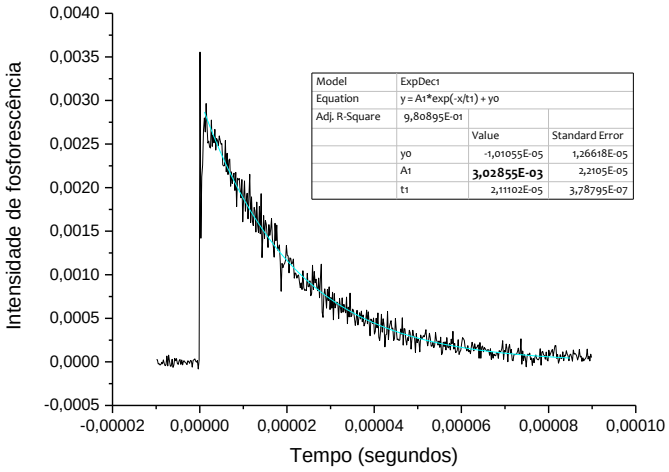


Figura 3.7. Emissão de fosforescência do oxigénio singleto para uma dada energia de laser para a porfirina PFTetraPEG em THF

O tempo de vida de oxigénio singleto em THF obtido nas nossas medições reporta a um valor de τ_Δ 21 µs que se encontra em concordância com os valores obtidos por outros autores (τ_Δ = 23±2,6 µs). [34,35]

Na tabela 3.3 apresenta-se os valores dos rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto adquiridos em THF para as porfirinas e bacterioclorina.

Tabela 3.3. Valores dos rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto dos compostos em estudo: 1 – Porfirina PFTetraPEG em THF; 2 – Porfirina PFMonoPEG em THF; 3 – Bacterioclorina BFTetraPEG em THF

	Oxigénio singleto
	ϕ_Δ
1	0,87
2	0,97
3	0,45

Através da análise da tabela 3.3, verifica-se que os compostos fluorados funcionalizados apresentam valores de rendimento quântico de formação de oxigénio singleto bastante elevados, podendo ser promissor a sua utilização como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica.

3.4. Fotoestabilidade

Um dos fatores limitantes do uso de bacterioclorinas naturais ou sintéticas na fotomedicina está relacionado com a sua sensibilidade à fotodegradação. Alguns autores[36,37,38,39,40] referem que este problema pode ser ultrapassado através da introdução de grupos atractores de eletrões nas posições *orto* de tetrafenilbacterioclorinas.

De forma a avaliar a fotoestabilidade da bacterioclorina BFTetraPEG foram feitos estudos em diferentes solventes, DMSO, THF e PBS. Na figura 3.8 A,B e C apresentam-se os espectros de absorção UV-visível em diferentes intervalos de tempo depois de as soluções serem irradiadas com um laser de potência 0,5 w a 749 nm.

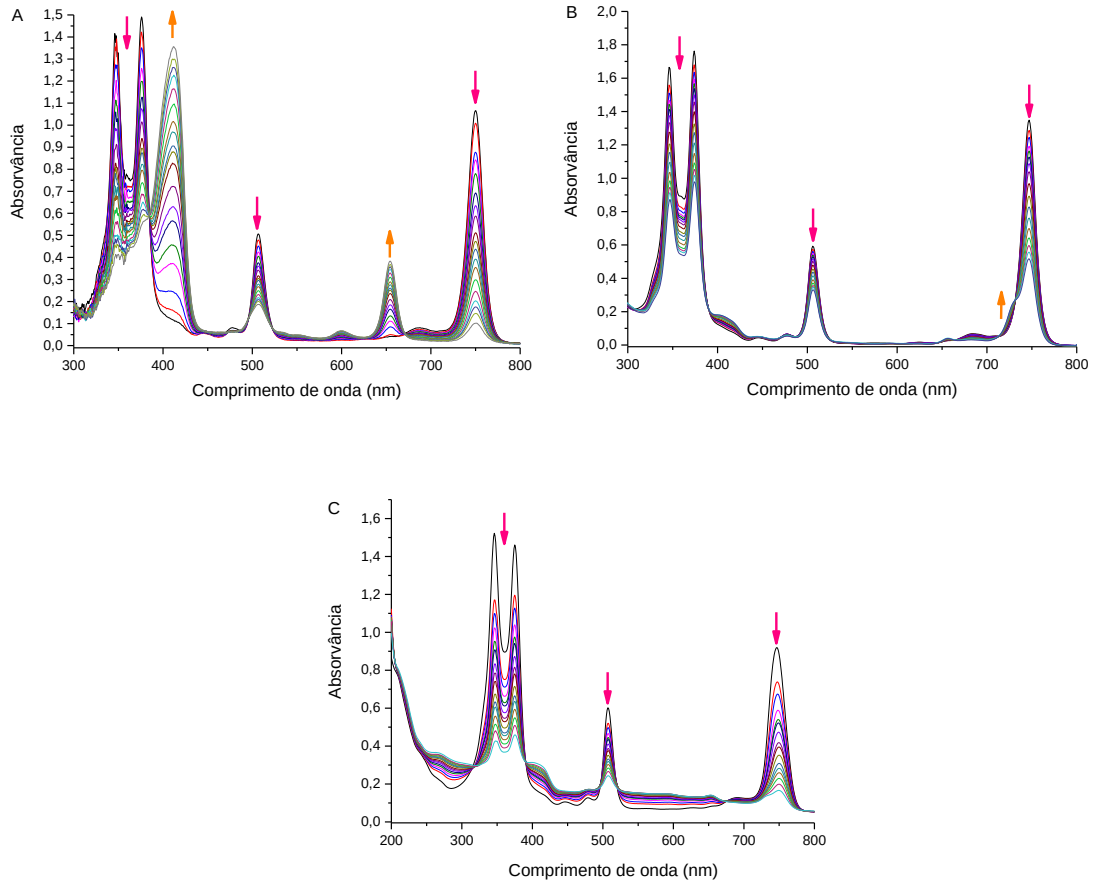


Figura 3.8. Espectro de absorção UV-visível bacterioclorina BFTetraPEG **A:** em DMSO, $t_{TOTAL\ FOTO.}$= 30 min **B:** em THF, $t_{TOTAL\ FOTO.}$= 370 min **C:** em PBS, $t_{TOTAL\ FOTO.}$= 122 min

Tal como se observa através dos espetros de absorção UV-visível, representados na figura 3.8, a fotodegradação varia consoante o tipo de solvente utilizado. O espectro de absorção UV-visível após irradiação de 30 minutos da bacterioclorina em DMSO assemelha-se ao espectro característico de uma clorina, indicando que o produto da fotodegradação num solvente aprótico resulta apenas da oxidação da bacterioclorina a clorina. As constantes cinéticas dos ajustes exponenciais da absorção em função do tempo nos comprimentos de onda de 412 nm e a 747 nm – máximos das bandas correspondentes à clorina e ao desaparecimento da bacterioclorina - são iguais, facto que confirma a formação de um único produto (figura 3.9). As alterações no espectro UV-visível em THF sugerem que o produto de degradação é um isómero de bacterioclorina inicial, facto confirmado pela presença de um ponto isosbéstico a 750 nm. Além disso, na figura 3.10 apresenta-se os espectros de absorção UV-visível antes e após exposição à radiação do laser, que podem indicar também a formação desse novo produto de degradação, uma vez que se observa alteração do comprimento de

onda máximo da banda de 747 nm para 730 nm. Por fim, no espectro UV-visível em PBS observa-se o desaparecimento dos sinais correspondentes à bacterioclorina.

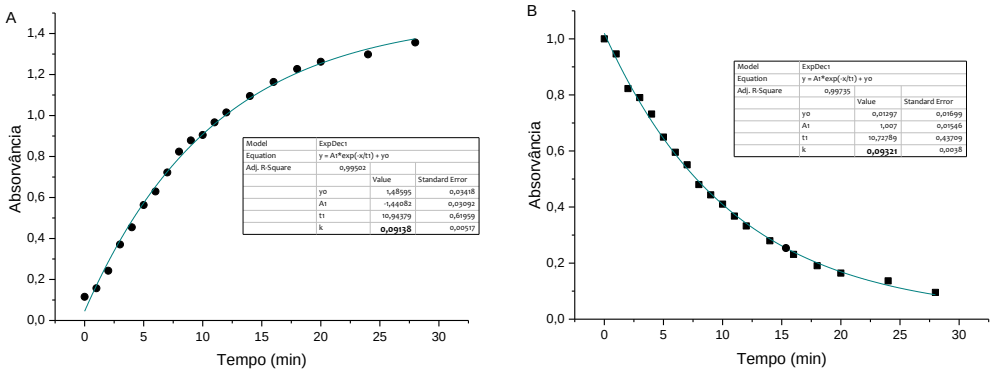


Figura 3.9. Ajustes exponenciais das absorvâncias em função do tempo de irradiação **A:** 412 nm **B:** 747 nm

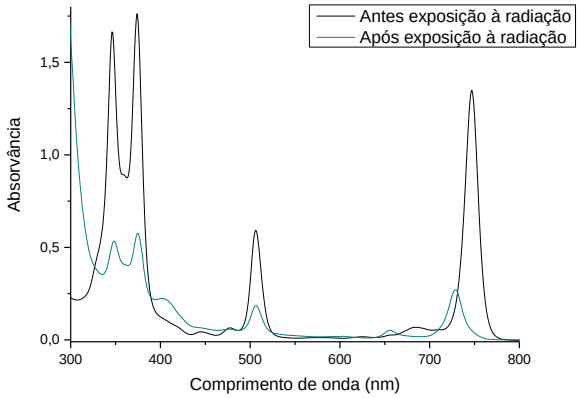


Figura 3.10. Espectros de absorção UV-visível da bacterioclorina BFTetraPEG em THF antes e após a exposição à radiação laser

Os diferentes produtos de degradação podem surgir pela formação de diferentes espécies reativas de oxigénio. De acordo com *Arnaut et al.*[41] a degradação do fotossensibilizador pode ser acelerada na presença de soluções mais acídicas, uma vez que esses meios podem favorecer a formação de peróxido de hidrogénio. Referem também que os radicais superóxido são produzidos por bacterioclorinas halogenadas e que, por sua vez, são capazes de formar radicais hidroxilo em soluções aquosas. Assim, tratando-se a bacterioclorina BFTetraPEG de uma bacterioclorina halogenada, em PBS pode ocorrer a formação de radicais hidroxilo que vão ser capazes de atacar a posição *meso* levando à

abertura do anel aromático e, consequentemente, degradar a bacterioclorina. [37,41] No caso do DMSO e comparativamente com outros solventes, o tempo de vida dos aniões superóxido é maior, uma vez que se trata de um solvente aprótico. Além disso, este solvente é capaz de reagir com os radicais hidroxilo e diminuir o seu tempo de vida.[42] Assim, o efeito dos radicais hidroxilos é reduzido contrariamente ao que acontece em PBS e a oxidação a clorina pode ocorrer devido ao mecanismo do tipo II que envolve a formação de oxigénio singleto. Em THF as alterações no espectro UV-visível sugerem que um dos produtos de degradação se trata de um isómero da bacterioclorina inicial. *Ogunsipe et al.*[43,44] referem que o THF pode ser capaz de estabilizar o anel aromático dos macrociclos tetrapirrólicos, sendo mais eficiente contra o ataque oxidativo gerado pelas espécies reativas de oxigénio. *Giri et al*.[45] referem ainda que o tetrahidrofurano é capaz de reagir com radicais hidroxilo, diminuindo o seu tempo de vida. O efeito dos radicais vai ser reduzido, o que pode proteger a bacterioclorina contra a degradação por parte dessas espécies.

A medida quantitativa para avaliar a fotoestabilidade dos fotossensibilizadores é dada pelo rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{pb}). Tal como se encontra descrito na seção experimental (capítulo 5), para o cálculo deste rendimento é necessário proceder ao ajuste das absorvâncias em função dos tempos de irradiação, de forma a obter as constantes cinéticas. A título de exemplo na figura 3.11 representa-se a deconvolução de bandas correspondentes ao ponto isósbéstico em THF, bem como o ajuste exponencial das absorvâncias em função do tempo de irradiação. Os rendimentos quânticos de fotodegradação são de 1,29 x 10^{-3} em DMSO, de 6,04 x 10^{-4} em PBS e de 4,75 x 10^{-5} em THF. O menor rendimento quântico de fotodegradação ocorre em THF, o que pode revelar uma maior eficiência deste solvente na estabilização da bacterioclorina.

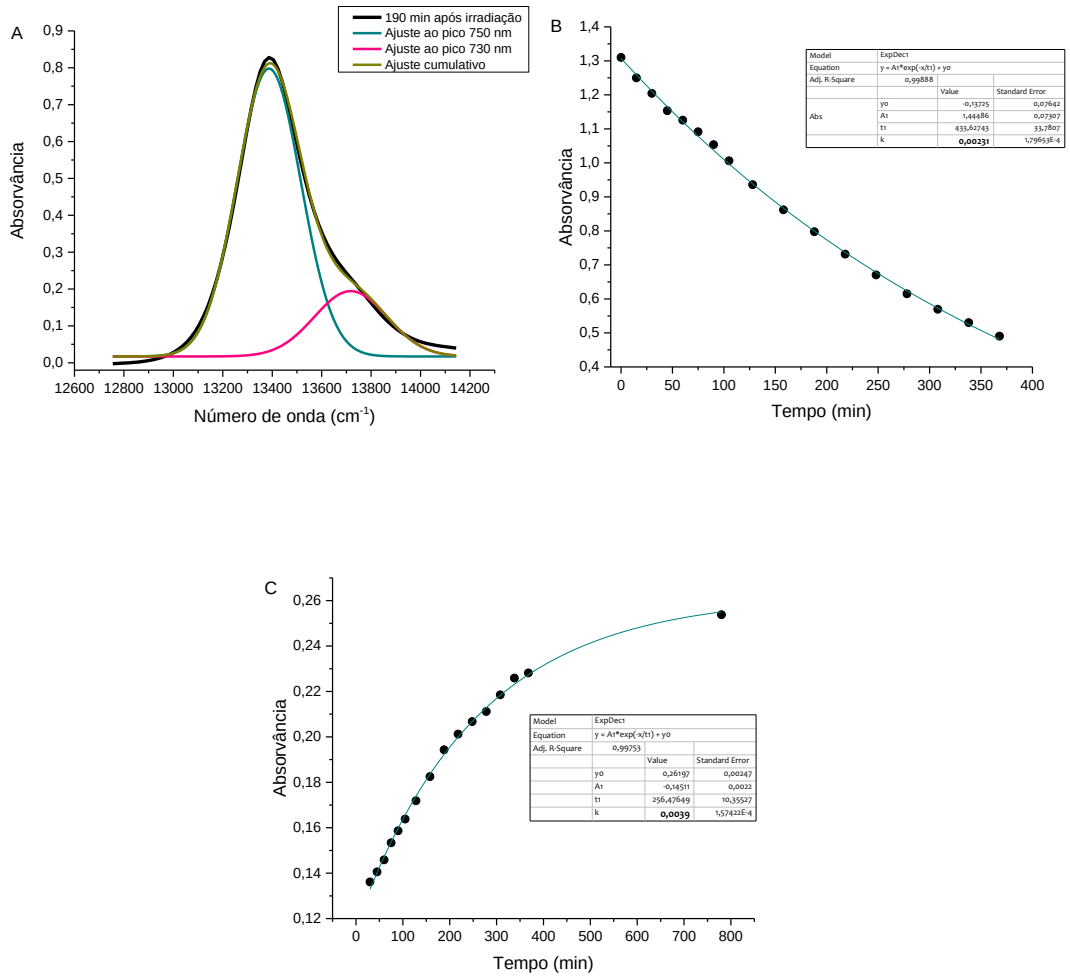


Figura 3.11. A: Espectro de absorção UV-visível da deconvolução das bandas no ponto isosbéstico a 750 nm **B:** Ajuste exponencial das absorvâncias em função dos tempos de irradiação da bacterioclorina BFTetraPEG em THF a 750 nm **C:** Ajuste exponencial das absorvâncias em função dos tempos de irradiação da bacterioclorina BFTetraPEG em THF a 730 nm

Os fotossensibilizadores desempenham um papel fundamental no sucesso da terapia fotodinâmica. Dada a importância destas moléculas, tal como descrito anteriormente, alguns autores[46,47,48,49] enumeram as características que os tornam ideais para esta aplicação. Os fotossensibilizadores devem possuir características fotofísicas apropriadas e possuir propriedades anfifílicas necessárias para terem solubilidade em água, mas também serem suficientemente lipofílicos para permearem as membranas celulares. Para além disso, não devem apresentar toxicidade no escuro, devem acumular-se preferencialmente no tecido-alvo e devem ser excretadas e eliminadas facilmente do organismo após tratamento. Tendo

em conta todos estes requisitos, percebe-se que a nível fotofísico, sobretudo no que diz respeito a elevados coeficientes de absorção molar na região do infravermelho próximo (750 nm), baixos rendimentos quânticos de fluorescência e elevados rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto, a bacterioclorina BFTetraPEG apresenta as características apropriadas para a sua utilização como fotossensibilizador em PDT. No entanto, pretendeu-se ainda neste trabalho esclarecer se o mesmo acontece *in vitro*, realizando para isso estudos de internalização celular, citotoxicidade e fototoxicidade.

3.5. Estudos *in vitro*

Internalização celular

A internalização dos fotossensibilizadores por células alvo é crucial para aumentar a sua eficácia como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica.[50,51] Para ocorrer acumulação nas células, os fotossensibilizadores têm que possuir algumas características estruturais específicas, nomeadamente no que diz respeito ao seu grau de lipofilicidade ou hidrofilicidade, estando bem estabelecido que moléculas anfifílicas têm uma maior capacidade de permeação em membranas biológicas.[50,52] Deste modo, a internalização celular é uma forma de avaliar a capacidade dos compostos atravessarem a membrana celular e, consequentemente, quantificar a concentração do composto no interior das células.

Assim, com o propósito de conhecer a concentração da bacterioclorina BFTetraPEG que é internalizada pelas células, realizaram-se estudos celulares, utilizando a linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão (A549). Para tal, as culturas celulares foram incubadas com uma concentração conhecida de fotossensibilizador (2,5 μM e 5 μM) e a sua concentração avaliada para tempos pré-definidos. Para cada um desses tempos pré-definidos, realizou-se a lavagem dos poços com PBS, de forma a remover todo o fotossensibilizador não internalizado, e colocou-se meio de cultura novo. De seguida, através da intensidade de fluorescência de cada um dos poços incubados e dos brancos foi possível determinar a concentração de composto internalizado, tendo sido para tal realizada uma curva de calibração. Na figura 3.12, apresenta-se uma representação gráfica da internalização do composto em cada tempo pré-definido.

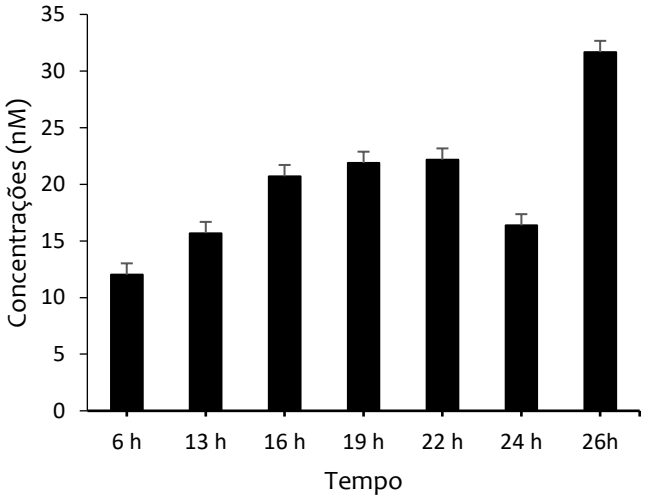


Figura 3.12. Internalização da bacterioclorina BFTetraPEG (5 μM) ao longo do tempo pela linha celular humana de adenocarcinoma

Tal como descrito anteriormente, o rendimento quântico de fluorescência da bacterioclorina BFTetraPEG é baixo (0,0967). Além disso, a bacterioclorina apresenta elevada solubilidade em água o que pode levar ao seu efluxo celular, diminuindo a concentração no meio intracelular. A combinação destes dois factos pode afetar a quantificação do composto internalizado, uma vez que a concentração depende da deteção e medição da intensidade de fluorescência do fotossensibilizador. Assim, para uma melhor interpretação dos resultados apresentados na figura 3.12, foi realizada uma pesquisa na literatura para estudos de internalização celular de compostos que apresentassem características físico-químicas semelhantes ao fotossensibilizador em estudo, sobretudo no que diz respeito ao peso molecular e à sua solubilidade. Tendo em conta que os tempos de internalização máxima para estes compostos se encontravam dentro das 18 h e das 24h, selecionou-se a incubação de 24 horas para efetuar os estudos subsequentes de citotoxicidade e fototoxicidade.[53]

Para garantir que para o tempo pré-definido o fotossensibilizador estava, de facto, presente nas células, obtiveram-se imagens de microscopia de fluorescência que confirmassem a hipótese formada (figura 3.13). As células foram incubadas durante 24 horas com uma concentração conhecida de fotossensibilizador e, após esse período, procedeu-se à lavagem dos poços com PBS e colocou-se, de seguida, PBS novo em cada poço. Nessas imagens observa-se emissão de fluorescência proveniente do composto, o que permite comprovar a internalização deste após 24h de incubação.

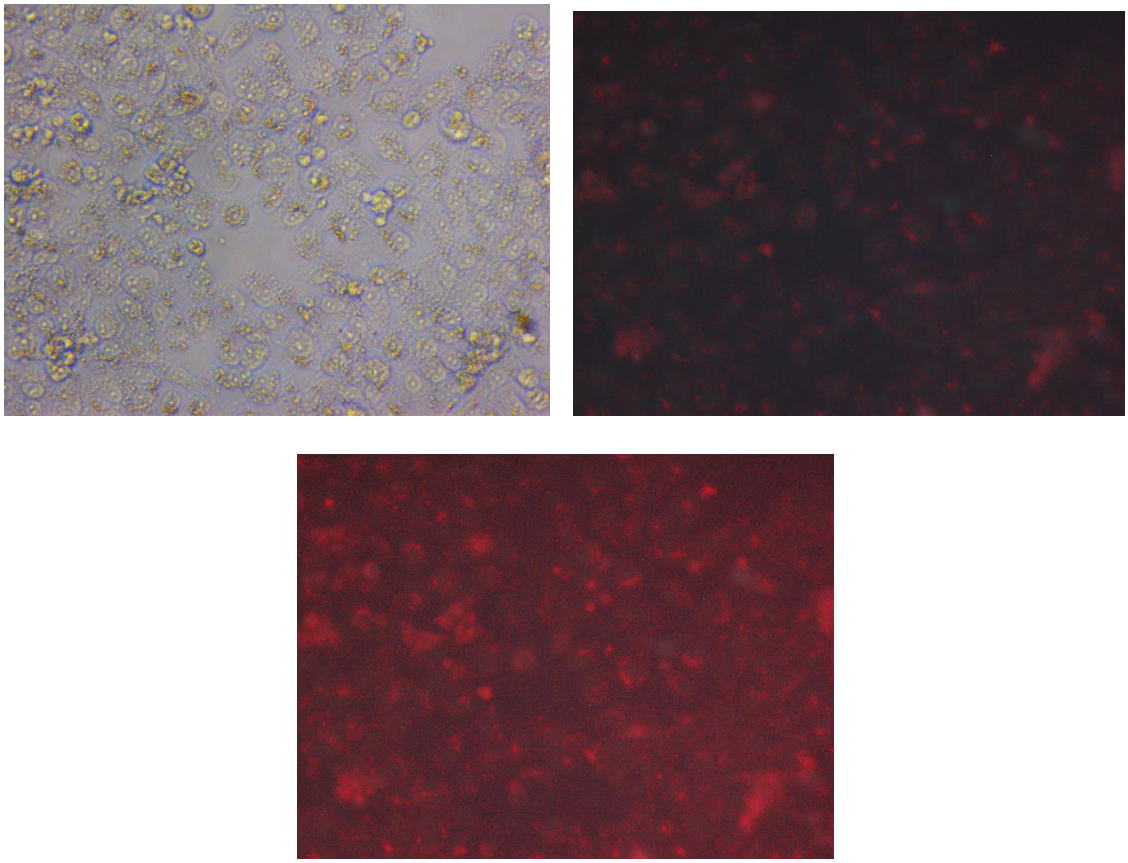


Figura 3.13. Imagens de microscopia de fluorescência representativas de internalização do fotossensibilizador bacterioclorina BFTetraPEG (508 nm excitação e 760 nm emissão)

Após a confirmação da internalização do fotossensibilizador, com o objetivo de efetuar estudos de cito- e fototoxicidade, os estudos iniciaram-se com a otimização da densidade de plaqueamento celular. Para placas de 96 poços foram testadas densidades entre 6000 e 9000 células por poço (200 µL de meio), elegendo-se a densidade de 6000 células por poço para realizar os estudos referidos, por apresentarem uma melhor confluência em cada poço.

Citotoxicidade

Para avaliar a toxicidade no escuro, as células A549 foram incubadas com diferentes concentrações da bacterioclorina BFTetraPEG. Após várias tentativas de otimização de concentrações do composto encontrou-se a gama de concentrações ideais [10 µM - 50 µM]. Para além das células incubadas com o fotossensibilizador, células controlo, sem adição de

composto, são incubadas nas mesmas condições. Após 24 h de incubação, aspirou-se o meio de cultura, lavaram-se as células com PBS e adicionou-se novamente meio de cultura, procedendo-se, de seguida, à avaliação da viabilidade celular recorrendo ao método da resazurina. Neste método as células metabolicamente ativas são capazes de converter a resazurina (cor azul) em resofurina (cor rosa).[54,55,56] De seguida, com recurso ao leitor de microplacas mediu-se a fluorescência (560 nm excitação e 590 nm emissão) e os resultados experimentais foram ajustados a um modelo sigmoide de dose-resposta, tal como representado na figura 3.14.

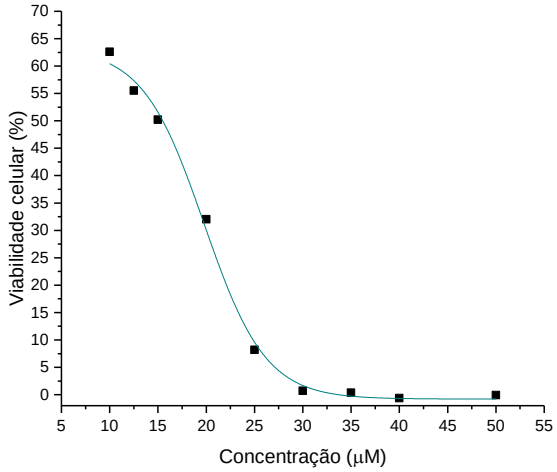


Figura 3.14. Curva de dose-resposta para a linha celular humana de adenocarcinoma (A549) após 24 horas de incubação com o fotossensibilizador

A partir do ajuste efetuado foi possível calcular a concentração do fotossensibilizador que é capaz de inibir 50 % da atividade celular (IC_{50}). Desta forma, tratando-se apenas de estudos preliminares estima-se que para esta linha celular um IC50 próximo de 15 μM. Na literatura, encontra-se descrito que as bacterioclorinas 5,10,15,20-tetra(2-cloro-5-sulfofenil)bacterioclorina ($TCPBSO_3H$) e 5,10,15,20-tetra(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina (*Redaporfin*) *a*presentam valores de concentrações superiores a 100 μM na linha celular A549 para a citotoxicidade.[57,58] Assim, por comparação destes valores com os valores obtidos para a bacterioclorina BFTetraPEG percebe-se que este composto apresenta maior toxicidade no escuro do que alguns dos outros referidos o que para aplicação em PDT pode ser um problema a ter em conta.

Fototoxicidade

Para além dos estudos de citotoxicidade realizaram-se também estudos de fototoxicidade, de forma a comprovar que na presença de irradiação o fotossensibilizador leva à produção de espécies reativas de oxigénio que contribuem para a morte celular e, consequentemente, para a destruição das células. Em placas de 96 poços, a bacterioclorina BFTetraPEG foi adicionada em concentrações que variam entre os 0,4 μM e os 1,2 μM, deixando-se poços controlo triplicados sem adição de fotossensibilizador. As culturas celulares foram incubadas durante 24 horas com as concentrações de fotossensibilizador pretendidas. Após este período de tempo, efetuou-se uma lavagem com PBS, que garantiu que o fotossensibilizador não internalizado pelas células fosse removido, e colocou-se meio de cultura novo. As culturas foram irradiadas com uma dose de luz de 1 J/cm^2. Após 24 horas, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular recorrendo ao método da resazurina. De seguida, com recurso ao leitor de microplacas mediu-se a fluorescência. Os resultados experimentais estão representados graficamente na figura 3.15.

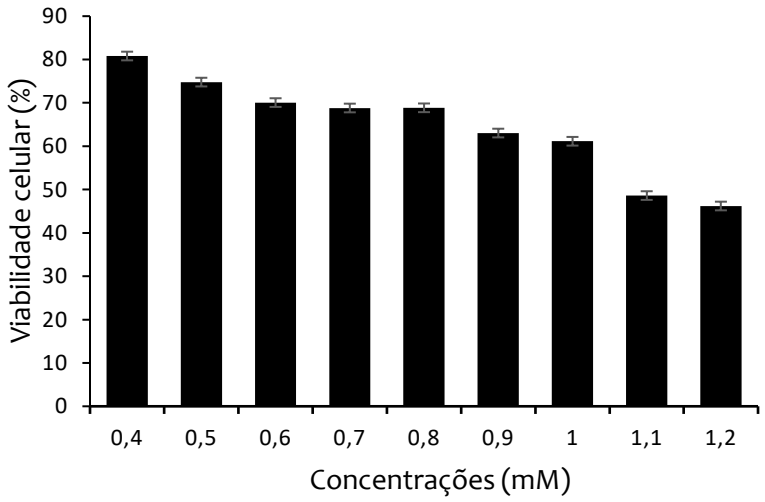


Figura 3.15. Estudos de fototoxicidade da bacterioclorina BFTetraPEG após 24 h de incubação

A partir da análise dos dados, tendo em conta que se trata de resultados preliminares, considera-se que o valor de DL50 - dose necessária para matar 50 % das células quando submetidas a uma dada dose de luz - ronda a gama de concentrações entre 1 – 1,2 μM. Está descrito que as bacterioclorinas TCPBSO$_3$H e *Redaporfin* têm um DL50 nas células A549 de 5 μM para uma dose de luz de 0,17 J/cm^2 e de 0,054 μM para uma dose de luz 6 J/cm^2. Para a

mesma dose de luz (1 J/cm^2) está descrita uma concentração de 0,88 μM para as células CT26 relativamente à Redaporfin.[57,58] Dado que as doses de luz e as concentrações de fotossensibilizar variam relativamente às condições usadas para o estudo de fototoxicidade deste fotossensibilizador, recorreu-se ao fator ROS como fator de comparação. Este fator permite relacionar a dose de luz (J/cm^2) com a concentração de fotossensibilizador (μM), tal como se representa na equação II.

$$\text{(II)}\ \ Fator\ ROS = Dose\ luz\ (J/cm^2) x\ [fotossensibilizador](\mu M)$$

Para a bacterioclorina TCPBSO$_3$H o fator ROS é de 0,85, para a *Redaporfin* é de 0,32 e para a bacterioclorina BFTetraPEG é de 1,2. Estes valores indicam que a bacterioclorina BFTetraPEG necessita de uma maior concentração de fotossensibilizador para ser fototóxica comparativamente com os outros fotossensibilizadores. Estes resultados podem ser explicados pela hidrofilicidade do composto, isto é, sendo solúvel em água pode permanecer no citoplasma das células e não se dirigir para organelos onde a ação de espécies reativas de oxigénio geradas é mais eficiente no dano celular que provocam, como é o caso das mitocôndrias ou do retículo endoplasmático, não sendo por isso tão eficiente na terapia fotodinâmica deste tipo de células.

Através destes resultados preliminares pode concluir-se que este fotossensibilizador apresenta alguma toxicidade na ausência de luz e apesar de ser fototóxico necessita de concentrações mais elevadas relativamente a outros fotossensibilizadores para ter um efeito fotodinâmico adequado.

Referências

[1] Vicente M.G., *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2001**, 1, 175 – 194.

[2] Rio Y., Rodríguez-Morgade M.S., Torres T., *Org. Biomol. Chem*., **2008**, 6, 1877 – 1894.

[3] Giovannetti R., *The use of spectrophotometry UV-vis for the study of porphyrins*, University of Camerino.

[4] Gandhi G., *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Beehive digital concepts Cochin, University Kottayam.

[5] Bhuyann J., *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 15742 - 15756.

[6] Gouterman M., *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138 – 163.

[7] Gouterman M., *J. Chem. Phys*., **1959**, 30, 1139 – 1161.

[8] Uttamlal M., Holmes-Smith S., Chemical Physics Letters, 2008, 454, 223 – 228.

[9] Gouterman M., Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings, Dolphin D.: The porphyrins, 3, *Academic Press*, **1978**.

[10] Vinagreiro C., *Síntese de conjugados de sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com potencial aplicação dual em químio- e fototerapia*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, **2015.**

[11]Taniguchi M., Cramer D.L., Bhise A.D., Kee H.L., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., *New J. Chem*., **2008**, 32, 947 - 958.

[12] Pinto S., *Estudos de transferência de energia entre um polielectrólito e porfirinas hidrofílicas em sistemas selfassembly*, Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, **2008.**

[13] Valuer B., Molecular Fluorescence: Principles and Applications, *Wiley-VCH*, Weiheim, **2001.**

[14] Sauer M., Hofkens J., Enderlein J., Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging, *Wiley-VCH*, Weinheim, **2011**.

[15] Higgins H.C.L., Rector C.W., Platt J.R., *J. Chem. Phys*., **1950**, 18, 1174 – 1181.

[16] Grancho J.C.P., Pereira M.M., Miguel M.G., Rocha Gonsalves A.M., Burrows H.D., *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75, 249 – 256.

[17] Hoebeke M., Damoiseau X., Schuitmaker H.J., Vorst A.V., *Biochimica et Biophysics Acta*, **1999**, 1420, 73 – 85.

[18] Lakowicz J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Springer*, 3° ed., Baltimore –EUA, **2006**.

[19] Josefsen L.B., Boyle R.W., *Hindawi Publishing Corporation*, **2008**, 2008, 1 – 24.

[20] Kasha M., *Disc. Faraday Soc.*, **1950**, 9, 14 - 19.

[21] Quimby D.J., Longo F.R., *J. Am. Chem. Soc*., **1975**, 97, 5111 – 5117.

[22] Parker, C.A., Rees, W.T., *Analyst*, **1960**, 85(1013), 587 – 600.

[23]Pineiro M., Carvalho A.L., Pereira M.M., Gonsalves A.M.A.R., Arnaut L.G., Formosinho S.J., *Chem. Eur J.*, **1998**, 4, 2299 – 2307.

[24] Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 5346 – 5357.

[25] Koziar J., Cowa D.,Accounts of Chemical Research, **1978**, 11, 334 – 341.

[26] Shimizu Y., Azumi T., *J. Phys. Chem*., **1982**, 86, 22-26.

[27] Marin D.M., Payerpaj S., Collier G.S., Ortiz A.L., Singh G., Jones M., Walter M.G., *The Royal Society of Chemistry,* **2012**, *00*, 1 -3.

[28] Bonnett R., Harriman A., Kozyrev A.N., *J. Chem. Soc. Faraday Trans*., **1992**, 88, 763 – 769.

[29] DeRosa M.C., Crutchley R.J., *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233, 351 – 371.

[30] Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2009**, 96, 1 – 8.

[31] Dolmans D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K., *Nature*, **2003**, 3, 380 – 387.

[32] Agostins P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J., *Ca Cancer J. Clin.,* **2011**, 61 (4), 250 – 281.

[33] Juarranz A., Jaeu P., Sanx-Rodriguez F., Cuevas J., Gonzalez S., *Clin. Transl. Oncol*., **2008**, 10, 148 – 154.

[34] Nonell S., Flors C., Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology: The Royal Society of Chemistry, 13, **2016**

[35] Hurst J.R., McDonald J.D., Schuster G.B.**,** *J. Am. Chem. Soc.,* **1982**, Vol. *104***,** 2065 - 2067

[36] Nifiatis F., Athas J.C., Gunaratne d.D., Gurung Y., Monette K.M., Shivokevich P.J., *The Open Spectroscopy Journal*, **2011**, 5, 1 – 12.

[37] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbanska K., Simões S., Stochel G., Cortes L., *Free Radical Biology & Medicine*, **2012**, 52, 1188 – 1200.

[38] Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Abreu A.R., Sá G.F.F., Silva E.F.F, Rocha B., Dabrowski J.M., Formosinho S.J., Simões S., Arnaut L.G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545 – 9551.

[39] Murtinho D., Pineiro M., Pereira M. M., Gonsalves A. M. d. A. R., Arnaut L. G., Miguel M. G., Burrows H. D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.,* **2000**, 2, 2441 - 2447.

[40] Pineiro M., Gonsalves A. M. d'A. R., Pereira M.M., Formosinho S.J., Arnaut L.G., *J. Phys. Chem. A,* **2002**, *106,* 3787 – 3795.

[41] Silva E.F.F., Dabrowski J.M., Monteiro C.J.P., Formosinho S.J., Stochel G., Urbanska K., Simões S., Pereira M.M., Arnaut L.G., *Chem. Eur. J*., **2010**, 16, 9273 – 9286.

[42] Steiner M.G., Babbs C.F., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1990**, 278, 478 – 481.

[43] Bonnett R., Djelal B.D., Hamilton P.A., Martinez G., Wierrani F., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1999**, 53, 136 – 143.

[44] Spikes J.D., *Photochemistry and Photobiology*, **1992**, 55, 797 - 808.

[45] Giri B.R., Khaled F., Szori M., Viskolcz B., Farooq A., *Proceedings of the Combustion Institute*, **2017**, 36, 143 - 150.

[46] Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K., *Chem. Soc. Rev*., **2011**, 40, 340 – 362.

[47] Juarranz A., Jaeu P., Sanx-Rodriguez F., Cuevas J., Gonzalez S., *Clin. Transl. Oncol*., **2008**, 10, 148 – 154.

[48] Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Arnaut L.G., Sá G.F.F., Silva E.F.F., Rocha L.B., Simões S., Formosinho S.J., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 567 – 573.

[49] Sharman W.M., Allen C.M., van Lier J.E., *DDT*, **1999**, 4, 507 – 517.

[50] Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 279 – 293.

[51] Detty M.R., S. L. Gibson, S. J. Wagner, *J. Med. Chem*., **2004**, 47, 3897 –3915.

[52] Allison R.R., *Future Oncol.,* **2014**, 10, 123 – 124.

[53] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Oereira M.M., Urbanska K., Simões S., Stochel G., Cortes L., Free Radical Biology & Medicine, 2012, 52, 1188 – 1200.

[54] Byth H.A., Mchunu B.I., Dubery I.A., Bornman L., *Phytochem. Anal,* **2001**, 12, 340 – 346.

[55] Rampersad S.N., *Sensors,* **2012**, *12*, 12347 - 12360.

[56] Osaka I., Hefty P.S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2013**, 57, 2838 – 2840.

[57] Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Urbanska K., Simões S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.,* **2010**, 5, 1770 – 1780.

[58] Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Yrbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 5346 – 5357.

Capítulo 4

Conclusões

As porfirinas são compostos cujo anel aromático é facilmente modelado, permitindo otimizar o *design* estrutural dos macrociclos tetrapirrólicos, conduzindo a propriedades fotofísicas e fotoquímicas ideais para viabilizar a sua aplicação em biomedicina.

O objetivo central do trabalho que deu origem a esta Dissertação consistiu na síntese de porfirinas conjugadas com polietilenoglicol e também na redução das mesmas para obtenção de bacterioclorinas com absorção na região do infravermelho próximo.

Para a síntese da *meso*-pentafluorfenilporfirina recorreu-se ao método do nitrobenzeno/NaY que permite através da condensação do pirrol com pentafluorbenzaldeído a obtenção do precursor base para a realização de todos os estudos subsequentes. Assim, foi possível obter a TPFPP com rendimentos de 15 %. Dado o facto de esta porfirina constituir um excelente modelo para a obtenção de novos compostos porfirínicos decidiu-se proceder à sua modelação estrutural através da funcionalização dos grupos fenilo nas posições *para* com o objetivo de sintetizar porfirinas funcionalizadas com polietilenoglicol, para melhorar a sua solubilidade em água e torná-los mais biocompatíveis com meios biológicos.

A reação desses compostos porfirínicos fluorados com polietilenoglicol através de substituição nucleofílica aromática revelou ser um método bastante versátil, permitindo a obtenção de duas porfirinas funcionalizadas - PFTetraPEG e PFMonoPEG - com rendimentos superiores a 48 %. Observou-se ainda que apenas a tetrafuncionalização com grupos PEG com peso molecular de 500 g/mol permitiu a aquisição de solubilidade em água. A introdução do PEG, sendo um polímero não tóxico nem imunogénico, permite aumentar a biocompatibilidade, assim como contribuir para o aumento do tempo de circulação dos compostos pegilados no organismo sem comprometer a biodegradação. As técnicas de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{19}F e espectrometria de massa permitiram efetuar uma boa caracterização estrutural dos fotossensibilizadores. As porfirinas PFTetraPEG e PFMonoPEG foram ainda avaliadas quanto às propriedades fotofísicas, concluindo-se que apresentavam baixos rendimentos quânticos de fluorescência e elevados rendimentos quânticos de oxigénio singleto. Os picos bem definidos e intensos nos espectros de RMN de

^{19}F e a síntese com elevados rendimentos destas porfirinas fluoradas funcionalizadas abrem a possibilidade da potencial utilização destes compostos como sondas em ^{19}F MRI no diagnóstico médico.

A complexação da porfirina PFTetraPEG com o ião paramagnético manganésio permitiu a síntese da porfirina PFTetraPEG-Mn(III) com um rendimento elevado. Este novo complexo de manganésio (III) desenvolvido na tese abre perspetivas para futura aplicação como agente de contraste inteligente para detetar modificações no ambiente de oxidação e redução de células com alterações funcionais.

A porfirina PFTetraPEG apresentou reduzida fluorescência e elevada eficiência na transferência de energia para o oxigénio molecular, sendo por isso a porfirina selecionada como material de partida para redução a bacterioclorina e avaliação do seu potencial em PDT através de ensaios *in vitro*. A redução da porfirina a bacterioclorina foi feita através do método sustentável sem solvente, desenvolvido anteriormente no grupo de Catálise & Química Fina. Essa redução foi crucial para que o composto apresentasse as características adequadas à sua aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

Foi também objetivo deste trabalho avaliar o potencial deste fotossensibilizador para terapia fotodinâmica através de estudos *in vitro*. Esses estudos preliminares permitiram concluir que a BFTetraPEG apresentava alguma toxicidade na ausência de luz (15 μM) e fototoxicidade para células tumorais entre 1 e 1,2 μM. Apesar destas limitações, a estrutura química única da bacterioclorina BFTetraPEG resultante da conjugação com grupos polietilenoglicol torna-a solúvel em água, sendo esta crucial para aplicação do composto em meios biológicos. Além disso, a introdução do PEG vai também permitir melhorar outras características, tais como, o tempo de vida ou a estabilidade do fotossensibilizador no organismo. Como perspetivas futuras propõe-se o estudo específico da localização intracelular do fotossensibilizador, que consiste na deteção do composto em organelos celulares, como, por exemplo, a mitocôndria, os retículos endoplasmáticos, o citoplasma e os lisossomas, onde pode ocorrer uma maior acumulação do fotossensibilizador, bem como um estudo de cito e fototoxicidade em gamas de concentrações mais abrangentes e num número de repetições relevantes para análise estatística. Além disso, seria também interessante avaliar qual a influência que número das cadeias PEG tem nos estudos *in vitro,* nomeadamente, ao nível da internalização celular.

Como conclusão final, considera-se que todos os objetivos foram cumpridos no sentido em que se obtiveram novos macrociclos tetrapirrólicos, nomeadamente porfirinas e bacterioclorinas, fluorados e conjugados com polietilenoglicol, foi possível a caraterização fotofísica desses compostos, bem como a realização de estudos *in vitro* da família de

fotossensibilizadores conjugados com PEG. Para além dos objetivos iniciais foi ainda utilizada a bacterioclorina monofuncionalizada BFMonoPEG como material de partida para a preparação de um bioconjugado com um peptídeo que poderá constituir uma área de investigação inovadora para o tratamento mais seletivo das arritmias cardíacas. A caracterização detalhada e estudos *in vitro* e *in vivo* estão a ser desenvolvimento, mas por questões de confidencialidade não são apresentados no trabalho.

Capítulo 5

Experimental

Neste capítulo encontra-se descrita toda a informação relevante acerca dos reagentes e solventes utilizados, bem como das técnicas e instrumentação necessárias ao desenvolvimento do trabalho descrito ao longo desta dissertação. De notar que a numeração e a nomenclatura de todos os compostos, encontra-se de acordo com as recomendações da IUPAC.

5.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes foram adquiridos à Sigma-Aldrich com exceção do PEG500 (Fluorochem). Estes reagentes adquiridos comercialmente foram utilizados diretamente como recebidos, sem purificação. Todos os solventes utilizados na síntese e cromatografia em coluna foram, sempre que necessário, purificados por destilação simples ou secos através de procedimentos *standart* descritos na literatura.[1] O clorofórmio deuterado, utilizado na obtenção dos espectros de RMN, foi neutralizado numa coluna de óxido de alumina antes da sua utilização.

5.2. Técnicas e Instrumentação

I - Cromatografia de camada fina

A cromatografia em camada fina (TLC) é uma técnica analítica utilizada para o controlo reacional, permitindo uma identificação preliminar da evolução da reação química.[1] Esta cromatografia foi realizada em placas revestidas com gel de sílica 60 (Sigma Aldrich) contendo um indicador de fluorescência UV_{254}. O eluente usado para a realização desta cromatografia variou consoante a reação em estudo.

II - Cromatografia de adsorção em coluna

A cromatografia de adsorção em coluna é uma técnica analítica que permite a separação, isolamento e purificação de compostos químicos numa mistura. Assim, alguns dos compostos sintetizados foram purificados com recurso a esta cromatografia, utilizando gel

de sílica 60 (Sigma-Aldrich) ou óxido de alumina (Sigma-Aldrich) como fases estacionárias. O eluente usado variou dependendo da reação em causa.

III - Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica analítica que permite a separação e purificação dos compostos numa mistura através do tamanho molecular dos componentes da mistura. Esta cromatografia foi utilizada para as purificações de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]bacterioclorina e de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-peptídeo)fenil]-15,20-di-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]bacterioclorina, utilizando a resina *Sephadex G-10* (limite de exclusão molecular superior a 700 $g.mol^{-1}$) e água destilada como eluente.

IV - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência *(*HPLC*)* é um tipo de cromatografia líquida que permite a separação e quantificação de compostos que se encontram dissolvidos em solução.[2] Esta cromatografia foi utilizada para controlar o processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular da bacterioclorina BFTetraPEG, utilizando como eluente 70 % acetonitrilo e 30 % água. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram obtidas num *Agilent 1100 series*, equipado com um detetor *Agilent 1100 series* de comprimento de onda variável equipado com uma coluna de fase reversa Luna Omega C18 (octadecilsilano imobilizado em 5 µm de sílica gel) com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

V - Sonicação

A sonicação é um procedimento que recorre à utilização da energia de ondas sonoras, neste caso de ultrassons, para facilitar a dissolução dos compostos. Assim, com o objetivo de facilitar a dissolução dos compostos estudados utilizou-se, sempre que necessário, como sistema de ultrassons o aparelho da marca *Bandelin Sonorex TK52* do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

VI - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^{1}H) e de flúor (^{19}F) foram adquiridos num espectrómetro *Bruker Avance* 400 MHz e 376 MHz do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, usando clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) como solvente.

Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), usando em protão o pico do solvente (7,26 ppm) como referência e em flúor um padrão externo o trifluortolueno (δ -63,72 ppm). As constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz). Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: núcleo (frequência do aparelho, solvente), desvio químico (δ, ppm) [multiplicidade do sinal (s – singleto, d – dupleto, dd – duplo dupleto, t – tripleto, q – quarteto e m - multipleto), constante de acoplamento (J, Hz), intensidade relativa (nH, número de protões), atribuição na estrutura].

VII - Espectrometria de massa

Os espectros de massa ESI-TOF foram adquiridos num espectrómetro Bruker Daltonics flexAnalysis Spectrometer da Unidade de Espectrometria de Massa da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

VIII - Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível

Os espectros de absorção UV-visível foram obtidos nos espectrofotómetros *Shimadzu 2100 e Hitachi U-2010*, usando cuvetes de quartzo e de vidro, da Hellma Analytics com 1 cm de percurso ótico. Os coeficientes de absorção molar foram determinados para uma gama de concentrações entre 10^{-6} e 10^{-7} M em tetrahidrofurano (THF) e numa solução tampão fosfato pH=7,4 (PBS do inglês *Posphate Buffer Saline*). Representou-se graficamente a absorvância para o máximo das bandas consideradas em função da concentração das diferentes soluções, procedendo-se, de seguida, a um ajuste linear. A partir desse ajuste foi possível retirar o valor do declive da reta que corresponde ao coeficiente de absorção molar. Esta relação só é possível dada a Lei de Beer-Lambert $A = \varepsilon(\lambda)lc$ onde A é a absorvância, ε é o coeficiente de absorção molar (em M^{-1} cm^{-1}), c a concentração da solução (em M) e l é o comprimento do percurso ótico (em cm).[3]

IX - Espectroscopia de emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Avantes AvaSpec-ULS-TEC, utilizando cuvetes de quartzo *Hellma Analytics* com percurso ótico de 1 cm.

X - Rendimento quântico de formação de oxigénio singleto

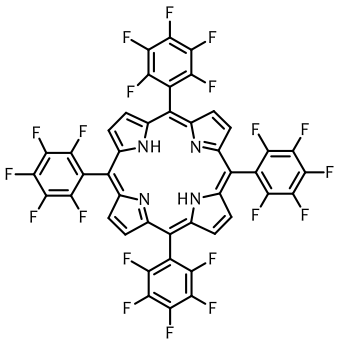
A determinação do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto foi realizada utilizando um espectrómetro da *Applied Photophysics LKS.6.0*, equipado com um

laser de *Nd-YAG Spectra-Physics Quanta Ray GCR-130*, um osciloscópio digital *Tektronix* e um fotomultiplicador *Hamamatsu R5509-42* a 1600 volts e arrefecido com azoto líquido a 193 K, de forma a otimizar a relação sinal-ruído.

5.3. Síntese e caracterização estrutural dos compostos sintetizados no capítulo 2

I - 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP)

Num balão de fundo redondo colocou-se 140 mL de ácido acético, 70 mL de nitrobenzeno e 15 g do zeólito NaY deixando-se em agitação até atingir a temperatura de 80 °C. Adicionou-se 8,4250 g (42,97 mmol) de pentafluorbenzaldeído e aqueceu-se a mistura até aos 120 °C. Após entrar em refluxo adicionou-se, gota a gota, 3 mL de pirrol (43,24 mmol) deixando-se a solução com agitação a 120 °C durante 2 horas. Seguidamente, após arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, filtrou-se o NaY, evaporou-se o nitrobenzeno e o ácido acético, recorrendo a uma destilação a pressão reduzida, e purificou-se o crude obtido através de cromatografia em coluna de gel de sílica iniciando a eluição com hexano, seguindo-se hexano/diclorometano 10:1, 8:1; 4:1 respetivamente e terminando com diclorometano. O rendimento da reação foi de 15 %.



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: 8,93 (s,8H); -2,90 (s,2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: -135,35 a -135,43 (dd; *J*= 12;4 Hz; 8F); -150,05 a -150,16 (t; *J*= 20,8 Hz; 4F); -160,14 a -160,28 (m; 8F).

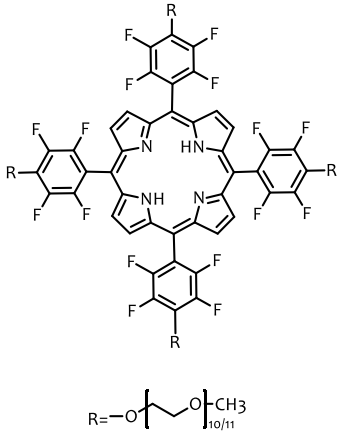
UV-Vis λ_{abs} (ε), nm (CH_2Cl_2)**:** 416 (236,9 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 508 (19,76 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 538 (3,51 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 589 (6,19 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 656 (1,09 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$)**.**

A caracterização desta porfirina está de acordo com o que se encontra descrito na literatura.[4]

II - 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] porfirina (PFTetraPEG)

Num balão de fundo redondo colocou-se 0,250 g (0,0257 mmol) de 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina e adicionou-se 0,0304 g (1,267 mmol) de hidreto de sódio

com 0,64 mL (1,280 mmol) de polietilenoglicol 500 Da dissolvidos em dimetilformamida seco (DMF), deixando-se a solução com agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Após se ter verificado o término da reação por TLC, adicionou-se diclorometano e extraiu-se com água, de forma a remover o DMF e o PEG livre. De seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, filtrou-se e após evaporação obteve-se a porfirina PFTetraPEG com um rendimento de 93,3 %.



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: 8,93 (s; $8H_{\beta}$); 3,65 a 3,60 (m; 176 H_{PEG}); -2,90 (s; $2H_{NH}$).

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: -138,84 a -138,92 (dd; 4,0;22 Hz 8F); -156,95 a -157,03 (dd; 4,0;12,0 Hz; 8F).

MS (ESI-TOF): m/z 1028,3720; 1220,9980; 1287,0377; 1491,1818 $[M]^{2+}$ (distribuição polidispersiva) calculado para $C_{136}H_{198}F_{16}N_4O_{48}$ 2959, 29.

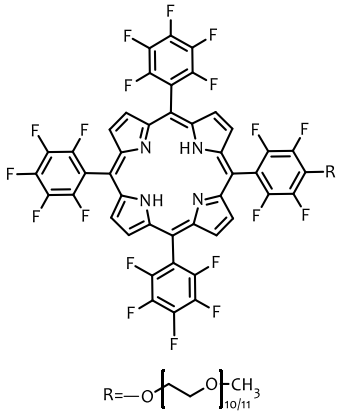
UV-Vis λ_{abs} (ε), nm (THF)**:** 413 (308,971 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 507 (21,5 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 535 (3,74 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 583 (6,989 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 654 (1,677 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$)**.**

UV-Vis λ_{abs} (ε), nm (PBS)**:** 414 (150,552 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 508 (14,418 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 539 (3,042 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 582 (4,660 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 653 (1,086 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$)**.**

III - 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina (PFMonoPEG)

Num balão de fundo redondo colocou-se 0,140 g (0,14366 mmol) de 5,10,15,20-tetra(pentafluorofenil)porfirina dissolvida em 5 mL de dimetilformamida seco (DMF). De seguida, adicionou-se, lentamente, 0,065 g (0,1293 mmol) de polietilenoglicol 500 Da e 0,021 g (0,862 mmol) de hidreto de sódio dissolvidos em 10 mL de DMF, deixando a reagir durante 48 horas à temperatura de 80°C. Após se ter verificado o término da reação por TLC, recorreu-se a uma mistura azeotrópica com tolueno, adicionando-se pequenas quantidades de tolueno e evaporando, de forma a remover o DMF. O crude obtido foi purificado recorrendo-se a uma coluna cromatográfica de óxido de alumina, utilizando inicialmente como eluente diclorometano e, de seguida, diclorometano: 5% metanol, obtendo-se a porfirina 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-

pentafluoro)fenil]porfirina. O eluente foi evaporado e, de seguida, dissolveu-se em diclorometano e extraiu-se com diclorometano: água (5x), de forma a remover o PEG livre. Após a extração, adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, filtrou-se e após evaporação obteve-se a porfirina PFMonoPEG com um rendimento de 48,5 %.



RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: 8,91 (m; 8H); 3,63 a 3,30 (m; 44 H_{PEG}); -2,90 (s; $2H_{NH}$).

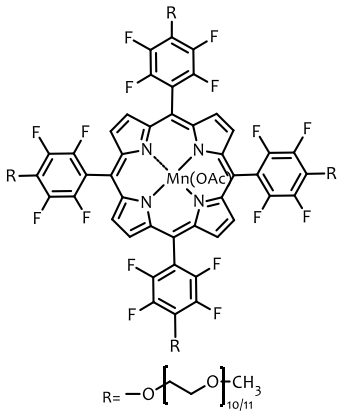
RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$) δ, ppm: -136,46 a -136,53 (dd; 6,0;14,0 Hz; 6F); -140,10 a -140,16 (m; 3F); -151,21 a -152,07 (m; 4F); -161,31 a -161,54 (m; 6F).

MS (ESI-TOF): m/z 1471,3714; 1472,3791 $[M]^+$ calculado para $C_{67}H_{57}F_{19}N_4O_{12}$ 1470,37.

UV-Vis λ_{abs} (ε), nm (THF)**:** 413 (274,564 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 505 (21,177 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 537 (3,353 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 585 (6,991 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$); 658 (0,805 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$)**.**

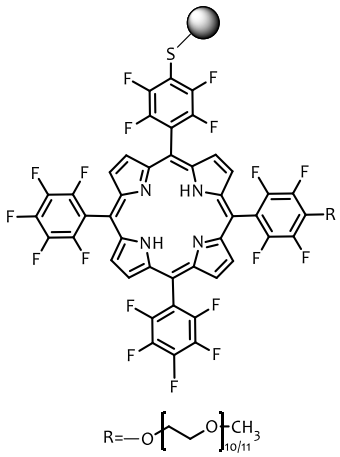
IV - 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil] porfirinato de manganésio (III) (PFTetraPEG-Mn(III))

Num balão de fundo redondo dissolveu-se 0,110 g (1,34 mmol) de acetato de sódio em ácido acético. De seguida, colocou-se 0,270 g (0,093 mmol) de 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]porfirina e 0,031 g (0,126 mmol) de acetato de manganésio (II)–tetra-hidratado, deixando em agitação e refluxo à temperatura de 80 °C durante 2 h. O controlo reacional foi efetuado por espectroscopia UV-visível. Após o desaparecimento das bandas correspondentes à porfirina e o aparecimento das bandas correspondentes ao complexo de manganésio da porfirina, extraiu-se com diclorometano: água, adicionou-se sulfato de sódio anidro e filtrou-se. De seguida, o diclorometano foi evaporado e o produto foi obtido com um rendimento de 78,3 %.


R
F
F
F

VI - 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-peptídeo)fenil]-15,20-di-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil] bacterioclorina (BFMonoPEG-peptídeo)

No fundo de um tubo de Schlenk colocou-se 0,040 g (0,0272 mmol) de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 0,203 g (1,088 mmol) de *p*-toluenosulfonilhidrazina. Colocou-se sob vácuo durante 30 min, de forma a remover todo o oxigénio presente e deixou-se com agitação a 140 °C durante 1 hora. De seguida, colocou-se em solução 0,0091 g (6,169 x 10^{-3} mmol) de 5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-polietilenoglicol)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]bacterioclorina, 0,0085 g (5,55 x 10^{-3} mmol) do peptídeo e 0,004 g (0,0123 mmol) de carbonato de césio dissolvidos em tetrahidrofurano seco (THF), deixando em atmosfera inerte e à temperatura ambiente durante 72 h. Após se ter verificado o término da reação por TLC, o crude obtido foi purificado recorrendo a cromatografia de exclusão molecular com resina Sephadex G10, utilizando água destilada como eluente. O composto final foi obtido através de liofilização.



5.4. Caracterização fotofísica e fotoquímica

I - Rendimentos quânticos de fluorescência

A determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência foi efetuada adquirindo os espectros de emissão de fluorescência segundo procedimentos publicados na literatura.[5] O rendimento quântico de fluorescência é definido como a relação entre o número de fotões emitidos por fluorescência e o número total de fotões absorvidos, sendo definido pela equação que se apresenta de seguida (*II*). A referência usada para o cálculo do rendimento

quântico de fluorescência das porfirinas foi a TPP (5,10,15,20-tetrafenilporfirina) em tolueno ($\varphi_F = 0{,}10 \pm 0{,}01$)[5] e, no caso da bacterioclorina, a referência foi a *Redaporfin* (5,10,15,20-tetra(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina) em etanol ($\varphi_F = 0{,}138$)[6]. Foram preparadas soluções de TPP em tolueno, das porfirinas e da bacterioclorina em THF e da *Redaporfin* em etanol de forma a apresentarem no espectro de absorção uma absorvância entre 0,05 e 0,1 a 415 nm (comprimento de onda de excitação) para as porfirinas e a 749 nm para a bacterioclorina. Comparou-se a integração da área dos espectros de emissão de fluorescência das referências com as áreas dos espectros dos compostos sintetizados, de forma a que através da seguinte equação se determinasse o rendimento quântico de fluorescência.[7]

$$\varphi_F\ (amostra) = \frac{Área\ (amostra)}{Área\ (referência)} * \frac{Abs\ (referência)}{Abs\ (amostra)} * \frac{\eta\ (amostra)}{\eta\ (referência)} *\ \varphi_F\ (referência) (\boldsymbol{II})$$

Nesta fórmula, a área refere-se à integração da intensidade no espectro de emissão, Abs refere-se à absorvância da amostra e da referência no comprimento de onda de excitação e η ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidas.

II - Rendimento quântico de formação de oxigénio singleto

O rendimento quântico de oxigénio singleto (φ_Δ) é definido pela razão entre o número de fotões emitidos pelo oxigénio, resultado da sua fosforescência, e o número total de fotões absorvidos pela amostra, sendo também definido pela equação que se apresenta de seguida (*III*). Foram preparadas soluções dos compostos sintetizados em THF e da fenalona (referência, φ_Δ= 1,00±0,03) [8] em acetonitrilo, de forma a apresentarem no espectro de absorção uma absorvância de 0,2 a 355 nm. Os valores de rendimento quântico de formação de oxigénio singleto foram obtidos comparando a intensidade de fosforescência do oxigénio singleto a 1270 nm de cada um dos compostos sintetizados com a intensidade de fosforescência de uma solução com fenalona. Foram determinados os decaimentos relativos à emissão do oxigénio singleto gerado pela referências e pelos compostos variando-se a intensidade do laser. Representou-se a intensidade de fosforescência em função da energia do laser, procedendo-se, de seguida, a um ajuste linear. A partir desse ajuste foi possível obter o declive da reta necessário ao cálculo do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto através da equação III.

$$\varphi_{\Delta}(amostra) = \frac{declive\ (amostra)}{1-10^{-\text{Abs (amostra)}}} * \frac{1-10^{-\text{Abs (referência)}}}{declive\ (referência)} * \varphi_{\Delta}\ (referência)\ (\boldsymbol{III})$$

Nesta fórmula, o declive resulta de um ajuste linear feito entre os valores de pré-exponencial (A) correspondentes aos valores máximos de intensidade de fosforescência e a energia do laser; Abs refere-se à absorvância das soluções que foram excitadas num comprimento de onda de 355 nm e φ_{Δ}(referência) corresponde ao rendimento quântico de oxigénio singleto da fenalona.

III - Fotoestabilidade

Os estudos de fotodegradação permitem avaliar a fotoestabilidade dos fotossensibilizadores. Estes estudos foram realizados em três solventes diferentes - THF, DMSO e PBS, sendo as cuvetes de quartzo irradiadas com laser Milron Laser rage LDM 750.1000.CWA.L.M a 749 nm. O volume perdido durante a irradiação foi ponderado através da medição da massa da cuvete e sempre que necessário adicionado solvente à amostra antes de cada medição. Os espectros de absorção UV-visível foram registados antes e depois de cada irradiação. O rendimento quântico de fotodegradação foi calculado, usando a equação que se apresenta de seguida (IV), derivada da razão entre a taxa inicial de moléculas de fotossensibilizador que desaparecem e a taxa inicial de absorção de fotões. A constante de primeira ordem exponencial (k em s^{-1}) foi obtida através do ajuste das absorvâncias em função dos intervalos de tempo de irradiação.[6]

$$\Phi_{pd} = \frac{V_d}{V_p} = 0{,}11978\ \frac{VA_o k}{\varepsilon \lambda P(1-10^{-A_i})}\ (IV)$$

Nesta fórmula, V refere-se ao volume de solução inicial (em L), A_o e A_i referem-se aos valores de absorção inicial no pico correspondente ao coeficiente de absorção molar (ε) e ao valor de absorção correspondente ao comprimento de onda da luz de irradiação (em m). P refere-se à potência da luz (em watt).

5.5. Estudos *in vitro*

I - Cultura celular

A linha celular A549 de cancro de pulmão humano foi mantida em cultura a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5 % CO_2. Utilizou-se um meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - 13,4 g/L de glucose) suplementado com ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfonico (HEPES - 2,4 g/L), $NaHCO_3$ (2g/L), 10 % (V/V) FBS e 1 %

do antibiótico penicilina-streptomicina (*PenStrep*). Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, as células foram colocadas em cultura num frasco de 75 cm^2 e destacadas usando tripsina quando apresentavam uma confluência de aproximadamente 80%. De seguida, resuspendeu-se as células e centrifugou-se a suspensão celular a 136 rpm durante 6 minutos. Após centrifugação os *pellets* foram ressuspensos num volume conhecido de meio de cultura e procedeu-se à contagem de uma alíquota de suspensão celular corada com *Trypan blue* numa câmara de *Neubauer*. Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado com o meio de cultura de forma a obter as concentrações celulares adequadas ao estudo.

II - Internalização celular

As células foram plaqueadas (duas placas de 96 poços) com uma densidade celular de 9000 células por poço e incubadas até atingirem uma confluência de cerca de 80 % (24 horas). Após esse período aspirou-se o meio de cultura e, de seguida, incubou-se durante mais 24 h com concentrações conhecidas de fotossensibilizador (soluções de 2,5 µM e 5 µM), exceto em 3 poços controlo. Posteriormente, a cada tempo pré-definido (6 a 26 h) aspirou-se o meio de cultura dos poços triplicados, realizou-se a lavagem dos mesmos com PBS, colocou-se novo meio e procedeu-se à medição de fluorescência (508 nm excitação e 760 nm emissão) com recurso a um leitor de microplacas *Synergy HT BioTek*. De modo a conseguir calcular a concentração do fotossensibilizador internalizado, foi necessário paralelamente definir uma reta de calibração, usando soluções de bacterioclorina BFTetraPEG em gamas de concentração que variam de 1 nM a 500 nM.

III - Citotoxicidade

As células A549 foram plaqueadas tal como descrito anteriormente; no entanto, neste caso utilizou-se uma densidade celular de 6000 células por poço. A bacterioclorina BFTetraPEG foi adicionada numa gama de concentrações entre 10 µM e 50 µM em poços triplicados e as placas foram incubados a 37 °C durante cerca de 24 h. Além disso, deixaram-se controlos triplicados - sem adição de composto- sujeitos às mesmas condições. Após o período de incubação, o meio foi removido, os poços lavados com PBS e novo meio adicionado, incubando-se por mais 24 h. A viabilidade celular foi determinada através da medição da fluorescência.

IV - Fototoxicidade

O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito para os ensaios de citotoxicidade, diferindo apenas na gama de concentrações utilizada (400 nM e 1,2 µM). Após as 24h de incubação, irradiaram-se as placas com um LED a 749 nm (FWHD = 25 nm) e com uma dose de luz de 1J/cm^2, usando a equação (*V*) para calcular o tempo de irradiação. A viabilidade celular foi determinada após 24 h através do ensaio supracitado.

$$Dose\ Luz\ (J/cm^2) = Potência\ (W/cm^2)\ x\ \Delta t\ (s)\ (\mathrm{V})$$

Referências

[1] Burrows H.D., Pereira M.M., Química: Síntese e Estrutura – Uma abordagem prática, *Escolar Editora*, **2006.**

[2] Kupiec T., *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, **2004**, 8, 223 – 227.

[3] Valeur B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, **2001.**

[4]Grancho J.C.P., Pereira M.M., Miguel M.G., Gonsalves A.M.A.R., Burrows H.D., *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75, 249 – 256.

[5] Pineiro M., Carvalho A.L., Pereira M.M., Gonsalves A.M.A.R., Arnaut L.G., Formosinho S.J., *Chem. Eur J.*, **1998**, 4, 2299 – 2307.

[6] Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 5346 – 5357.

[7] Eaton D.F., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1988**, 2, 523 – 531.

[8] Nonell S., Flors C., Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology, *The Royal Society of Chemistry*, 13, **2016.**