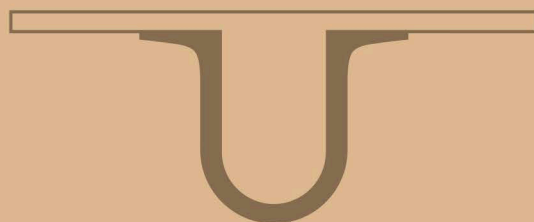




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Pedro Miguel Silveirinha Paulino

MECANISMOS DE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS
DE OXIGÉNIO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal,
orientada pelo Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut Moreira,
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigénio em terapia fotodinâmica

Pedro Miguel Silveirinha Paulino

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, orientada pelo Professor Doutor Luís Guilherme da Silva Arnaut Moreira e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Agradecimentos

A realização desta dissertação permitiu-me, não só adquirir conhecimentos na área da fotofísica e das técnicas a ela associadas, mas como também crescer como cientista e como pessoa. Porém, o percurso realizado, não só este ano, mas também nos quatro anteriores, não foi feito sozinho. Como tal gostaria de agradecer a uma série de pessoas que tornaram este percurso possível.

Ao meu orientador, Doutor Luís Arnaut por me ter permitido trabalhar consigo pelo terceiro ano consecutivo, por todo o conhecimento e sabedoria que me transmitiu e por ajudar sempre a encontrar a solução e quando preciso chamar à atenção.

Ao meu co-orientador, Doutor Carlos Serpa, pela prontidão em me acolher como seu orientando e por toda a ajuda, apoio e conselhos que me forneceu.

Ao Doutor Fábio Schaberle, por todo o conhecimento que me transmitiu, especialmente na aprendizagem das técnicas utilizadas, e por toda a paciência neste processo.

À Luzitin S.A. e ao grupo de Catálise e Química Fina pela cedência dos fotossensibilizadores.

Aos colegas do grupo de Estrutura, Energia e Reatividade, Hélder, Catarina Lobo, Catarina Jesus, Maria Inês e André, por todos os conselhos, disponibilidade e companhia. Ao Alexandre, por todo o conhecimento e ajuda que sempre disponibilizou, e pelo exemplo de dinamismo.

Aos amigos de Coimbra, Bento, Diogo, Malva, Branquinho, Rita Fernandes, Marco, Rita Cardoso, Bernardo, Margarida, Beatriz, e aos amigos de Campo Maior, Telmo, Rondão, João Fernandes, Sónia, João Queiroz, Mário e amigos da Banda Filarmónica 1º de Dezembro, por toda a amizade e companhia nos bons e nos maus momentos.

Ao grupo de amigos “Os Surdos” por estarem presentes e sempre dispostos a ajudar e a animar.

À minha família pelo apoio desde o início e pelas lições de vida que me foram transmitindo.

Aos amigos que já são família, Alexandre, Luís e Christophe, por me terem empurrado sempre para a frente e por poder contar sempre com vocês.

Por fim, aos meus pais e à minha irmã, por todo o esforço e sacrifício ao longo destes anos, pelo carinho, pelas lições de vida, pelo exemplo de integridade e moralidade e especialmente pela paciência. Isto não teria sido possível sem vocês, não sei como vos agradecer.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Abreviaturas	v
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Terapia Fotodinâmica.....	3
1.2 Fotossensibilizadores	4
1.2.1 Porfirinas.....	4
1.2.2 Bacterioclorinas	6
1.2.3 Formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	8
1.2.4 Características de um fotossensibilizador ideal	10
1.3 Técnicas de Quantificação de Propriedades Fotofísicas.....	10
1.3.1 Fotólise por relâmpago	11
1.3.2 Fosforescência de Oxigênio Singuleto.....	12
1.3.3 Calorimetria Fotoacústica.....	13
1.4 Proposta de Trabalho	15
1.5 Referências.....	17
Capítulo 2: Materiais e Métodos	23
2.1 Fotossensibilizadores	25
2.2 Espectroscopia de Absorção UV-Visível	26
2.3 Rendimento Quântico de Oxigênio Singuleto.....	26
2.4 Calorimetria Fotoacústica	27
2.4.1 Calorimetria Fotoacústica em Água	28
2.5 Fotólise por Relâmpago	28
2.6 Coeficiente de Absortividade Molar do Tripleto	29
2.7 Referências.....	31
Capítulo 3: Resultados e Discussão	33
3.1 Espectros de Absorção UV-Visível.....	35
3.2 Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singuleto.....	37
3.3 Calorimetria Fotoacústica	41
3.3.1 P10	43
3.3.2 P11	44
3.3.3 LUZ10.....	46

3.3.4 LUZ11	48
3.3.5 Calorimetria Fotoacústica em Água	50
3.4 Fotólise por Relâmpago	51
3.5 Coeficiente de Absortividade Molar do Triplete	53
3.6 Referências	56
Capítulo 4: Conclusão	59
4.1 Referências	63

Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma estratégia terapêutica pouco invasiva que assenta na administração de um fotossensibilizador (PS) e posterior irradiação do tecido alvo. A interação do PS fotoestimulado com o oxigénio molecular, presente no tecido alvo, origina espécies reativas de oxigénio (ROS) que induzem uma cascata de reações que culmina com a morte celular.

As propriedades fotofísicas e fotoquímicas do fotossensibilizador têm um papel importante na eficiência da terapia. A modulação destas propriedades através da alteração estrutural do PS permite o desenho de uma vasta gama de fotossensibilizadores com potencial aplicação clínica. Porfirinas e os seus derivados, clorinas e bacterioclorinas, são frequentemente utilizados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica.

Nesta dissertação foram estudadas as propriedades fotofísicas e fotoquímicas de duas porfirinas (P10 e P11) e das bacterioclorinas correspondentes (LUZ10 e LUZ11). Para tal, recorreu-se a técnicas espectroscópicas como a fotólise por relâmpago e a adaptação desta técnica para a determinação do rendimento quântico de oxigénio singuleto. A complementação destas técnicas com calorimetria fotoacústica permitiu uma melhor compreensão das reações ocorrentes no sistema após fotoestimulação.

Em suma, as porfirinas estudadas apresentam, relativamente às bacterioclorinas, maior rendimento quântico de oxigénio singuleto e maior tempo de vida do estado tripleto. O relaxamento do estado tripleto das porfirinas é quase exclusivamente realizado pela transferência de energia para o oxigénio molecular, sendo pouco provável a ocorrência de mecanismos de transferência de carga. Nas bacterioclorinas, o relativamente curto tempo de vida do estado tripleto e baixo rendimento quântico de oxigénio singuleto sugerem a existência de mecanismos de transferência de carga significativos.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive therapeutic strategy based on the administration of a photosensitizer (PS) followed by the irradiation of the target tissue. The interaction between the photostimulated PS and molecular oxygen, present in the tissue, generates reactive oxygen species (ROS) that induce a cascade of reactions that end in cellular death.

The photophysical and photochemical properties of the photosensitizer play an important role in the efficiency of the therapy. The modulation of these properties through structural modification of the PS allows the design of numerous PS with potential clinical application. Porphyrins and its derivatives, chlorins and bacteriochlorins, are widely used as photosensitizers in photodynamic therapy.

In this dissertation the photophysical and photochemical properties of two porphyrins (P10 and P11) and their bacteriochlorin derivatives (LUZ10 and LUZ11) were studied. These properties were studied using spectroscopic techniques such as flash photolysis and its adaptation to determine singlet oxygen quantum yield. These techniques were complemented with photoacoustic calorimetry that allowed a better understanding of the occurring reactions after photostimulation.

In conclusion, the studied porphyrins present a higher singlet oxygen quantum yield and longer triplet state lifetime, relative to the bacteriochlorins. The quenching of porphyrins' triplet state is almost exclusively done by energy transfer to molecular oxygen, as the charge transfer mechanisms are unlikely to happen. Bacteriochlorins, on the other hand, present shorter triplet state lifetime and lower singlet oxygen quantum yield, which suggests charge transfer mechanisms are significant in the quenching process.

Abreviaturas

E_{hv}	Energia do laser
E_{S_1}	Energia do primeiro estado singuleto excitado
E_T	Energia do estado tripleto
$E_{v_{max}}$	Energia do máximo de fluorescência
FFI	<i>Front face irradiation</i> (Irradiação de face frontal)
HO•	Radical hidroxilo
HOMO	Orbitais moleculares ocupadas de maior energia
ISC	Cruzamento intersistema
LUMO	Orbitais moleculares não ocupadas de menor energia
LUZ10	5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-sulfofenil)bacterioclorina
LUZ11	5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina
$O_2^{\bullet -}$	Anião superóxido
P10	5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-sulfofenil)porfirina
P11	5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)porfirina
PAC	<i>Photoacoustic Calorimetry</i> (Calorimetria fotoacústica)
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> (Terapia fotodinâmica)
PS	<i>Photosensitizer</i> (Fotossensibilizador)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
S_0	Estado singuleto fundamental
S_1	Primeiro estado singuleto excitado
S_n	Estado singuleto excitado no nível eletrónico n
T_1	Primeiro estado tripleto excitado
T_n	Estado tripleto excitado no nível eletrónico n
1O_2	Oxigênio singuleto
E_Δ	Energia do oxigênio singuleto
f_Δ^T	Eficiência de formação de oxigênio singuleto

ΔOD	Varição de densidade ótica
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar
ϵ_T	Coeficiente de absorvidade molar do tripleto
τ_1	Tempo de vida da primeira fração de calor libertada
τ_2	Tempo de vida da segunda fração de calor libertada
τ_T	Tempo de vida do estado tripleto
ϕ_1	Primeira fração de libertação de calor
ϕ_2	Segunda fração de libertação de calor
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
ϕ_{IC}	Rendimento quântico de conversão interna
ϕ_T	Rendimento quântico de formação de tripleto
ϕ_Δ	Rendimento quântico de oxigénio singuleto

Capítulo 1

Introdução

1.1 Terapia Fotodinâmica

A utilização de luz na terapia remonta ao Antigo Egipto e aos povos chineses e indianos, que utilizavam a luz no tratamento de várias doenças como o cancro da pele e psoríase. Na Grécia Antiga, Herodotus, um ilustre médico, desenvolveu a Helioterapia que tinha como premissa que a exposição à luz solar era crucial para o tratamento de problemas de saúde.¹ Porém, devido ao surgimento do cristianismo, estas técnicas foram abandonadas durante séculos. Já no início do século XX, o médico Niels Finsen acreditou a fototerapia como ciência, e os seus contributos na aplicação clínica desta técnica valeram-lhe o prémio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1903.¹

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica pouco invasiva já utilizada na área da dermatologia e no tratamento de alguns tipos de cancro.^{2,3} Esta terapia foi aprovada pela primeira vez em 1993 para o tratamento de cancro da bexiga, com a utilização do fotossensibilizador Photofrin.⁴

Esta técnica consiste na junção de três componentes: um fotossensibilizador (PS), uma fonte de luz e oxigénio molecular presente nos tecidos alvo²⁻⁵, sendo que estes componentes por si só não são citotóxicos.^{6,7} Inicialmente o fotossensibilizador é administrado por via sistémica, tópica ou local. Após algum tempo de espera, para que seja permitida a distribuição do PS, segue-se a irradiação da área pretendida com um feixe de luz com o comprimento de onda adequado, o que provoca a absorção de fotões pelo PS levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e posterior morte celular através de apoptose ou necrose (figura 1.1).^{3,4,7} Os mecanismos de formação de ROS e as transições eletrónicas ocorrentes no PS são explicados no capítulo 1.2.

Uma vantagem da terapia fotodinâmica no tratamento de cancro, em relação à cirurgia e à quimioterapia, é o facto de desencadear respostas imunitárias, a nível sistémico, que podem levar à diminuição do crescimento tumoral fora da zona do tratamento.⁸

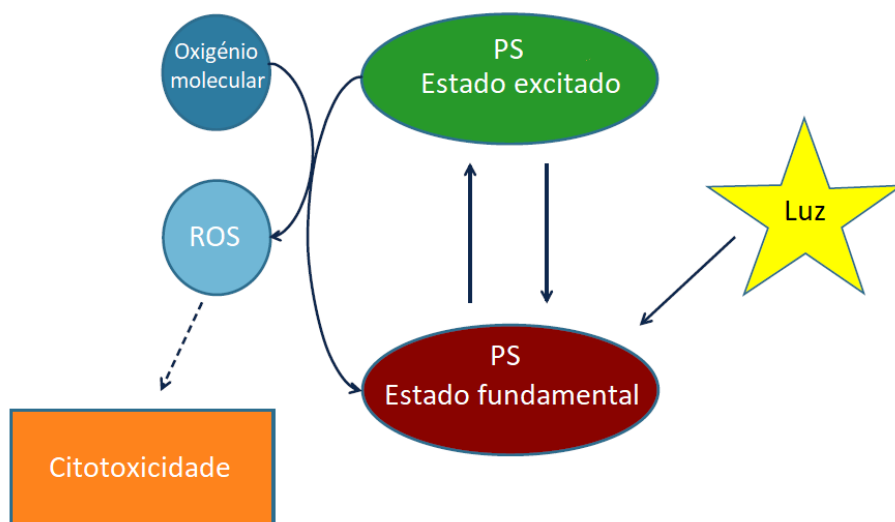


Figura 1.1. Mecanismo de terapia fotodinâmica. No primeiro passo ocorre a interação da luz com o fotossensibilizador no estado fundamental, que, após a absorção de fótons, passa para o estado excitado. Neste estado, o PS interage com o oxigênio molecular, levando à formação de ROS, que causam morte celular. Adaptado de ².

1.2 Fotossensibilizadores

1.2.1 Porfirinas

Uma das classes de moléculas mais utilizadas como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica *in vivo* é a classe das porfirinas.^{9,10}

Porfirinas são uma família de moléculas orgânicas que têm no seu núcleo um macrociclo tetrapirrólico ligados por grupos metino.^{11,12} Existem dois sistemas de nomenclatura para os macrociclos tetrapirrólico em questão. Um deles é o sistema de nomenclatura de Fisher¹³, em que os carbonos periféricos dos grupos pirrólicos são considerados posições β e são numerados de 1 a 8, e os grupos metino são considerados posições *meso* e identificados com as letras gregas α , β , γ e δ . O outro sistema de nomenclatura é o sistema da IUPAC¹⁴, que identifica os carbonos do macrociclo com numeração de 1 a 20, e os átomos de azoto de 21 a 24 (figura 1.2).

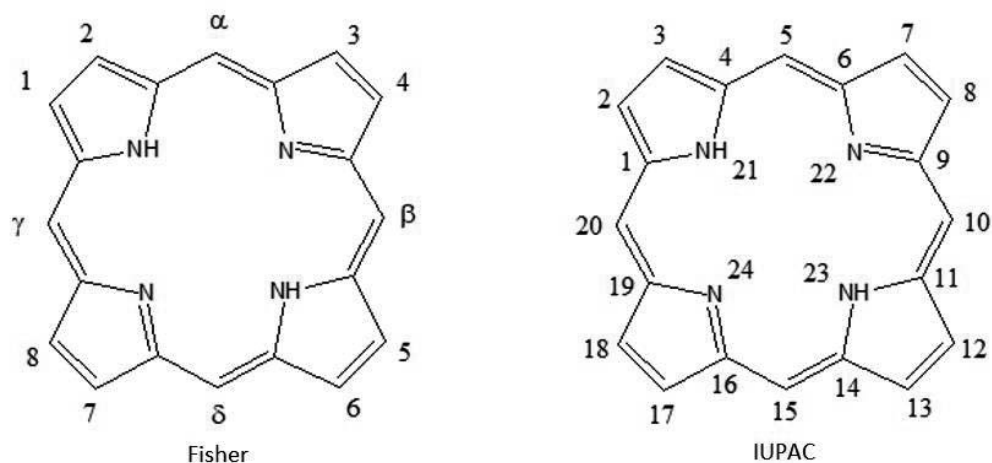


Figura 1.2. Identificação dos átomos do macrociclo tetrapirrólico de acordo com a nomenclatura de Fisher e IUPAC.^{13,14}

Um modelo que permite uma interpretação simples das transições eletrônicas que ocorrem nesta classe de moléculas é o modelo de Gouterman.¹⁵ Este modelo baseia-se nas duas orbitais moleculares ocupadas de maior de maior energia (HOMO) e nas duas orbitais moleculares não ocupadas de menor energia (LUMO). Em porfirinas de base livre, como a porfina (H_2P) e 5,10,15,20-tetrafenilporfina (H_2TPP), os dois hidrogénios ligados aos dois átomos centrais de azoto provocam uma distorção no macrociclo, o que leva a uma alteração de geometria de D_{4h} para D_{2h} . Nesta geometria, as orbitais HOMO obtêm a denominação de a_u e b_{1u} , e as duas orbitais LUMO designam-se b_{2g} e b_{3g} .¹¹ Porém, em porfirinas metaladas, as duas orbitais HOMO mencionadas apresentam energias próximas o suficiente para serem consideradas degeneradas, e as orbitais LUMO têm energias ainda mais próximas (figura 1.3).^{11,16} Este fenómeno provoca interação de configuração dos estados eletrônicos e a sua desdobragem, o que origina um par de bandas Q (Q_x e Q_y) de baixa intensidade e energia, e um par de bandas B (B_x e B_y) de alta energia. Nas porfirinas estas bandas B aparecem geralmente como uma única banda muito intensa, denominada banda Soret.^{11,16} Em porfirinas de base livre, a distorção provocada pelos átomos de hidrogénio altera a degenerescência das orbitais b_{2g} e b_{3g} o que causa um split das bandas Q.¹¹

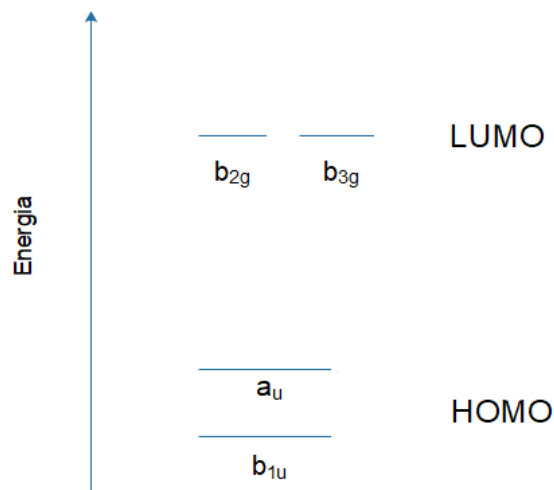


Figura 1.3. Energias relativas das orbitais HOMO e LUMO de porfirinas.^{11,16} (Diagrama desenhado através do software Edraw Max®)

Alterações no macrociclo tetrapirrólico ou introdução de substituintes nas posições *meso* e β dão origem a derivados com diferentes propriedades fotofísicas, o que pode influenciar o comportamento como fotossensibilizador.¹⁷ A introdução de um átomo pesado potencia o cruzamento intersistema através do acoplamento spin-orbital.^{18,19} Por outro lado, a introdução de átomos halogénios na posição *orto* de grupos fenilo, nas posições *meso* da porfirina, aumenta mais a formação do estado tripleto do que o seu decaimento.²⁰ A adição de quatro grupos fenol, sulfónico ou sulfonamida nas posições *meso* confere um carácter anfifílico à porfirina, permitindo a modulação da solubilidade assim como a interação com membranas biológicas, o que potencia e facilita a sua aplicação como agente terapêutico.^{17,21}

O primeiro fotossensibilizador aprovado para terapia fotodinâmica de vários tipos de cancro foi o Photofrin®, tendo sido aprovado nos Estados Unidos da América pela Food and Drug Administration e por mais de 40 países em 1995.^{22,23}

1.2.2 Bacterioclorinas

Como referido anteriormente, alterações no macrociclo das porfirinas podem originar derivados com características fotofísicas e fotoquímicas significativamente diferentes em relação à porfirina inicial. A redução de um grupo pirrol dá origem a di-

hidroporfirinas ou clorinas. Uma segunda redução, no grupo pirrol oposto ao inicialmente reduzido, origina tetra-hidroporfirinas ou bacterioclorinas (figura 1.4).^{11,16,24,25}

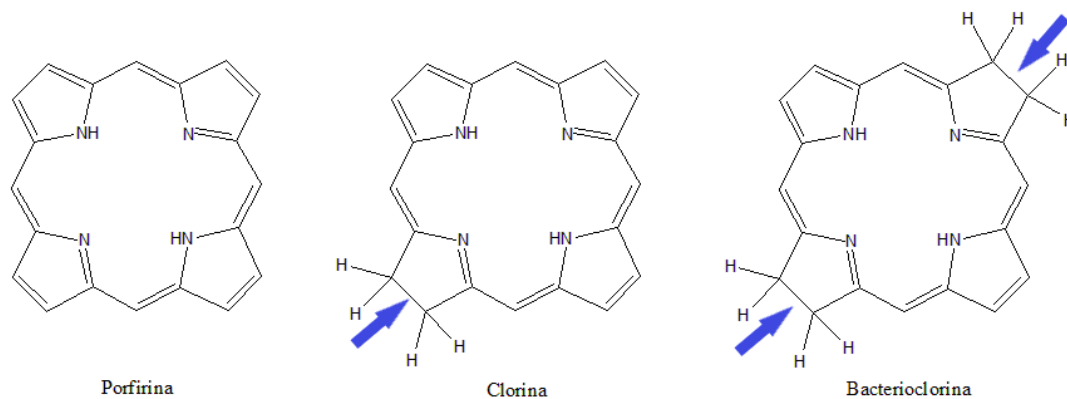


Figura 1.4. Estrutura dos macrociclos tetrapirrólicos de porfirinas, clorinas e bacterioclorinas, respectivamente.

Esta redução do número de elétrons π do macrociclo de 22 para 20 e 18 não afeta significativamente os níveis de energia das orbitais LUMO, mas verifica-se um aumento sistemático das energias das orbitais HOMO, o que provoca a diminuição do HOMO-LUMO gap (figura 1.5). Com a alteração deste intervalo de energias, verifica-se uma intensificação e aumento do comprimento de onda da banda Q das bacterioclorinas para a região próxima do infravermelho e infravermelho, 720-850 nm.^{16,24-27}

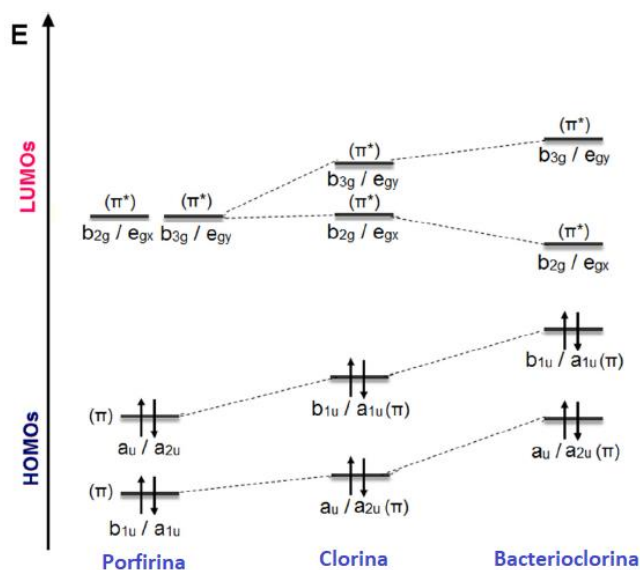


Figura 1.5. Variação de energia das orbitais HOMO e LUMO de porfirinas, clorinas e bacterioclorinas.

Adaptado de ¹⁶.

Tal como nas porfirinas, a introdução de grupos substituintes no macrociclo de bacterioclorinas pode alterar significativamente as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas. A introdução de grupos fenilo halogenados, nas quatro posições *meso*, confere uma maior fotoestabilidade, maior rendimento quântico de oxigénio singuleto e carácter anfifílico modulado às bacterioclorinas.^{28,29}

Um exemplo de uma bacterioclorina utilizada como fotossensibilizador é a Redaporfin (também designada LUZ11)³⁰, que já se encontra em ensaios clínicos (NCT: NCT02070432).

1.2.3 Formação de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS)

No seu estado fundamental, o fotossensibilizador está no estado singuleto, S_0 , com dois eletrões com spin oposto na sua orbital molecular HOMO. A excitação do PS com luz com o comprimento de onda adequado faz com que o PS absorva um fóton e um dos eletrões referidos passa para um estado de maior energia, S_n , e mantém o spin. No estado S_n , o eletrão rapidamente perde parte da energia por conversão interna até ao primeiro estado excitado singuleto, S_1 . Este estado, S_1 , tem um tempo de vida muito curto (nanossegundos), e a partir deste estado, o eletrão pode perder o excesso de energia, e regressar ao estado fundamental, por processos radiativos (fluorescência) ou por processos não-radiativos (conversão interna, cruzamento intersistema) através de libertação de calor. O processo de cruzamento intersistema implica a inversão de spin do eletrão, o que leva ao estado tripleto, T_1 . A inversão de spin referida trata-se de um processo “proibido” o que implicaria que a probabilidade de ocorrência seria muito baixa em relação a processos “permitidos”, porém, um PS eficaz consegue realizar o processo de cruzamento intersistema (ISC, do inglês *inter-system crossing*) com alta eficiência. No estado T_1 , o eletrão pode perder a energia em excesso através de fosforescência ou por interação com outra molécula no estado tripleto. O processo de fosforescência envolve inversão de spin, que, como referido anteriormente, é um processo “proibido”, e por este motivo o estado tripleto tem um tempo de vida mais longo, o que permite a interação com outras moléculas.^{7,16,22,31–33}

É no estado tripleto que ocorre a interação com o oxigénio molecular, que, no estado fundamental, se encontra no estado tripleto. Esta interação pode ocorrer por transferência direta de energia para o oxigénio molecular (reações de tipo II) dando origem a oxigénio singuleto, 1O_2 , uma espécie reativa de oxigénio responsável pela indução de stress oxidativo durante a terapia fotodinâmica. O PS pode também reagir através de reações do tipo I, nas quais ocorre transferência de eletrão para o oxigénio dando origem a radicais anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo ($HO\bullet$).^{7,16,22,31,32} A figura 1.6 ilustra as transições referidas neste capítulo.

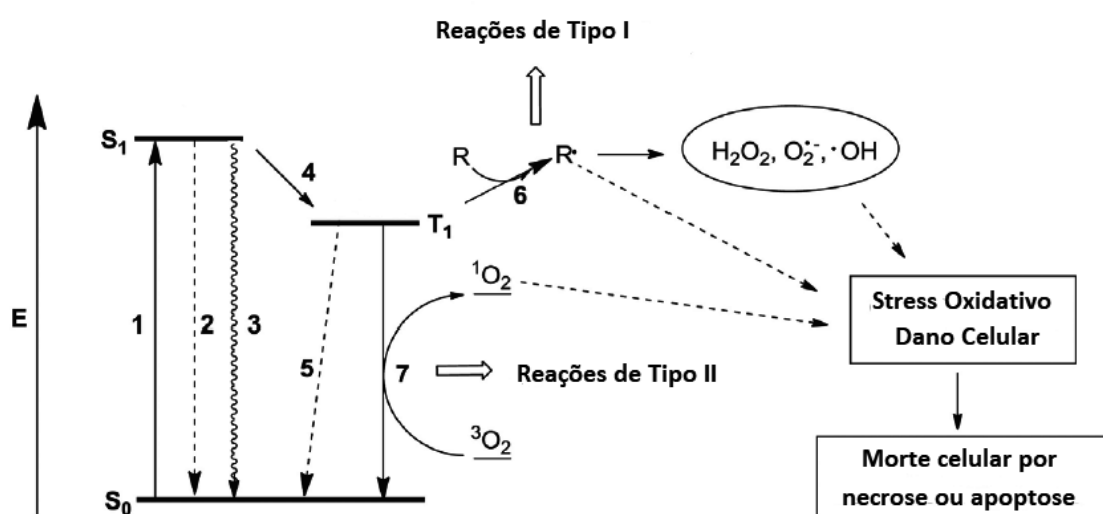


Figura 1.6. Diagrama de Jablonski com os processos foto físicos que ocorrem após a excitação do PS. (1) Absorção; (2) fluorescência; (3) conversão interna; (4) cruzamento intersistema; (5) fosforescência; (6) formação de radicais através de reações de transferência de eletrão; (7) formação de oxigénio singuleto através de transferência de energia para o oxigénio molecular. Adaptado de ²².

De acordo com Wilkinson, quanto menor for o potencial de oxidação, mais competitivas se tornam reações de tipo I, o que vai provocar a diminuição do rendimento quântico de oxigénio singuleto (ϕ_Δ) e aumentar a constante de *quenching* (k_q) do PS.³⁴⁻³⁶ Devido à variação do intervalo energético entre as orbitais HOMO e LUMO, o potencial de oxidação ao longo da série de moléculas varia da seguinte forma: porfirinas > clorinas > bacterioclorinas^{16,30,37}, o que sugere que as reações de tipo I serão mais significativas em bacterioclorinas do que em porfirinas.

Fukuzumi *et al*³⁷ verificaram a existência de outro tipo de processo, que ocorre quando o intervalo energético entre as orbitais HOMO e LUMO é menor do que a energia do tripleto. Nestas condições, pode ocorrer transferência de eletrão do estado tripleto do PS para uma outra molécula de PS no estado fundamental, formando o respetivo catião e anião. O anião do PS pode depois transferir um eletrão para o oxigénio molecular e produzir anião superóxido.³⁷

1.2.4 Características de um fotossensibilizador ideal

A compreensão do sistema e das transições e processos envolvidos na terapia fotodinâmica permitiu a formulação do perfil de um fotossensibilizador ideal. Sternberg *et al*³² definiu que um PS ideal deve apresentar uma absorção forte na zona do vermelho (> 650 nm), rendimento quântico de formação de tripleto (ϕ_T) alto com energia de tripleto (E_T) superior a 94 kJ mol⁻¹ (energia do primeiro estado singuleto excitado do oxigénio, E_Δ), rendimento quântico de oxigénio singuleto alto (ϕ_Δ), baixa toxicidade no escuro, seletividade para tecidos tumorais, formulação simples, validade longa, eliminação (*clearance*) rápida, síntese fácil e possibilidade de síntese em grande escala.³²

Estas características foram depois definidas mais detalhadamente³⁸: o PS deve ter absorção forte entre os 700 e 800 nm, coeficiente de absorvidade molar (ϵ), na região referida, superior a 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹, rendimento de fluorescência (ϕ_F) igual ou superior a 0.2, rendimento de formação de tripleto igual ou superior a 0.7, tempo de vida do estado tripleto (τ_T) igual ou superior a 100 μ s, rendimento quântico de oxigénio singuleto superior a 0.5 e rendimento quântico de fotodegradação (ϕ_{pd}) inferior a 10⁻⁵.

1.3 Técnicas de Quantificação de Propriedades Fotofísicas

Neste projeto são estudadas as propriedades fotofísicas e fotoquímicas de porfirinas e bacterioclorinas. Para tal recorreu-se a técnicas espectroscópicas e à calorimetria fotoacústica para determinar as referidas propriedades.

1.3.1 Fotólise por relâmpago

As contribuições de Norrish e Porter^{39,40} permitiram o desenvolvimento da técnica de fotólise por relâmpago, que rapidamente se revelou útil para o estudo de espécies transientes, como radicais ou estados eletrónicos excitados.⁴¹⁻⁴³ O desenvolvimento do laser em 1960 impulsionou a importância da técnica devido à possibilidade de uma melhor resolução temporal numa escala ainda menor. De facto, atualmente, instrumentação que permite resolução temporal de nanossegundos e picossegundos é comum em laboratórios.^{43,44}

Nesta técnica, inicialmente é medida a intensidade de luz, num comprimento de onda definido (com recurso a um monocromador), da lâmpada após atravessar a amostra (I_0), através de um fotomultiplicador. De seguida, um pulso de laser, com comprimento de onda definido, excita a amostra. Parte do feixe de luz do laser é captada por um detetor (*trigger*) que informa o controlador para uma nova medida da intensidade de luz, após um intervalo de tempo t (I_t). A informação é transmitida para um osciloscópio, que por sua vez a transmite ao computador (figura 1.7).⁴³⁻⁴⁵ A lâmpada pode ser “pulsada”, aumentando a sua intensidade de modo a melhorar o sinal.

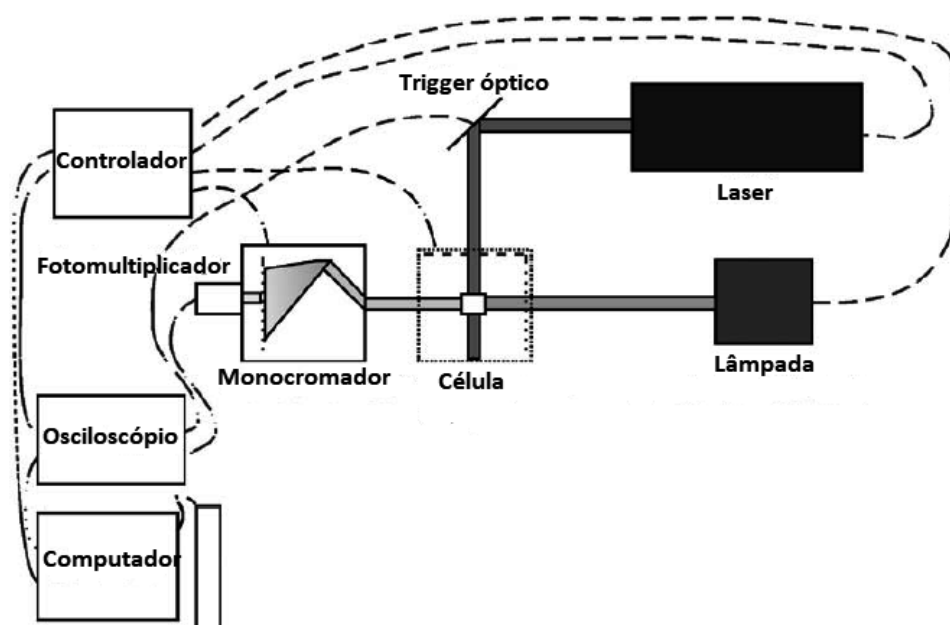


Figura 1.7. Instrumentação utilizada na técnica de fotólise por relâmpago. Adaptado de ⁴³.

A absorção de transiente é obtida através da variação de absorção, ΔA (também denominada variação de densidade ótica, ΔOD), pela equação 1.1⁴³:

$$\Delta A(\lambda, t) = \Delta OD(\lambda, t) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda, t)}$$

(equação 1.1)

Com base nesta equação, para comprimentos de onda onde o estado fundamental absorve, o sinal irá ser negativo pois a intensidade de luz a alcançar o fotomultiplicador irá ser menor antes do pulso do laser. Por outro lado, se se trata de um comprimento de onda em que haja absorção por parte da espécie transiente, o sinal irá ser positivo. A emissão de fluorescência por parte da amostra após excitação irá provocar um sinal negativo devido à maior intensidade de luz a atingir o fotomultiplicador após o pulso.⁴⁵

A possibilidade de adquirir sinais a comprimentos de onda diferentes e intervalos de tempo diferentes faz com que a fotólise por relâmpago seja uma técnica útil no estudo das propriedades fotofísicas de fotossensibilizadores, pois permite a análise do decaimento cinético do estado tripleto, e assim como a análise do espectro de absorção tripleto-tripletto.^{43,44}

1.3.2 Fosforescência de Oxigénio Singuleto

Na terapia fotodinâmica, as reações de tipo II desempenham um papel crucial na eficácia desta modalidade.^{22,31,46} Como referido anteriormente, estas reações ocorrem quando há interação direta entre o estado excitado tripleto do fotossensibilizador e o oxigénio molecular, que no seu estado fundamental trata-se de um tripleto, e tem como resultado a produção de oxigénio singuleto, 1O_2 (ou $O_2 \ ^1\Delta_g$). A desativação do oxigénio singuleto envolve uma transição de spin o que resulta em emissão de luminescência na forma de fosforescência. Em 1976, Krasnovsky identificou pela primeira vez a referida luminescência com comprimento de onda característico 1270 nm⁴⁷. A deteção de oxigénio singuleto através desta característica tornou-se numa metodologia padrão, desde então.⁴⁸⁻⁵⁰

A instrumentação para a detecção de oxigênio singuleto e rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto (Φ_{Δ}) é semelhante à utilizada na fotólise por relâmpago, porém não requer a lâmpada responsável pela medição de absorção. O feixe do laser incide na amostra e a fosforescência provocada pelo decaimento do oxigênio singuleto é medida pelo fotomultiplicador após a seleção do comprimento de onda (1270 nm) ter sido efetuada pelo monocromador. O fotomultiplicador transmite a informação ao osciloscópio e este transmite ao computador. Esta instrumentação é sincronizada por um controlador e um *trigger* ótico, à semelhança da fotólise por relâmpago.

Para a quantificação do rendimento quântico de oxigênio singuleto é necessário medir a intensidade de fosforescência com diferentes energias relativas do laser, para construir um gráfico de intensidade de fosforescência em função da energia relativa do laser. De seguida, aplica-se um ajuste linear e retira-se o declive da reta (S , do inglês *Slope*) e compara-se com o declive obtido por uma referência, nas mesmas condições, através da equação 1.2⁵¹⁻⁵³:

$$\Phi_{\Delta}^A = \frac{S_A}{S_{ref}} \times \Phi_{\Delta}^{ref}$$

(equação 1.2)

Onde Φ_{Δ}^A e Φ_{Δ}^{ref} correspondem ao rendimento quântico de oxigênio singuleto da amostra e da referência, respetivamente, e S_A e S_{ref} correspondem ao declive da reta obtida por ajuste linear da amostra e da referência respetivamente. Esta equação apenas é válida quando as soluções da amostra e referência têm a mesma absorção no comprimento de onda de excitação. Caso contrário, é necessário fazer o ajuste da absorção.

1.3.3 Calorimetria Fotoacústica

A calorimetria fotoacústica (PAC, do inglês *Photoacoustic Calorimetry*) resolvida no tempo foi introduzida por Peters^{54,55}. Nas suas publicações, revelaram a possibilidade de medições de tempos de vida de espécies transientes, assim como

medições da energia libertada na forma de calor por estas espécies. Esta técnica mede a libertação de energia, gerada por processos não-radiativos, após irradiação da amostra, o que permite calcular constantes de reação e entalpias de reação com valores de incerteza relativamente baixos.^{56,57}

Na calorimetria fotoacústica, a amostra em solução é fornecida à célula, por intermédio de uma bomba, onde vai ser irradiada por um pulso de laser. A energia absorvida pela amostra é depois libertada por processos radiativos e não-radiativos. A libertação de energia por processos não-radiativos ocorre através da libertação de calor para o solvente, o que provoca uma expansão termoelástica do solvente. Esta expansão, se for frustrada por confinamento do espaço, gera uma onda de pressão (onda acústica) que se propaga para o exterior, onde é captada por um transdutor que transmite a informação em forma de sinal elétrico para um osciloscópio (figura 1.8).^{56,58-60} O sinal obtido com a amostra, denominado onda $E(t)$, é analisado através da deconvolução com uma onda $T(t)$, obtida através da medição da onda fotoacústica de uma referência fotoacústica, que tem como característica a libertação, sob a forma de calor, de toda a energia absorvida, dentro do intervalo de tempo do pulso do laser.⁵⁹

A deteção da onda fotoacústica pode ocorrer perpendicularmente ao feixe do laser⁶⁰ ou de forma colinear (FFI, do inglês *front face irradiation*).^{57,59} A técnica de FFI apresenta uma maior sensibilidade e resolução temporal do que a técnica de deteção perpendicular.^{59,61,62}

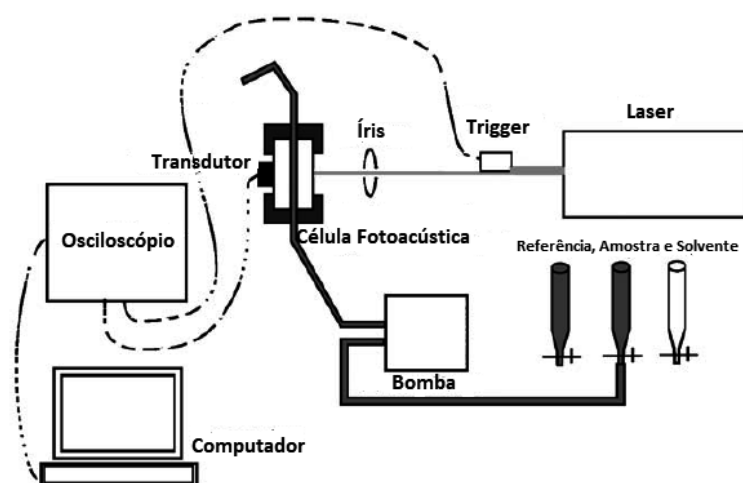


Figura 1.8. Instrumentação da técnica de calorimetria fotoacústica com FFI. Adaptado de ⁴³.

Os processos que ocorrem após irradiação da amostra podem ser divididos em três categorias relativamente à sua análise por calorimetria fotoacústica, porém esta separação é dependente da natureza do transdutor e também do método de deteção (perpendicular ou FFI). Processos com tempos de vida superiores a 20 μ s são demasiado lentos para serem detetados pelo transdutor. Processos com tempos de vida inferiores a 2 ns são considerados demasiado rápidos, porém é possível integrar o sinal de modo a obter a libertação de calor nesse intervalo de tempo. Os processos que ocorrem entre estes intervalos de tempo são resolvidos em tempo e fornecem informação não só da quantidade de calor libertada, mas também do tempo de vida das espécies transientes envolvidas.^{56,59}

Após a irradiação, para além da energia libertada sob a forma de calor para o solvente, se ocorrer a formação de iões, a solvatação destes pode contribuir também para a onda fotoacústica. A calorimetria fotoacústica utilizando água como solvente permite a separação destas componentes, devido ao coeficiente de expansão térmica da água ser zero a 3.9°C. A comparação de sinais à temperatura ambiente e a 3.9°C permite separar a onda fotoacústica resultante da solvatação de iões da onda resultante da expansão térmica da água, dado que esta não ocorre a 3.9°C.^{63,64} Esta metodologia pode ser útil no estudo de fotossensibilizadores, pois estes podem produzir anião superóxido.

1.4 Proposta de Trabalho

Neste projeto é feita uma abordagem a técnicas que permitem a quantificação de propriedades fotofísicas e fotoquímicas de fotossensibilizadores.

A proposta de trabalho tem como objetivo a caracterização fotofísica e fotoquímica das bacterioclorinas 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina (F₂BMet ou LUZ11)³⁰ e 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-sulfofenil)bacterioclorina (F₂BOH ou LUZ10)⁶⁵ e as suas respetivas porfirinas (F₂PMet ou P11 e F₂POH ou P10).^{17,66}

O primeiro passo consiste na quantificação do rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto em etanol. O próximo passo envolve a caracterização dos estados transientes através da calorimetria fotoacústica. O terceiro passo consiste na determinação do tempo de vida do estado tripleto e do espectro de absorção tripleto-tripletto, que permite calcular, em conjunto com o coeficiente de absorptividade molar (ϵ), o coeficiente de absorptividade molar do tripleto (ϵ_T). O último passo consiste numa experiência de calorimetria fotoacústica utilizando água como solvente, com o intuito de detetar a formação de anião superóxido através da onda provocada pela solvatação.

1.5 Referências

- (1) Daniell, M. D.; Hill, J. S. A History of Photodynamic Therapy. *Aust. N. Z. J. Surg.* **1991**, *61* (5), 340–348.
- (2) Wan, M.; Lin, J. Current Evidence and Applications of Photodynamic Therapy in Dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2014**, No. 7, 145–163.
- (3) Agostinis, 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.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. *Am. Cancer Soc.* **2011**, *61*, 250–281.
- (4) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387.
- (5) Allison, R. R.; Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* **2013**, *46* (1), 24–29.
- (6) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy and Anti-Tumour Immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (7), 535–545.
- (7) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2004**, *1* (4), 279–293.
- (8) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Photodynamic Therapy (PDT) of Cancer: From Local to Systemic Treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (10), 1765–1780.
- (9) Macdonald, I. A. N. J.; Dougherty, T. J. Basic Principles of Photodynamic Therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105–129.
- (10) Vicente, M. G. Porphyrin-Based Sensitizers in the Detection and Treatment of Cancer: Recent Progress. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* **2001**, *1* (2), 175–194.
- (11) Arnaut, L. G. Design of Porphyrin-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Inorg. Chem.* **2011**, *63*, 187–233.
- (12) Fleischer, E. B. The Structure of Porphyrins and Metalloporphyrins. *Acc. Chem. Res.* **1970**, *3* (3), 105–112.
- (13) Fischer, H.; Orth, H. *Die Chemie Des Pyrrols*; 1934; Vol. 1.
- (14) Moss, G. P.; College, Q. M. C) Nomenclature of Tetrapyrroles. *Eur. J. Biochem.* **1988**, No. 178, 277–328.
- (15) Gouterman, M. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *6* (C), 138–163.
- (16) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyra, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G. Engineering of Relevant Photodynamic Processes through Structural Modifications of Metallotetrapyrrolic Photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101.
- (17) Pucelik, B.; Paczyński, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. *PLoS One* **2017**, *12* (10), 1–22.
- (18) Yao, L.; Xiao, S.; Dan, F.; Yao, L.; Xiao, S.; Dan, F. Boron-Fluorine Photosensitizers for Photodynamic Therapy, Boron-Fluorine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *J.*

- Chem. J. Chem.* **2013**, 2013, 2013, e697850.
- (19) De Boni, L.; Monteiro, C. J. P.; Mendonça, C. R.; Zílio, S. C.; Gonçalves, P. J. Influence of Halogen Atoms and Protonation on the Photophysical Properties of Sulfonated Porphyrins. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, 633 (1), 146–151.
- (20) Azenha, E. G.; Serra, A. C.; Pineiro, M.; Pereira, M. M.; Seixas de Melo, J.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Rocha Gonsalves, A. M. d. A. Heavy-Atom Effects on Metalloporphyrins and Polyhalogenated Porphyrins. *Chem. Phys.* **2002**, 280 (1–2), 177–190.
- (21) Dąbrowski, J. M. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. *Adv. Inorg. Chem.* **2017**, 70, 343–394.
- (22) Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin. Endosc.* **2013**, 46 (1), 7–23.
- (23) Huang, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2005**, 4 (3), 283–293.
- (24) Huang, Y.-Y.; Balasubramanian, T.; Yang, E.; Luo, D.; Diers, J. R.; Bocian, D. F.; Lindsey, J. S.; Holten, D.; Hamblin, M. R. Stable Synthetic Bacteriochlorins for Photodynamic Therapy: Role of Dicyano Peripheral Groups, Central Metal Substitution (2H, Zn, Pd), and Cremophor EL Delivery. *ChemMedChem* **2012**, 7 (12), 2155–2167.
- (25) Muthiah, C.; Taniguchi, M.; Kim, H. J.; Schmidt, I.; Kee, H. L.; Holten, D.; Bocian, D. F.; Lindsey, J. S. Synthesis and Photophysical Characterization of Porphyrin, Chlorin and Bacteriochlorin Molecules Bearing Tethers for Surface Attachment. *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83 (6), 1513–1528.
- (26) Chang, C. K.; Hanson, L. K.; Richardson, P. F.; Young, R.; Fajer, J. π Cation Radicals of Ferrous and Free Base Isobacteriochlorins: Models for Siroheme and Sirohydrochlorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78 (5), 2652–2656.
- (27) Sharma, S. K.; Krayner, M.; Sperandio, F. F.; Huang, L.; Huang, Y.-Y.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. Synthesis and Evaluation of Cationic Bacteriochlorin Amphiphiles with Effective in Vitro Photodynamic Activity against Cancer Cells at Low Nanomolar Concentration. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2013**, 17 (01n02), 73–85.
- (28) 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.; Dbrowski, J. M.; Formosinho, S. J.; et al. Synthesis and Photophysical Characterization of a Library of Photostable Halogenated Bacteriochlorins: An Access to near Infrared Chemistry. *Tetrahedron* **2010**, 66 (49), 9545–9551.
- (29) 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. Synthesis and Photophysical Properties of Amphiphilic Halogenated Bacteriochlorins: New Opportunities for Photodynamic Therapy of Cancer. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2009**, 13 (04n05), 567–573.
- (30) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; et al. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, 20 (18), 5346–5357.
- (31) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, 473 (4), 347–364.

Capítulo 1: Introdução

- (32) Sernberg, E.; Dolphin, D.; Bruckner, C. Porphyrin-Based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron* **1998**, No. 54, 4151–4202.
- (33) Omary, M. A.; Patterson, H. H. Luminescence, Theory. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier, 2017; pp 636–653.
- (34) Wilkinson, F. Quenching of Electronically Excited States by Molecular Oxygen in Fluid Solution. *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69 (4), 851–856.
- (35) Abdel-Shafi, A. A.; Wilkinson, F. Charge Transfer Effects on the Efficiency of Singlet Oxygen Production Following Oxygen Quenching of Excited Singlet and Triplet States of Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104 (24), 5747–5757.
- (36) Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. From Elementary Reactions to Chemical Relevance in the Photodynamic Therapy of Cancer. *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85 (7), 1389–1403.
- (37) Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Zheng, X.; Chen, Y.; Pandey, R. K.; Zhan, R.; Kadish, K. M. Metal Bacteriochlorins Which Act as Dual Singlet Oxygen and Superoxide Generators. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112 (9), 2738–2746.
- (38) Lenci, F.; Horspool, W. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; 2004.
- (39) NORRISH, R. G. W.; PORTER, G. Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities. *Nature*. 1949, pp 658–658.
- (40) Porter, G. Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1950**, 200 (1061), 284–300.
- (41) Goodfriend, P. L.; Woods, H. P. Apparatus for Flash Photolysis Kinetic Spectroscopy in the Vacuum Ultraviolet. *Rev. Sci. Instrum.* **1965**, 36 (1), 10–12.
- (42) Boag, J. W. Techniques of Flash Photolysis. *Photochem. Photobiol.* **1968**, 8 (6), 565–577.
- (43) Arnaut, L.; Formosinho, S.; Burrows, H. Experimental Methods. In *Chemical Kinetics*; Elsevier, 2007; pp 33–75.
- (44) Scaiano, J. C. Nanosecond Laser Flash Photolysis: A Tool for Physical Organic Chemistry. *React. Intermed. Chem.* **2004**, 847–871.
- (45) Berera, R.; van Grondelle, R.; Kennis, J. T. M. Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy: Principles and Application to Photosynthetic Systems. *Photosynth. Res.* **2009**, 101 (2–3), 105–118.
- (46) Josefsen, L. B.; Boyle, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitizers. *Met. Based. Drugs* **2008**, 2008.
- (47) Krasnovsky Jr, A. A. 46 - Fosforescência Kraznovsky. *Biofizika* **1976**, 748.
- (48) Schweitzer, C.; Schmidt, R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (5), 1685–1758.
- (49) Krasnovsky Jr, A. A. Singlet Molecular Oxygen in Photobiochemical Systems: IR Phosphorescence Studies. *Membr. Cell Biol.* **1998**, 12 (5), 665–690.
- (50) PR, H. S. L. Time-Resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen concentration. *Photochem Photobiol* **2008**, 84 (5), 1284–1290.

Capítulo 1: Introdução

- (51) Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Monteiro, C. J. P.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. The Challenging Combination of Intense Fluorescence and High Singlet Oxygen Quantum Yield in Photostable Chlorins-a Contribution to Theranostics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (7), 1187–1192.
- (52) Baier, J.; Maisch, T.; Maier, M.; Engel, E.; Landthaler, M.; Bäuml, W. Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers. *Biophys. J.* **2006**, *91* (4), 1452–1459.
- (53) Oliveira, A. S.; Licsandru, D.; Boscencu, R.; Socoteanu, R.; Nacea, V.; Vieira Ferreira, L. F. A Singlet Oxygen Photogeneration and Luminescence Study of Unsymmetrically Substituted Mesoporphyrinic Compounds. *Int. J. Photoenergy* **2009**, 2009.
- (54) Rothberg, L. J.; Simon, J. D.; Bernstein, M.; Peters, K. S. Pulsed Laser Photoacoustic Calorimetry of Metastable Species. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (11), 3464–3468.
- (55) Peters, K. S. Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58* (9), 1263–1266.
- (56) Fletcher, B.; Grabowski, J. J. Photoacoustic Calorimetry: An Undergraduate Physical-Organic Experiment. *J. Chem. Educ.* **2000**, *77* (5), 640.
- (57) Arnaut, L. G.; Caldwell, R. A.; Elbert, J. E.; Melton, L. A. Recent Advances in Photoacoustic Calorimetry: Theoretical Basis and Improvements in Experimental Design. *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, *63* (11), 5381–5389.
- (58) Borges Dos Santos, R. M.; Lagoa, A. L. C.; Martinho Simões, J. A. Photoacoustic Calorimetry. An Examination of a Non-Classical Thermochemistry Tool. *J. Chem. Thermodyn.* **1999**, *31* (11), 1483–1510.
- (59) Schaberle, F. A.; Rego Filho, F. D. A. M. G.; Reis, L. A.; Arnaut, L. G. Assessment of Lifetime Resolution Limits in Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry vs. Transducer Frequencies: Setting the Stage for Picosecond Resolution. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15* (2), 204–210.
- (60) Braslavsky, S. E.; Helbel, G. E. Time-Resolved Photothermal and Photoacoustic Methods Applied to Photoinduced Processes in Solution. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1381–1410.
- (61) Melton, L. A.; Ni, T.; Lu, Q. Photoacoustic Calorimetry: A New Cell Design and Improved Analysis Algorithms. *Rev. Sci. Instrum.* **1989**, *60* (10), 3217–3223.
- (62) Ni, T.; Caldwell, R. A.; Melton, L. A. The Relaxed and Spectroscopic Energies of Olefin Triplets. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (2), 457–464.
- (63) Westrick, J. A.; Goodman, J. L.; Peters, K. S. A Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry Study of the Dynamics of Enthalpy and Volume Changes Procedure in Photodissociation of Carbon Monoxide from Sperm Whale Carboxymyoglobin. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8313–8318.
- (64) Peters, K.; Snyder, G. Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry: Probing the Energetics and Dynamics of Fast Chemical and Biochemical Reactions. *Science* (80-.). **1988**, *241* (4869), 1053–1057.
- (65) Luz, A. F. S.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Translating Phototherapeutic Indices from in Vitro to in Vivo Photodynamic Therapy with Bacteriochlorins. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50* (5), 451–459.
- (66) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Macyk, W.; Stochel, G. New

Capítulo 1: Introdução

Hybrid Materials Based on Halogenated Metalloporphyrins for Enhanced Visible Light Photocatalysis. *RSC Adv.* **2015**, 5 (113), 93252–93261.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Fotossensibilizadores

Neste projeto estudaram-se quatro fotossensibilizadores diferentes: duas porfirinas e duas bacterioclorinas. A porfirina 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-sulfofenil)porfirina (F₂POH ou P10)¹ foi sintetizada e disponibilizada pelo grupo de Catálise e Química Fina. A porfirina 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)porfirina (F₂PMet ou P11)² e as bacterioclorinas 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-sulfofenil)bacterioclorina (F₂BOH ou LUZ10)³ e 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina (F₂BMet ou LUZ11)⁴ foram disponibilizadas pela Luzitin, S.A. As estruturas dos fotossensibilizadores encontram-se na figura 2.1.

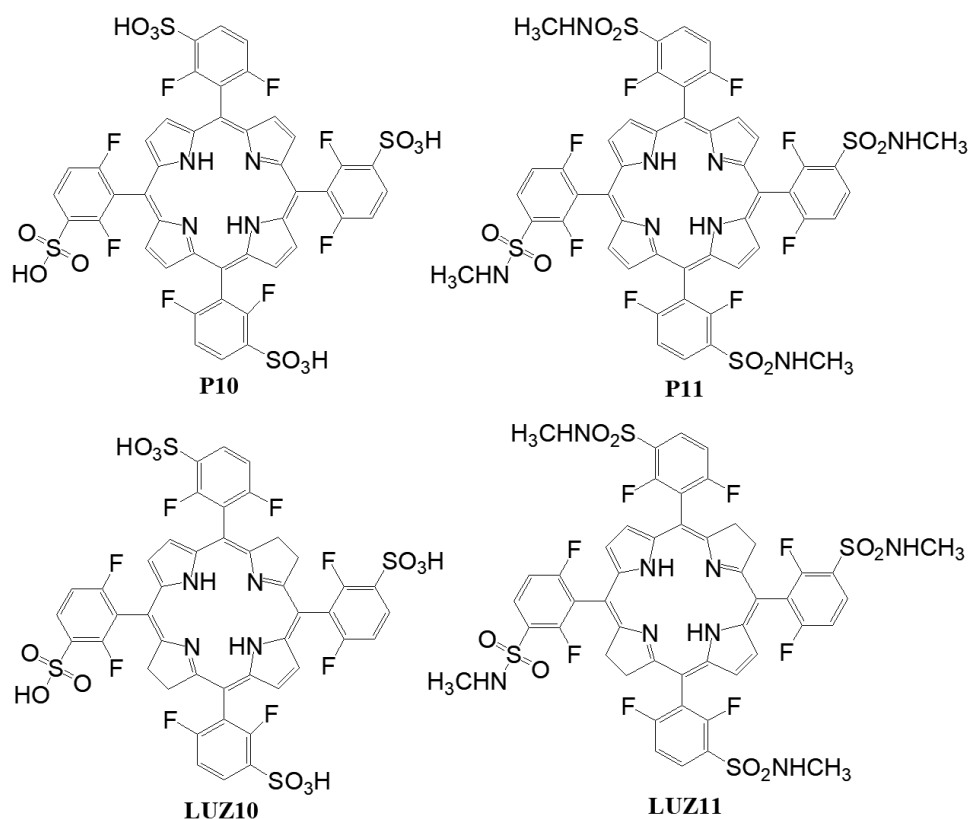


Figura 2.1. Estruturas dos fotossensibilizadores estudados.

Na P10 e LUZ10 (por uma questão de simplicidade, esta será a nomenclatura adotada ao longo desta tese), o grupo sulfónico nos grupos fenol confere um carácter hidrofílico, enquanto o grupo metilsulfonamida, presente na P11 e LUZ11, confere um carácter mais lipofílico.^{1,3-5} Os átomos de fluor nas posições *orto* dos grupos fenilo

potencia o cruzamento intersistema e aumenta o rendimento quântico de tripleto (ϕ_T).¹ Além disso, esses átomos fazem aumentar o potencial de oxidação favorecendo em particular a estabilidade das bacterioclorinas fluoradas.

2.2 Espectroscopia de Absorção UV-Visível

Os espectros de absorção e medições de absorção para preparação das soluções foram obtidos num espectrofotômetro Shimadzu UV-2100 ou num espectrofotômetro Cary 5000 UV-Vis-NIR, utilizando cuvetes de quartzo com o percurso ótico de 1 cm.

2.3 Rendimento Quântico de Oxigênio Singuleto

Para a quantificação do rendimento quântico de oxigênio singuleto, foram preparadas soluções, em etanol, dos fotossensibilizadores e de fenalenona, utilizada como referência ($\phi_\Delta = 0.95$)⁶. As concentrações das soluções foram acertadas de modo a obter valor de absorção de 0.3 a 355 nm.

A quantificação foi feita através da adaptação da instrumentação do espectrofotômetro de fotólise por relâmpago LKS.60 da Applied Photophysics. A irradiação foi feita por um laser Nd:YAG da Spectra-Physics Quanta-Ray GCR-130, com o comprimento de onda 355 nm, correspondente à terceira harmônica do laser. Um monocromador pbp 05-109 SpectraKinetic da Applied Photophysics foi utilizado para selecionar o comprimento de onda de emissão (fosforescência) a 1270 nm. O detetor utilizado foi um fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42, com a voltagem definida para 1595 volts e arrefecido a -80°C (193K). O sinal recolhido pelo fotomultiplicador foi transmitido a um osciloscópio TDS 3052B da Tektronix. Foi utilizado um filtro 10LWF-1000-B da Newport, de modo a impedir a passagem de radiação para o detetor com o comprimento de onda inferior a 1000 nm.

Os decaimentos de fosforescência foram medidos para diferentes energias relativas do laser, sendo feita a média de três disparos para cada energia. Aos decaimentos obtidos, foi feito um ajuste exponencial de primeiro grau para retirar o valor dos fatores pré-exponenciais, os quais foram compilados num gráfico em função

da energia relativa do laser e ajustados linearmente. O declive da reta obtida através do ajuste linear foi utilizado para determinar o rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto através da equação 1.2.

2.4 Calorimetria Fotoacústica

Para as experiências de calorimetria fotoacústica, foram preparadas soluções, em etanol, dos fotossensibilizadores e da referência fotoacústica. A referência fotoacústica utilizada foi o azuleno.⁷ As concentrações das soluções de fotossensibilizadores e referência foram acertadas para absorções entre 0.1 e 0.2 no comprimento de onda de excitação. Para as porfirinas, o comprimento de onda de excitação utilizado foi 582 nm. Para as bacterioclorinas, o comprimento de onda utilizado foi 685 nm com azuleno como referência.

A instrumentação utilizada corresponde à calorimetria fotoacústica com irradiação frontal, FFI, desenhada por Arnaut *et al.*⁸ As soluções de fotossensibilizadores, referência e solvente foram bombeadas separadamente, por intermédio de uma bomba Kloehn VersaPump, com fluxo de 1 mL min^{-1} para uma célula com 0.11 mm de percurso ótico. A irradiação foi feita por um laser de nanossegundos Nd:YAG EKSPILA NL301G com o comprimento de onda selecionado através de um oscilador paramétrico ótico (OPO) EKSPILA PG 122/SH. A deteção da onda fotoacústica foi feita através de um transdutor de 2.25 MHz da Panametrics modelo A106S. O sinal foi pré-amplificado, por um pré-amplificador ultrassónico da Panametrics, modelo 5676, e captado num osciloscópio DPO 7254C da Tektronix. Foram utilizados filtros de densidade neutra de modo a variar a intensidade do laser entre 100% e 25%, tendo sido feitas aquisições para quatro valores de intensidade. Para cada intensidade foram feitas quatro aquisições, sendo que cada aquisição corresponde à média de 200 ondas. A análise do sinal foi realizada através do software C-PAC – Universidade de Coimbra, desenvolvido por Schaberle *et al.*⁹

Na célula, a amostra flui entre um espelho dielétrico, que protege o transdutor e minimiza o ruído¹⁰, e uma janela de quartzo. A separação entre o espelho e a janela é

feita com um espaçador em bronze, que define a espessura da célula. A espessura utilizada foi de 0.11 mm, que permite uma melhor sensibilidade.¹¹

2.4.1 Calorimetria Fotoacústica em Água

Para a realização de calorimetria fotoacústica em água, foram preparadas soluções em etanol dos fotossensibilizadores P10 e LUZ10 e da referência Bromocresol *purple*¹² com absorções ajustadas para 0.6 no comprimento de onda 355 nm.

A instrumentação é semelhante à utilizada na subcapítulo anterior, com algumas adaptações. A excitação foi feita com a terceira harmónica do laser referido (355 nm) com recurso a espelhos dicróicos, não sendo utilizado o OPO. As ondas da referência foram adquiridas com a temperatura na célula a 6.0°C (279K), com recurso a um circuito de refrigeração da Julabo, modelo F30-C. De seguida, foi ajustada a temperatura da célula para 3.0°C (276K), temperatura na qual não há geração de onda fotoacústica por parte da referência, devido ao coeficiente de expansão térmica da água ser zero a 3.9°C (276.9K). Após este ajuste de temperatura, foi feita a aquisição de sinal do solvente (água), seguida da aquisição de sinal das ondas fotoacústicas dos fotossensibilizadores P10 e LUZ10.

2.5 Fotólise por Relâmpago

Para as experiências de fotólise por relâmpago foram preparadas soluções, em etanol, dos fotossensibilizadores com absorção a 355 nm ajustada a 0.3. Numa fase final, foram também preparadas soluções de P10 e LUZ10 nas mesmas condições de absorção, mas com água como solvente.

Foi utilizado o espectrofotómetro de fotólise por relâmpago LKS.60 da Applied Photophysics. A excitação foi feita pela terceira harmónica (355 nm) do laser Nd:YAG da Spectra-Physics Quanta-Ray GCR-130. O pulso da lâmpada foi efetuado com recurso ao 03-102 Arc Lamp Pulser da Applied Photophysics e o comprimento de onda de absorção foi selecionado através de um monocromador pbp 05-109 SpectraKinetic da Applied Photophysics. O sinal foi captado por um fotomultiplicador da Hamamatsu, modelo R928, e transmitido para um osciloscópio da Tektronix, modelo TDS 3052B.

Para o espectro de absorção tripleto-tripletto, foram recolhidos decaimentos em intervalos de comprimento de onda de 10 nm, entre 300 e 800 nm, sendo que a aquisição de sinal de cada comprimento de onda corresponde à média de cinco decaimentos. Para a determinação do coeficiente absorvidade molar do tripleto (ϵ_T), a gama de comprimentos de onda analisada foi reduzida (300-550 nm para porfirinas) e os decaimentos foram recolhidos em intervalos de 5 nm, de modo a obter uma melhor resolução da zona do espectro pretendida.

O tempo de vida de tripleto dos fotossensibilizadores foi calculado através do ajuste exponencial de primeiro grau a decaimentos obtidos em vários comprimentos de onda.

2.6 Coeficiente de Absortividade Molar do Tripleto

A determinação do coeficiente de absorvidade molar do tripleto (ϵ_T) pelo método de depleção do singuleto¹³ baseia-se na relação entre o coeficiente de absorvidade molar do singuleto (ϵ) e a variação de densidade ótica (ΔOD) através da equação 2.1:

$$\epsilon_T = \epsilon \times \frac{\Delta OD_T}{\Delta OD_S}$$

(equação 2.1)

Onde ΔOD_T corresponde ao fator pré-exponencial obtido pelo ajuste exponencial de primeiro grau a decaimentos correspondentes a absorção de tripleto (valores positivos no espectro de absorção tripleto-tripletto) e ΔOD_S corresponde aos mesmos fatores, mas para decaimentos onde ocorre depleção do estado singuleto (valores negativos no espectro de absorção T-T).

Foi necessário também o cálculo do coeficiente de absorvidade molar. Para tal, para cada fotossensibilizador foram feitas três pesagens e diluições independentes resultando em concentrações entre 10^{-6} e 10^{-8} M. Os espectros de absorção foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV-2100 ou Cary 5000 UV-Vis-NIR. A representação gráfica dos valores de absorção, num comprimento de onda definido, em

função da concentração permitiu o ajuste linear cujo declive da reta corresponde ao coeficiente de absorvidade molar, de acordo com a lei de Beer-Lambert (equação 2.2):

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc$$

(equação 2.2)

Onde $A(\lambda)$ e $\varepsilon(\lambda)$ correspondem à absorção e ao coeficiente de absorvidade molar de um determinado comprimento de onda, respetivamente, l corresponde ao comprimento do percurso ótico e c corresponde à concentração de fotossensibilizador.

2.7 Referências

- (1) Pucelik, B.; Paczyński, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. *PLoS One* **2017**, *12* (10), 1–22.
- (2) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Macyk, W.; Stochel, G. New Hybrid Materials Based on Halogenated Metalloporphyrins for Enhanced Visible Light Photocatalysis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (113), 93252–93261.
- (3) Luz, A. F. S.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Translating Phototherapeutic Indices from in Vitro to in Vivo Photodynamic Therapy with Bacteriochlorins. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50* (5), 451–459.
- (4) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; et al. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346–5357.
- (5) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Stochel, G. Towards Tuning PDT Relevant Photosensitizer Properties: Comparative Study for the Free and Zn²⁺-coordinated Meso-Tetrakis[2,6-Difluoro-5-(N-Methylsulfamoyl)Phenyl]Porphyrin. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (17–18), 3116–3134.
- (6) Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen O₂(¹Δ_{g) Sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1994**, *79* (1–2), 11–17.}
- (7) Ferrante, C.; Signorini, R.; Feis, A.; Bozio, R. Excited State Absorption of Fullerenes Measured by the Photoacoustic Calorimetry Technique. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (7), 801–807.
- (8) Arnaut, L. G.; Caldwell, R. A.; Elbert, J. E.; Melton, L. A. Recent Advances in Photoacoustic Calorimetry: Theoretical Basis and Improvements in Experimental Design. *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, *63* (11), 5381–5389.
- (9) Schaberle, F. A.; Nunes, R. M. D.; Barroso, M.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Analytical Solution for Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry Data and Applications to Two Typical Photoreactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9* (6), 812–822.
- (10) Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Rocha Gonsalves, A. M. D. A.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies. *Chem. - A Eur. J.* **1998**, *4* (11), 2299–2307.
- (11) Ni, T.; Caldwell, R. A.; Melton, L. A. The Relaxed and Spectroscopic Energies of Olefin Triplets. *J.*

Capítulo 2: Materiais e Métodos

- Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (2), 457–464.
- (12) Braslavsky, S. E.; Helbel, G. E. Time-Resolved Photothermal and Photoacoustic Methods Applied to Photoinduced Processes in Solution. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1381–1410.
- (13) Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Monteiro, C. J. P.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. The Challenging Combination of Intense Fluorescence and High Singlet Oxygen Quantum Yield in Photostable Chlorins-a Contribution to Theranostics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (7), 1187–1192.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Espectros de Absorção UV-Visível

Os espectros de absorção UV-visível dos fotossensibilizadores P10 e P11 estão dispostos na figura 3.1. As soluções foram preparadas em etanol.

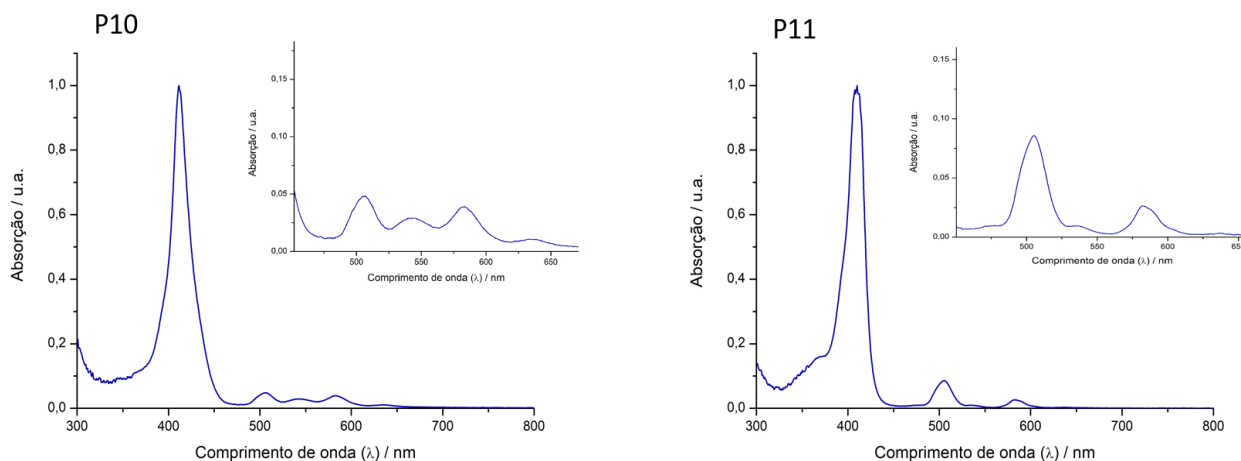


Figura 3.1. Espectros de absorção UV-visível normalizados das porfirinas P10 e P11 em etanol. A gama de valores de comprimento de onda entre 450 e 675 nm encontra-se ampliada para melhor análise das bandas Q.

Nos espectros das porfirinas é visível o split das bandas Q, característico de porfirinas de base livre. Este split ocorre devido à distorção causada pelos átomos de hidrogénio ligados aos átomos centrais de azoto. A distorção altera a geometria de D_{4h} para D_{2h} e as orbitais b_{2g} e b_{3g} perdem a degenerescência verificada em porfirinas metaladas, que mantêm a geometria D_{4h} . A banda B (Soret) destas porfirinas constitui apenas uma banda de grande intensidade, característica de porfirinas de base livre.¹⁻⁴

Os comprimentos de onda de cada uma das bandas Q e B encontram-se na tabela 3.1.

	Comprimento de onda (λ) / nm				
	B _(0,0)	Q _{Y(0,0)}	Q _{Y(0,1)}	Q _{X(0,1)}	Q _{X(0,0)}
P10	411	506	541	582	635
P11	410	505	537	582	639

Tabela 3.1. Comprimentos de onda do máximo de absorção das bandas B e Q das porfirinas P10 e P11 em etanol.

Os comprimentos de onda obtidos para o máximo de absorção das bandas Q e B da P10 não estão de acordo com os valores obtidos por Pucelik *et al*⁴ nas mesmas condições. A razão das bandas Q também não é semelhante à obtida por Pucelik, nem é semelhante à razão das bandas Q de porfirinas halogenadas, como a P11. Este fenómeno pode ser um indicativo de agregação da porfirina.⁵

O espectro da P11 revela máximo de absorção das bandas Q e B em comprimentos de onda semelhantes aos reportados por Dabrowski *et al*².

Os espectros de absorção UV-visível das bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11 em etanol estão dispostos na figura 3.2.

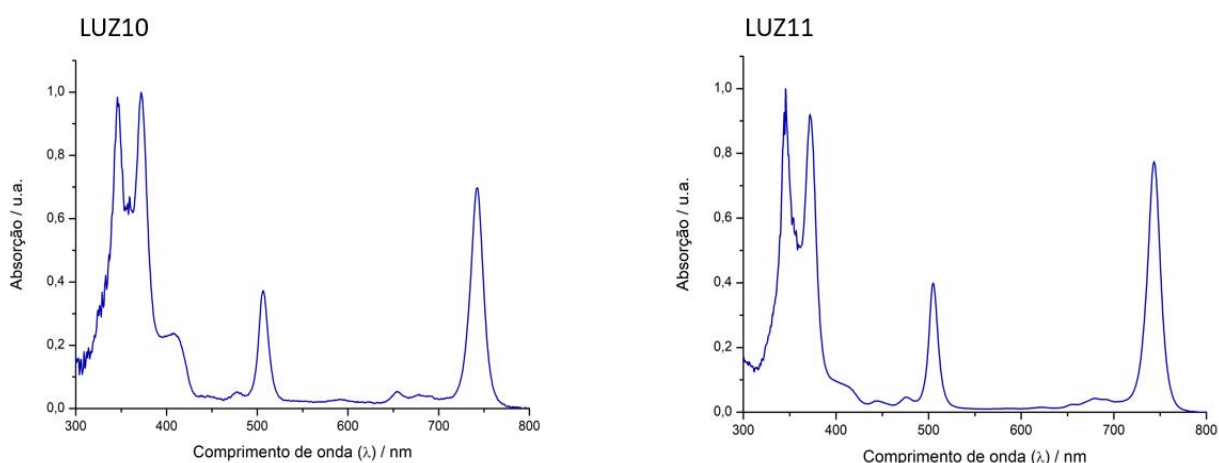


Figura 3.2. Espectros de absorção UV-visível normalizados das bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11 em etanol.

A diminuição do intervalo energético entre as orbitais HOMO-LUMO das bacterioclorinas, relativamente às porfirinas (figura 1.5), causa um efeito batocrómico (*redshift*) e intensificação da banda Q⁶⁻⁸. Nos espectros da LUZ10 e LUZ11, esta banda tem máximo de absorção para comprimentos de onda 742 e 743 nm, respetivamente. O split da banda Soret corresponde às transições mais energéticas, $a_{2u} \rightarrow e_g$ e $a_{1u} \rightarrow e_g$.¹

Os comprimentos de onda dos máximos de absorção das bandas B e Q encontram-se na tabela 3.2.

Comprimento de onda (λ) / nm					
	$B_{y(0,0)}$	$B_{x(0,0)}$	$Q_{x(0,0)}$	$Q_{y(0,1)}$	$Q_{y(0,0)}$
LUZ10	346	372	506	679	742
LUZ11	346	372	505	679	743

Tabela 3.2. Comprimentos de onda do máximo de absorção das ondas B e Q das bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11 em etanol.

Os comprimentos de onda no máximo de absorção das bandas B e Q das bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11 estão concordantes com os valores reportados anteriormente.⁸⁻¹⁰

Em ambos os espectros surgem bandas na zona dos 410 e 650 nm. Estas bandas são indicativo de contaminação por clorina, formada através da oxidação da bacterioclorina.¹¹

3.2 Rendimento Quântico de Formação de Oxigénio Singuleto

O rendimento quântico de oxigénio singuleto foi obtido por comparação entre a fenalenona (referência, $\phi_{\Delta}=0.95$ em etanol¹²) e os fotossensibilizadores, em etanol, através da razão exposta na equação 1.2. O tempo de vida do oxigénio singuleto em etanol está no ordem dos microssegundos, entre 9.7 e 12 microssegundos.^{13,14}

Os fotossensibilizadores e a referência foram excitados a diferentes energias relativas do laser e os seus decaimentos foram analisados. Os valores finais de rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto correspondem à média de três experiências independentes.

A figura 3.3 mostra um dos decaimentos, e o seu respetivo ajuste exponencial, obtido com a referência fenalenona, e o ajuste linear obtido através do gráfico dos fatores pré-exponencias em função da energia relativa do laser.

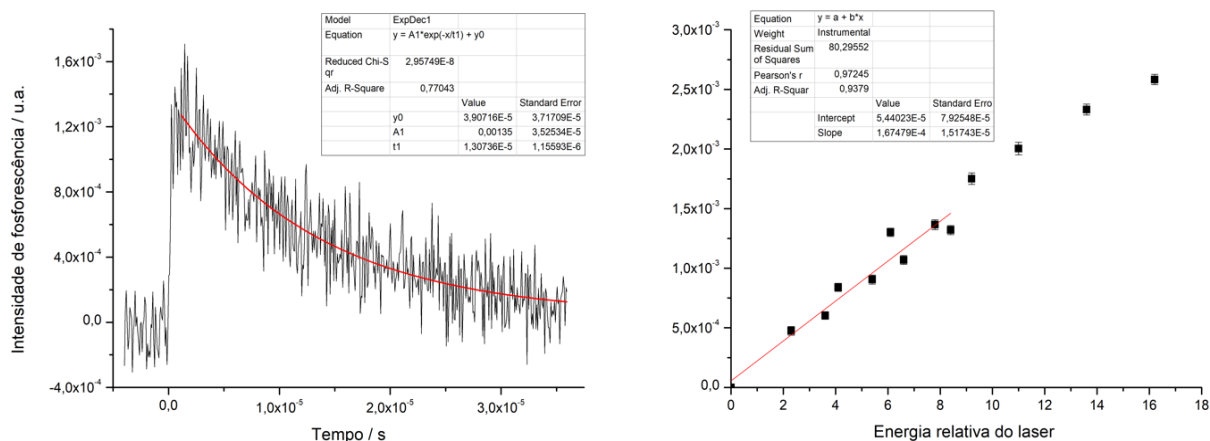


Figura 3.3. Decaimento de fosforescência a 1270 nm e ajuste exponencial de primeiro grau resultante da excitação a 355 nm da fenalenona (esquerda) em etanol e gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser com ajuste linear (direita).

O ajuste linear do gráfico dos fatores pré-exponenciais em função da energia relativa foi limitado a uma determinada energia relativa, de modo a evitar erros devido a saturação.

As figuras 3.4 e 3.5 mostram um exemplo de um decaimento e o gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser obtido através da excitação das porfirinas P10 e P11, respectivamente, assim como os seus ajustes.

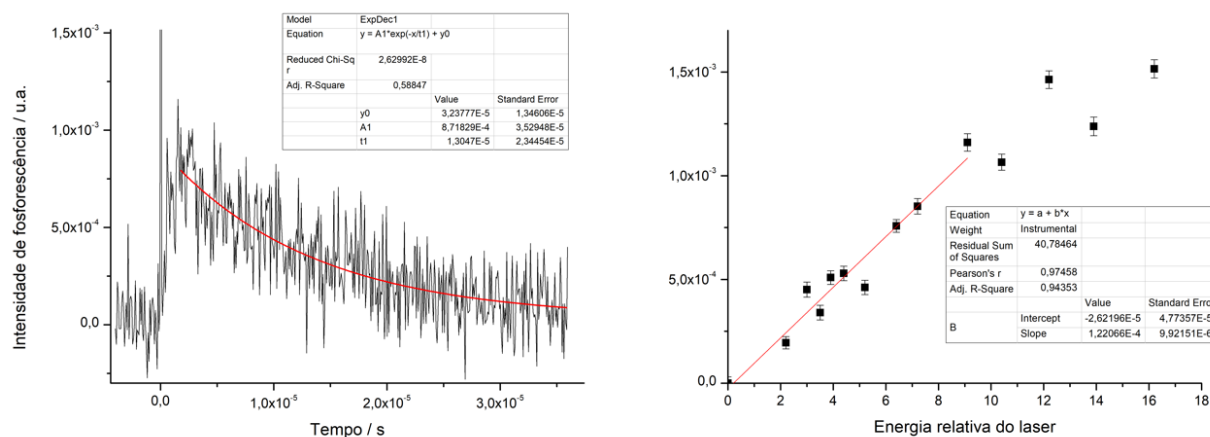


Figura 3.4. Decaimento de fosforescência a 1270 nm e ajuste exponencial de primeiro grau resultante da excitação a 355 nm da porfirina P10 (esquerda) em etanol e gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser com ajuste linear (direita).

Capítulo 3: Resultados e Discussão

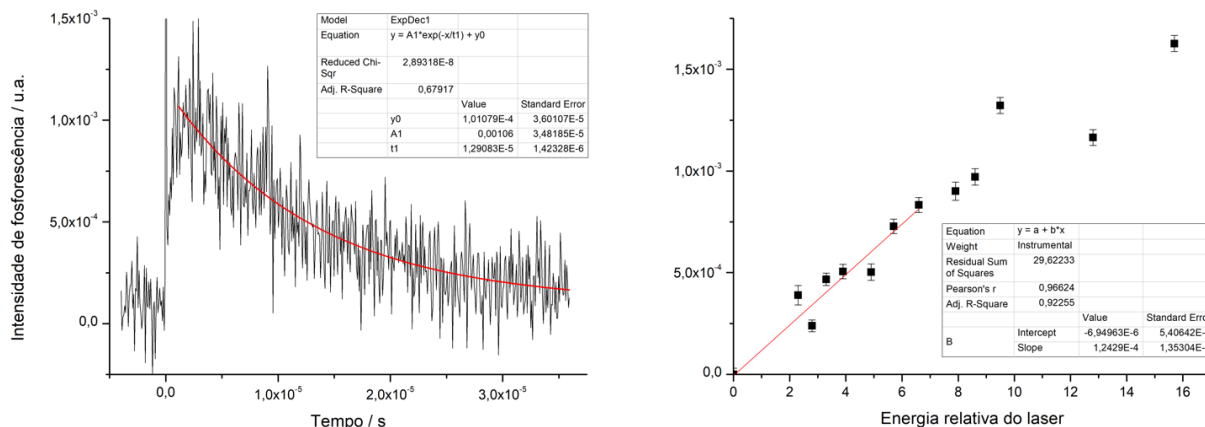


Figura 3.5. Decaimento de fosforescência a 1270 nm e ajuste exponencial de primeiro grau resultante da excitação a 355 nm da porfirimina P11 (esquerda) em etanol e gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser com ajuste linear (direita).

Para ambas as porfirinas o ajuste linear no gráfico de fatores pré-exponenciais vs energia relativa do laser foi limitado a um determinado valor de energia, de modo a evitar erros por saturação do fotossensibilizador, à semelhança do ajuste feito na fenalenona.

O mesmo processo foi realizado para as bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11 e os decaimentos e gráficos estão dispostos nas figuras 3.6 e 3.7, respectivamente.

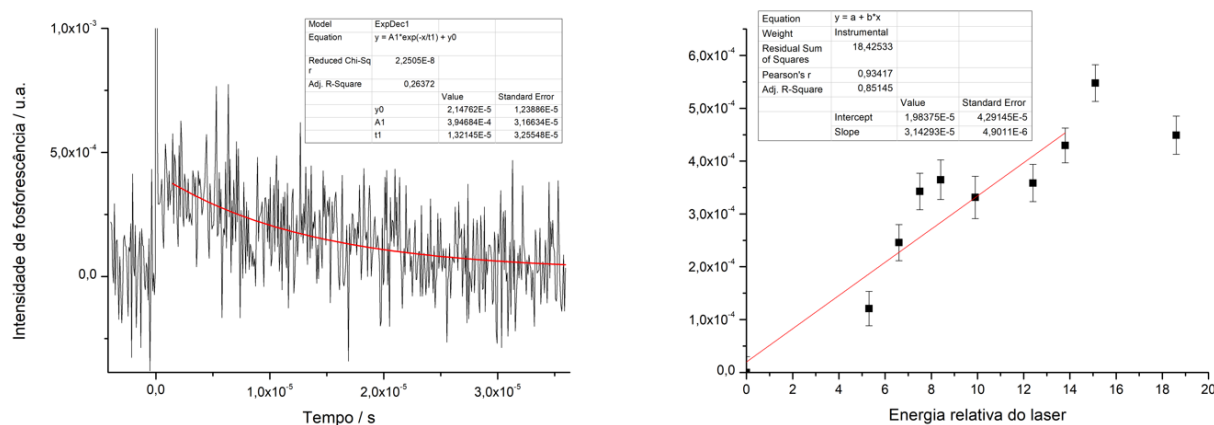


Figura 3.6. Decaimento de fosforescência a 1270 nm e ajuste exponencial de primeiro grau resultante da excitação a 355 nm da bacterioclorina LUZ10 (esquerda) em etanol e gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser com ajuste linear (direita).

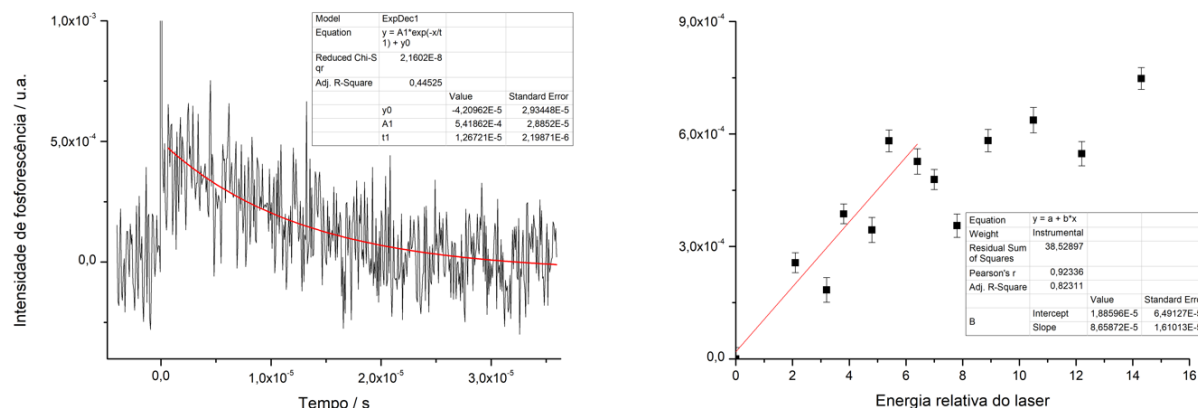


Figura 3.7. Decaimento de fosforescência a 1270 nm e ajuste exponencial de primeiro grau resultante da excitação a 355 nm da bacterioclorina LUZ11 (esquerda) em etanol e gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia relativa do laser com ajuste linear (direita).

Os declives das retas resultantes do ajuste linear no gráfico de fatores pré-exponenciais em função da energia do laser foram comparados com o declive da referência e com o seu valor tabelado de rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto, através da equação 1.2. Os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singuleto obtidos para os fotossensibilizadores estudados estão dispostos na tabela 3.3.

Fotossensibilizador	ϕ_{Δ}
P10	0.73±0.09
P11	0.62±0.09
LUZ10	0.36±0.04
LUZ11	0.43±0.08

Tabela 3.3. Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto e erro associado dos fotossensibilizadores estudados em etanol.

Os resultados obtidos estão de acordo com resultados publicados para estes fotossensibilizadores.^{3,4,9,10,15} As bacterioclorinas apresentam valores de rendimento quântico de oxigênio singuleto inferiores aos das porfirinas. De acordo com Wilkinson^{16,17}, a produção de oxigênio singuleto aumenta à medida que o potencial de oxidação aumenta, porque para valores de potencial de oxidação baixos as reações de

tipo I tornam-se mais competitivas com as reações tipo II. A bacterioclorina LUZ11 apresenta um valor relativamente baixo de rendimento quântico de oxigênio singuleto, porém apresenta uma fototoxicidade elevada¹⁰, que pode ser uma evidência da ocorrência de mecanismos de transferência de carga (reações de tipo I).

3.3 Calorimetria Fotoacústica

A deconvolução das ondas fotoacústicas obtidas, através do software desenvolvido por Schaberle *et al*¹⁸, fornece informação acerca das frações de libertação de calor (ϕ_1 e ϕ_2) e os respetivos tempos de vida (τ_1 e τ_2). A primeira fração de libertação de calor, ϕ_1 , ocorre num intervalo de tempo muito rápido ($\tau \leq 1$ ns) e corresponde à libertação de energia não-radiativa através dos processos de conversão interna entre o estado singuleto excitado S_n e o primeiro estado singuleto excitado (S_1), conversão interna entre S_1 e o estado fundamental S_0 (ϕ_{IC}), cruzamento intersistema entre S_1 e o primeiro estado tripleto T_1 (ϕ_T) e o relaxamento vibracional dos estados formados por fluorescência (ΔE_r). A segunda fração, ϕ_2 , corresponde à transferência de energia de T_1 para oxigênio e ao cruzamento intersistema entre T_1 e S_0 (figura 3.8). Porém, este último processo, como se trata de uma transição de spin “proibida”, é demasiado lento para ser observado no transdutor utilizado (2.25 MHz).

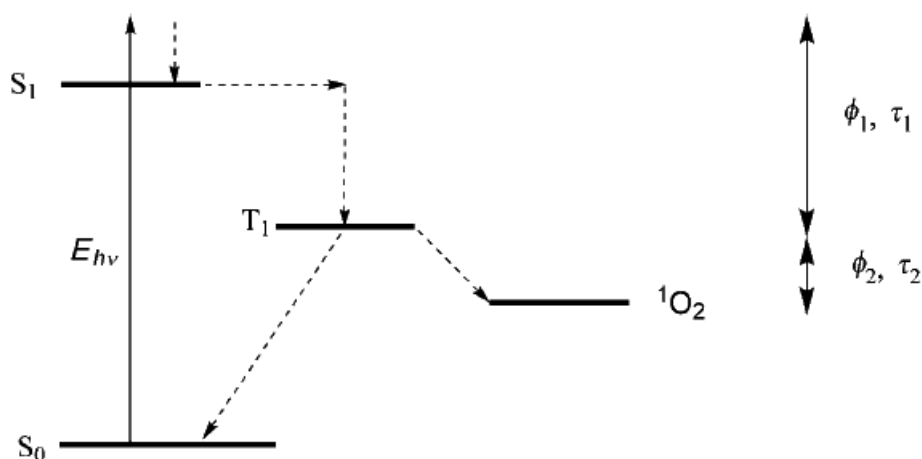


Figura 3.8. Diagrama de Jablonski simplificado, com as frações de energia libertada sob a forma de calor, ϕ_1 e ϕ_2 . $E_{h\nu}$ corresponde à energia de excitação. Adaptado de ¹⁹.

A equação correspondente à primeira fração de libertação de calor pode então ser deduzida (equação 3.1):

$$\phi_1 E_{hv} = (E_{hv} - E_{S_1}) + \phi_T (E_{S_1} - E_{T_1}) + \phi_{IC} E_{S_1} + \Delta E_r \phi_F$$

(equação 3.1)

Onde E_{hv} corresponde à energia de excitação e ϕ_F corresponde ao rendimento quântico de fluorescência. Com base nas equações 3.2 e 3.3,

$$1 = \phi_{IC} + \phi_F + \phi_T$$

(equação 3.2)

$$E_{S_1} = E_{v_{max}} + \Delta E_r$$

(equação 3.3)

a equação 3.1 pode ser simplificada e organizada em ordem a $E_T \phi_T$ (equação 3.4):

$$E_T \phi_T = E_{hv} (1 - \phi_1) - \phi_F E_{v_{max}}$$

(equação 3.4)

onde $E_{v_{max}}$ corresponde à energia do máximo de fluorescência.²⁰ A segunda fração, corresponde à transferência de energia para o oxigénio e pode ser deduzida (equação 3.5):

$$\phi_2 E_{hv} = \phi_T (E_{T_1} - E_{\Delta}) f_{\Delta}^T$$

(equação 3.5)

onde E_{Δ} corresponde à energia do estado singuleto do oxigénio ($E_{\Delta}=22.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) e f_{Δ}^T corresponde à fração de estados tripletos que sofre *quenching* pelo oxigénio e forma oxigénio singuleto. Para bacterioclorinas, a equação 3.5 é apenas uma aproximação, pois é necessário ter em conta os mecanismos de transferência de carga (ϕ_{CT}).¹

A aquisição das ondas fotoacústicas foi feita em quatro intensidades de energia do laser diferentes (100, 81, 50 e 33%) e as respetivas frações de libertação de calor foram incluídas num gráfico em função da intensidade do laser. O valor final de ϕ_1 foi extrapolado para o valor zero de intensidade de energia de modo a evitar erros por

absorção transiente-transiente.²⁰ O valor final de ϕ_2 foi obtido através da média de todos os ϕ_2 .

3.3.1 P10

As soluções de P10 e azuleno (referência) foram preparadas em etanol e a absorção foi ajustada a 0.1 no comprimento de onda de excitação. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 582 nm (banda Q_x da P10). A figura 3.9 mostra um exemplo da análise de uma onda fotoacústica obtida, normalizada e corrigida com a onda do solvente (onda O), assim como os ajustes à onda da referência (onda T) e à onda do fotossensibilizador (onda E).

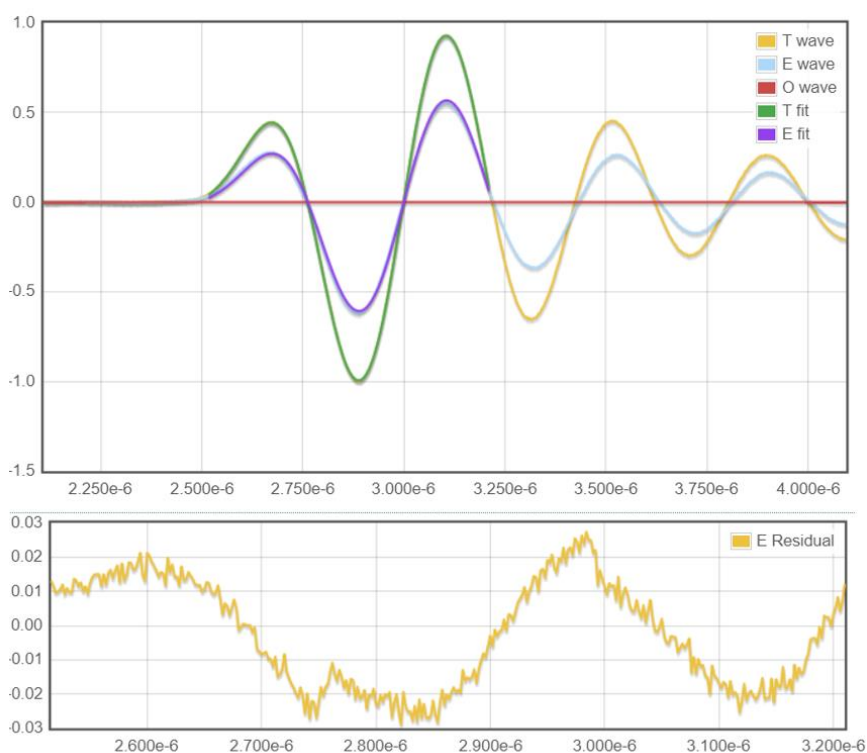


Figura 3.9. Painel superior: deconvolução da onda fotoacústica resultante da excitação a 582 nm da porfirina P10, através da onda da referência (azuleno) e corrigida com a onda do solvente (etanol).

Painel inferior: resíduos do ajuste à onda E.

O tempo de vida das frações de libertação de calor foi fixado: $\tau_1=1$ ns e $\tau_2=633$ ns (tempo de vida do estado tripleto da porfirina P10, subcapítulo 3.4). A grande variação nos resíduos é indicativa de um ajuste não ótimo, que pode ser uma evidência de agregação da porfirina. A figura 3.10 mostra o gráfico dos valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser.

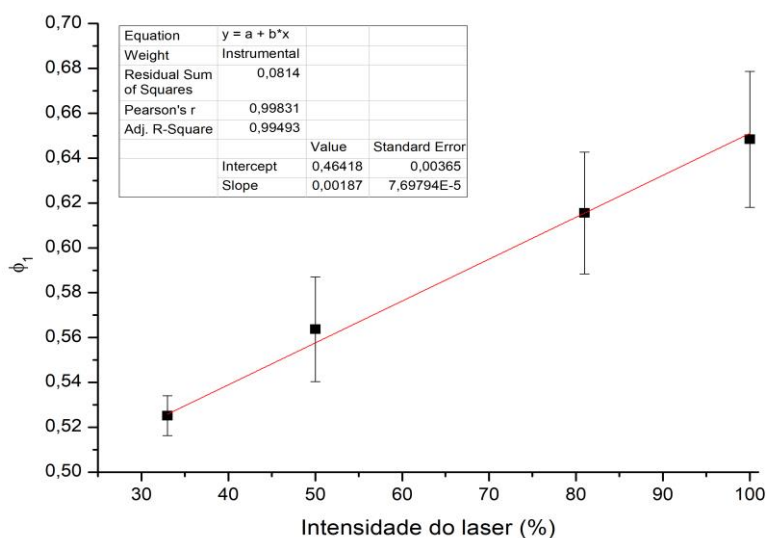


Figura 3.10. Gráfico dos valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser, com ajuste linear.

O gráfico da figura 3.10 permite extrapolar o valor $\phi_1 = 0.46$. A inclusão dos valores publicados $\phi_F = 0.04$ e $E_{\nu_{m\acute{a}x}} = 40.50 \text{ kcal mol}^{-1}$ (energia do comprimento de onda do máximo de fluorescência, 706 nm)⁴, e do valor da energia de excitação $E_{h\nu} = 49.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ (582 nm) na equação 3.4 permite obter o resultado $E_T\phi_T = 24.70 \text{ kcal mol}^{-1}$. De acordo com Silva *et al*¹⁹, a energia do estado tripleto de porfirinas deverá ser entre 33 e 36 kcal mol^{-1} . A substituição destes valores no produto obtido resulta no intervalo de valores prováveis de rendimento de tripleto 0.69-0.75.

A média dos valores da segunda fração de libertação de calor resultou em $\phi_2 = 0.17 \pm 0.04$. A resolução da equação 3.5 com este valor de ϕ_2 e com um valor médio de ϕ_T , 0.72, permite fazer uma estimativa da fração de estado tripleto que sofre *quenching* pelo oxigénio, o que resulta em $f_{\Delta}^T = 0.97 \pm 0.07$. Sabendo que $\phi_T f_{\Delta}^T = \phi_{\Delta}$, obtém-se $\phi_{\Delta} = 0.70$, que é concordante com o valor obtido por fosforescência. Porém, este resultado é fruto de muitas aproximações, o que lhe confere um elevado erro associado.

3.3.2 P11

As soluções de P11 e azuleno (referência) foram preparadas em etanol e a absorção foi ajustada a 0.1 no comprimento de onda de excitação 582 nm (banda Q_x da P11). A figura 3.11 mostra o exemplo de uma deconvolução das ondas resultantes.

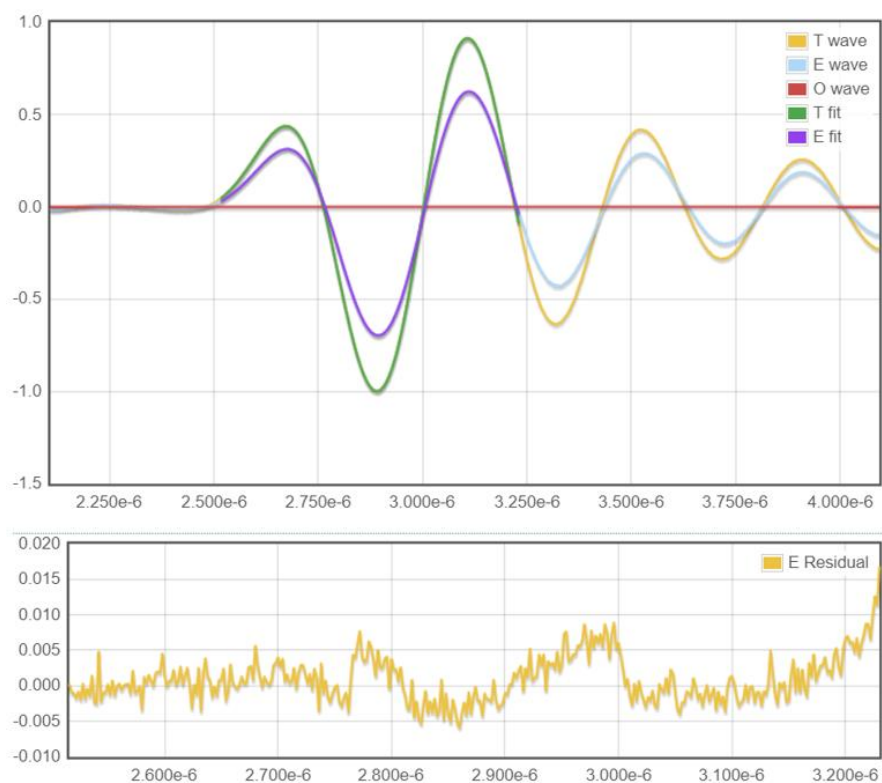


Figura 3.11. Painel superior: deconvolução da onda fotoacústica resultante da excitação a 582 nm da porfirina P11, através da onda da referência (azuleno) e corrigida com a onda do solvente (etanol).

Painel inferior: resíduos do ajuste à onda E.

O tempo de vida das frações de libertação foi fixado: $\tau_1=1$ ns e $\tau_2=461$ ns (tempo de vida do estado tripleto da P11, obtido no subcapítulo 3.4). Os resíduos do ajuste da onda E (P11) são relativamente baixos e constantes, o que indica um bom ajuste. O gráfico de ϕ_1 em função da intensidade do laser encontra-se na figura 3.12.

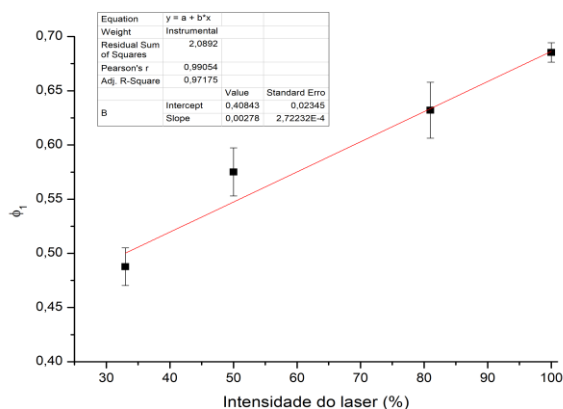


Figura 3.12. Gráfico dos valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser, com ajuste linear.

A extrapolação para o valor zero de intensidade do laser resulta em $\phi_1=0.41\pm 0.02$. A resolução da equação 3.4 com este resultado e com os valores publicados ($\phi_T=0.71$, $\phi_F=0.049$ e $E_{v_{m\acute{a}x}}=43.72 \text{ kcal mol}^{-1}$)^{2,10} dá a energia do estado tripleto da P11, $E_T = 37.92\pm 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este valor está um pouco acima dos limiares anteriormente referidos¹⁹.

A média dos valores da segunda libertação de calor foi $\phi_2=0.22\pm 0.04$. A substituição deste valor na equação 3.5, em conjunto com a energia do estado tripleto obtida, resulta em $f_{\Delta}^T = 0.99$. Este valor indica que praticamente todos os estados tripletos sofreram *quenching* por parte do oxigénio, formando oxigénio singuleto. Este resultado está de acordo com Wilkinson^{16,17}, dado que, dos derivados porfirínicos, as porfirinas têm o maior potencial de oxidação, logo as reações de tipo II vão ser predominantes.

3.3.3 LUZ10

As soluções de LUZ10 e azuleno (referência) foram preparadas em etanol e a absorção foi ajustada a 0.1 no comprimento de onda de excitação 685 nm. A figura 3.13 mostra um exemplo da deconvolução da onda gerada.

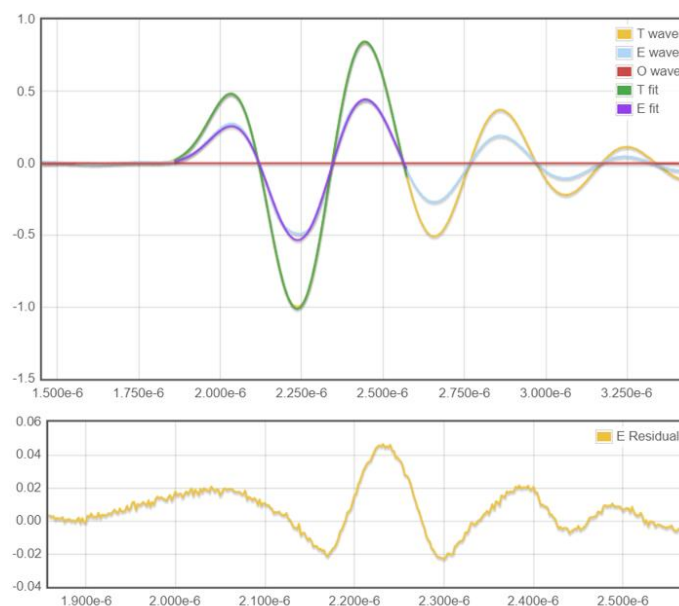


Figura 3.13. Painel superior: deconvolução da onda fotoacústica resultante da excitação a 685 nm da bacterioclorina LUZ10, através da onda da referência (azuleno) e corrigida com a onda do solvente (etanol). Painel inferior: resíduos do ajuste à onda E.

O tempo de vida das frações de libertação de calor foi fixado: $\tau_1=1$ ns e $\tau_2=285$ ns (tempo de vida do tripleto, subcapítulo 3.4). O elevado e inconstante resíduo do ajuste à onda E é indicativo de um mau ajuste, que pode ser provocado pela agregação da bacterioclorina.

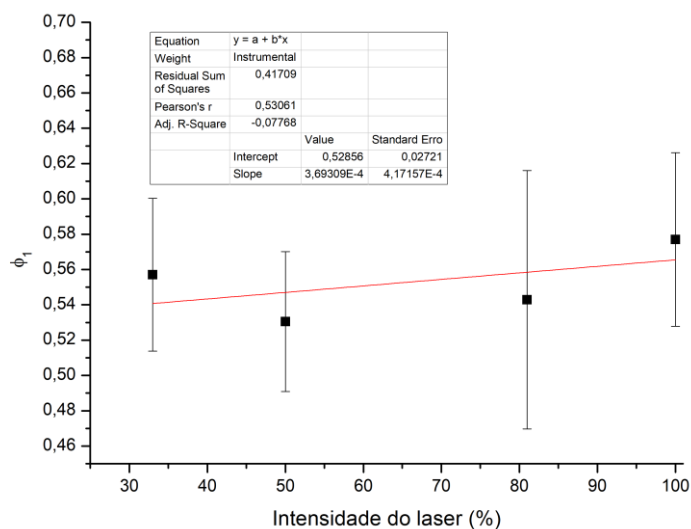


Figura 3.14. Gráfico dos valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser, com ajuste linear.

A figura 3.14 mostra o gráfico obtido com os valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser. Verifica-se um erro significativo nas medições feitas a cada intensidade e o valor de ϕ_1 para intensidade 33% não segue a linearidade esperada. Isto pode ser devido a fenômenos de agregação.

O ϕ_1 obtido a partir da extrapolação para o zero foi $\phi_1=0.53\pm 0.03$, e a substituição deste valor na equação 3.4, em conjunto com os valores publicados ($\phi_F=0.023$ e $E_{v_{m\acute{a}x}}=38.38$ kcal mol⁻¹)¹⁵, resulta no produto $E_T\phi_T=18.74$ kcal mol⁻¹. De acordo com Silva *et al*¹⁹ a energia do estado tripleto de bacterioclorinas deve estar compreendida no intervalo 26-27 kcal mol⁻¹. A substituição destes valores no produto obtido resulta no intervalo provável de rendimento de tripleto $\phi_T=0.69-0.72$. Porém, devido ao elevado erro existente nesta experiência, estes valores não são fidedignos.

A média dos valores da segunda libertação de calor obtida foi $\phi_2=0.05\pm 0.03$. A substituição, na equação 3.5, deste valor e de um valor médio de ϕ_T , 0.71, resulta em $f_{\Delta}^T = 0.80\pm 0.12$, e através deste valor obtém-se $\phi_{\Delta} = 0.57$, valor que não é concordante

com o obtido por fosforescência. Este valor apresenta um erro associado muito elevado, devido às várias aproximações feitas.

3.3.4 LUZ11

As soluções de LUZ11 e azuleno (referência) foram preparadas em etanol e a absorção foi ajustada a 0.1 no comprimento de onda de excitação 685 nm. A figura 3.15 mostra um exemplo de deconvolução da onda gerada.

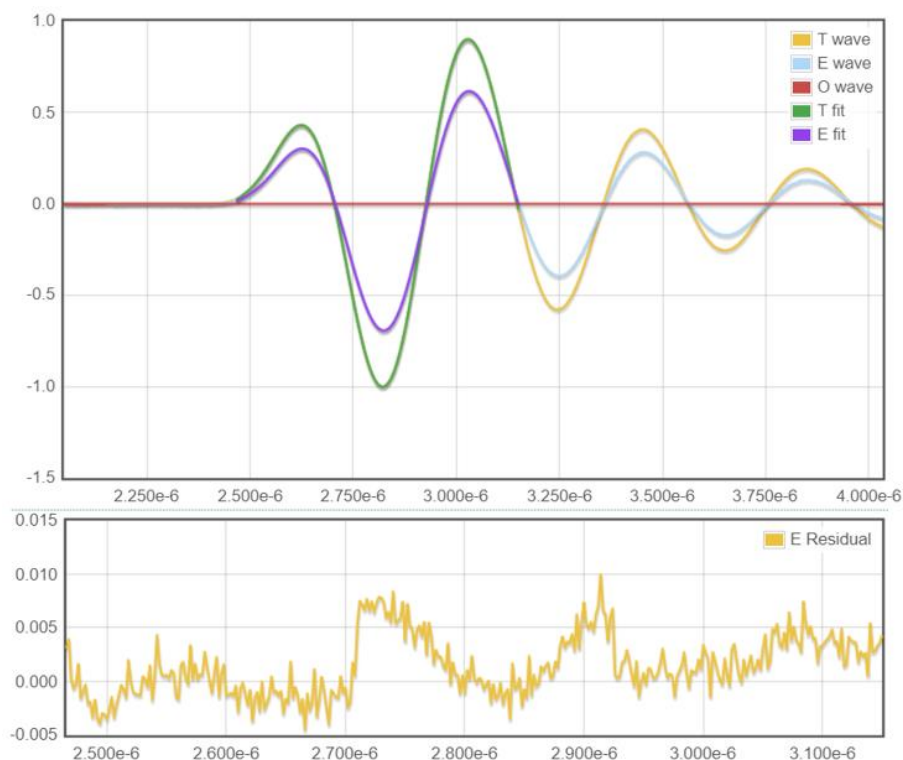


Figura 3.15. Painel superior: deconvolução da onda fotoacústica resultante da excitação a 685 nm da bacterioclorina LUZ11, através da onda da referência (azuleno) e corrigida com a onda do solvente (etanol). Painel inferior: resíduos do ajuste à onda E.

O tempo de vida das frações de libertação de calor foi fixado: $\tau_1=1$ ns e $\tau_2=216$ ns (valor tabelado do tempo de vida do estado tripleto da LUZ11¹⁰). O ajuste apresenta um resíduo relativamente baixo, indicativo de um bom ajuste.

Os valores de ϕ_1 foram agrupados num gráfico em função da intensidade do laser (figura 3.16) e foi feita a extrapolação para a intensidade de energia zero do valor de ϕ_1 .

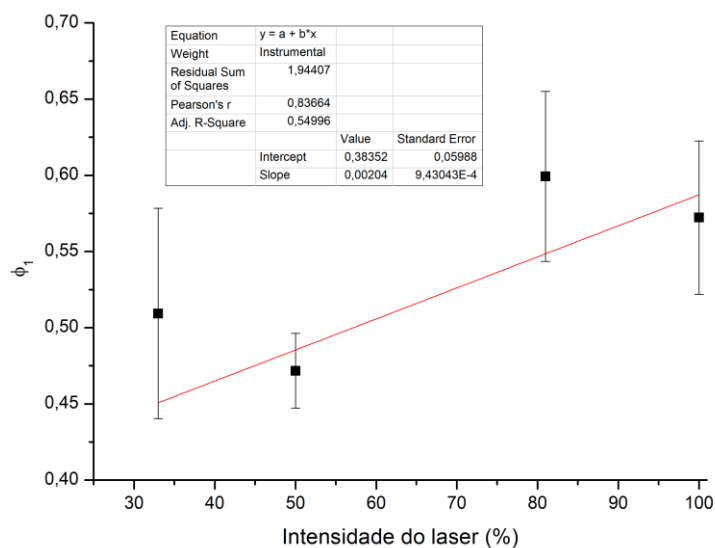


Figura 3.16. Gráfico dos valores de ϕ_1 em função da intensidade do laser, com ajuste linear.

O elevado erro associado a cada intensidade do laser pode ter ocorrido por um erro experimental ou por flutuações da energia do laser ao longo da aquisição. Os valores de ϕ_1 não apresentam uma boa linearidade como seria de esperar (fenómeno que também acontece no estudo da LUZ10, subcapítulo 3.3.3) e uma causa possível poderá ser o desgaste dos espelhos de densidade neutra que são utilizados para variar a intensidade do laser. Ainda assim, a resolução da equação 3.4 com o valor extrapolado $\phi_1=0.38\pm 0.06$ e com os valores publicados¹⁰ $\phi_T=0.65$, $\phi_F=0.138$ e $E_{v_{m\acute{a}x}}=38.38$ kcal mol⁻¹, resulta na energia de tripleto $E_T=31.67$ kcal mol⁻¹, valor que excede o intervalo energético definido por Silva *et al*¹⁹.

A média dos valores da segunda libertação de calor resulta em $\phi_2=0.09\pm 0.03$. Este resultado apresenta também um erro significativo e a sua aplicação na equação 3.5, em conjunto com o resultado obtido de energia de tripleto, resulta em $f_{\Delta}^T=0.63$ e posteriormente $\phi_{\Delta}=0.41$ que é concordante com o valor obtido por fosforescência.

Estes dois resultados obtidos não são fidedignos devido ao elevado erro associado e à não-linearidade dos valores de ϕ_1 . O valor obtido para a energia do estado tripleto diverge do valor publicado por Arnaut *et al*¹⁰, 26 ± 2 kcal mol⁻¹, logo não é possível tirar conclusões desta experiência acerca da fração de estado tripleto que sofre *quenching* pelo oxigénio, dando origem a oxigénio singuleto (f_{Δ}^T).

3.3.5 Calorimetria Fotoacústica em Água

As soluções de P10 e LUZ10 foram preparadas em água milli-Q e a absorção foi ajustada a 0.6 no comprimento de onda de excitação 355 nm. Foi também preparada uma solução de Bromocresol purple (referência) com a mesma absorção a 355 nm. As ondas fotoacústicas obtidas encontram-se na figura 3.17.

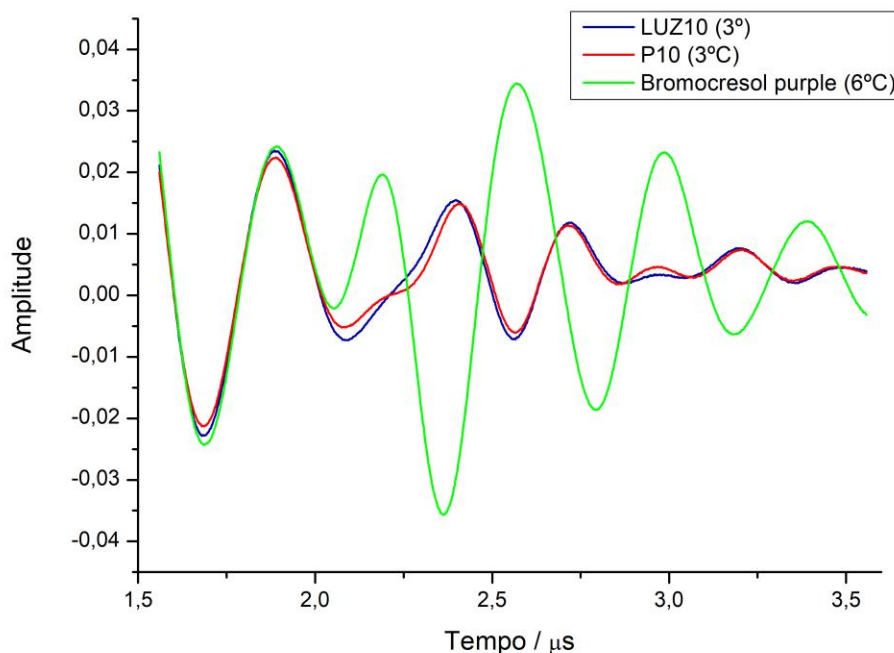


Figura 3.17. Ondas fotoacústicas resultantes da excitação a 355 nm de Bromocresol *purple* a 6°C (verde), LUZ10 a 3°C (azul) e P10 a 3°C (vermelho), em água mili-Q.

Nas ondas apresentadas, existe contaminação do sinal até, aos dois microssegundos, sensivelmente, resultante da má eficiência do espelho dicróico em refletir o comprimento de onda 355 nm.

Esta experiência foi realizada com intuito de detetar a formação de iões (como o anião superóxido) através de reações de tipo I. A formação de iões em água é seguida da solvatação dos mesmos, o que pode provocar contração ou expansão do solvente, que resulta numa onda acústica se a solução estiver confinada. Era esperada uma diferença significativa nas ondas geradas pela LUZ10 e P10, visto que, devido ao potencial de oxidação, as reações de formação de iões (tipo I) seriam pouco prováveis de ocorrer através da excitação da P10. Porém, as ondas adquiridas não apresentam

diferenças significativas entre elas, mas verifica-se diferença de fase em relação à onda da referência fotoacústica (onda gerada apenas por libertação de calor para a água), o que pode corresponder a variação do volume estrutural resultante do relaxamento do estado tripleto.

3.4 Fotólise por Relâmpago

Para as experiências de fotólise por relâmpago, as soluções dos fotossensibilizadores foram preparadas em etanol, com a absorção ajustada a 0.3 no comprimento de onda de excitação 355 nm. A variação de densidade ótica (ΔOD) ou absorção (ΔA) foi medida na gama 300-800 nm.

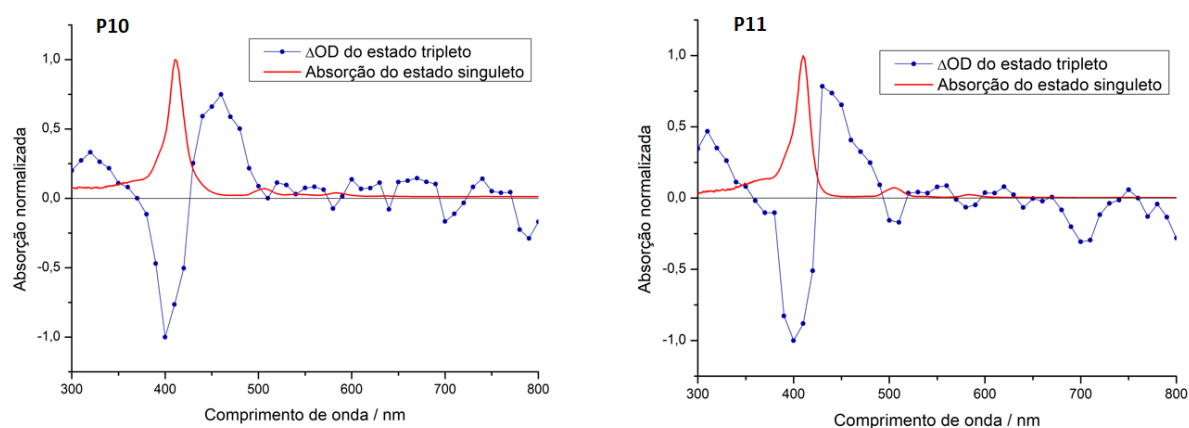


Figura 3.18. Sobreposição dos espectros normalizados de absorção de singuleto e absorção transiente da P10 (esquerda) e P11 (direita) em etanol.

Nos espectros de absorção transiente, as bandas positivas correspondem à absorção do estado tripleto T_1 para um estado tripleto T_n . As bandas negativas resultam da depleção do estado fundamental aquando da absorção.²¹ Nos espectros das porfirinas estudadas (figura 3.18), as bandas positivas encontram-se nos intervalos de comprimento de onda 300-350 e 430-490 nm.

A figura 3.19 mostra a sobreposição dos espectros de absorção transiente e absorção do estado singuleto das bacterioclorinas LUZ10 e LUZ11.

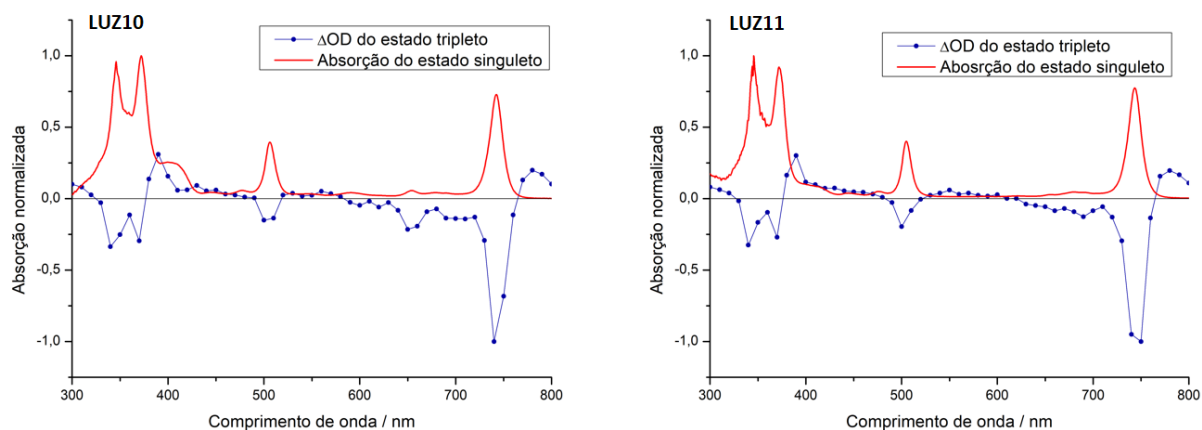


Figura 3.19. Sobreposição dos espectros normalizados de absorção de singuleto e absorção transiente da LUZ10 (esquerda) e LUZ11 (direita) em etanol.

Nas bacterioclorinas estudadas, as bandas correspondentes à absorção transiente-transiente mais significativas ocorrem na zona 380-410 e 770-800 nm.

O tempo de vida do estado tripleto foi obtido através do ajuste exponencial dos decaimentos em vários comprimentos de onda (figura 3.20).

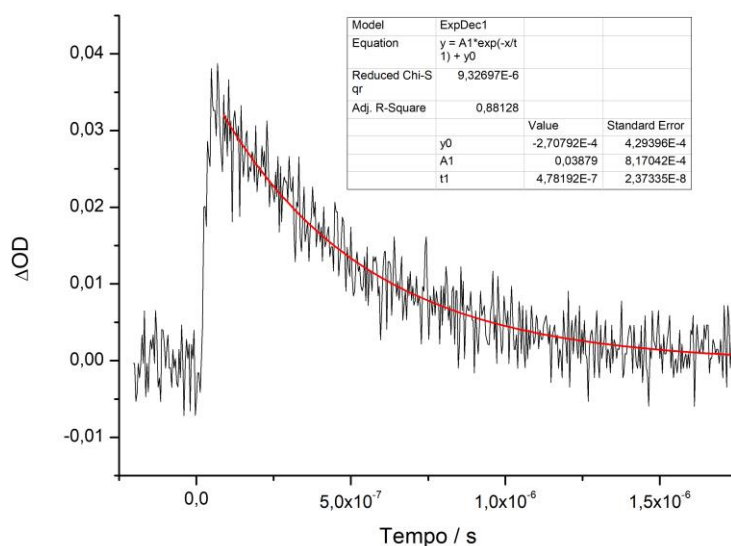


Figura 3.20. Exemplo de um decaimento obtido por fotólise por relâmpago com excitação a 430 nm da porfirina P11 em etanol, com ajuste exponencial.

Os valores finais de tempo de vida do estado tripleto foram obtidos a partir da média de três experiências independentes e foram agrupados na tabela 3.4.

Fotossensibilizadores	Tempo de vida do tripleto (τ_T) / ns
P10	633 \pm 47
P11	461 \pm 52
LUZ10	285 \pm 7
LUZ11	253 \pm 41

Tabela 3.4. Tempo de vida dos estados tripletos em etanol dos fotossensibilizadores estudados, como média de três experiências independentes.

O tempo de vida do estado tripleto obtido para a LUZ10 está de acordo com o resultado obtido por Luz⁹ (289 ns), e o obtido para a LUZ11 também está de acordo com o publicado por Arnaut *et al*¹⁰ (216 ns). Por outro lado, o tempo de vida obtido para a P11 está um pouco diferente do valor publicado (389 ns)¹⁰ mas está dentro do erro associado.

Os tempos de vida do estado tripleto das porfirinas são significativamente maiores que os tempos de vida do estado tripleto das bacterioclorinas, o que significa que o estado tripleto das bacterioclorinas sofre mais rapidamente *quenching* pelo oxigênio. Porém, o rendimento quântico de oxigênio singuleto é superior nas porfirinas, o que implica a existência significativa de mecanismos de transferência de carga (reações de tipo I) no relaxamento do estado tripleto das bacterioclorinas.

3.5 Coeficiente de Absortividade Molar do Tripleto

Para o cálculo do coeficiente de absortividade molar do tripleto (ϵ_T) das porfirinas, inicialmente foi calculado o coeficiente de absortividade molar do estado singuleto (ϵ) para o comprimento de onda correspondente à banda Soret (410 nm). Os valores de ϵ foram obtidos com recurso à lei de Beer-Lambert (equação 2.2). Os gráficos com o valor de absorção a 410 nm em função da concentração permitem calcular o declive da reta resultante do ajuste linear, que corresponde ao valor de ϵ para o comprimento de onda 410 nm (figura 3.21).

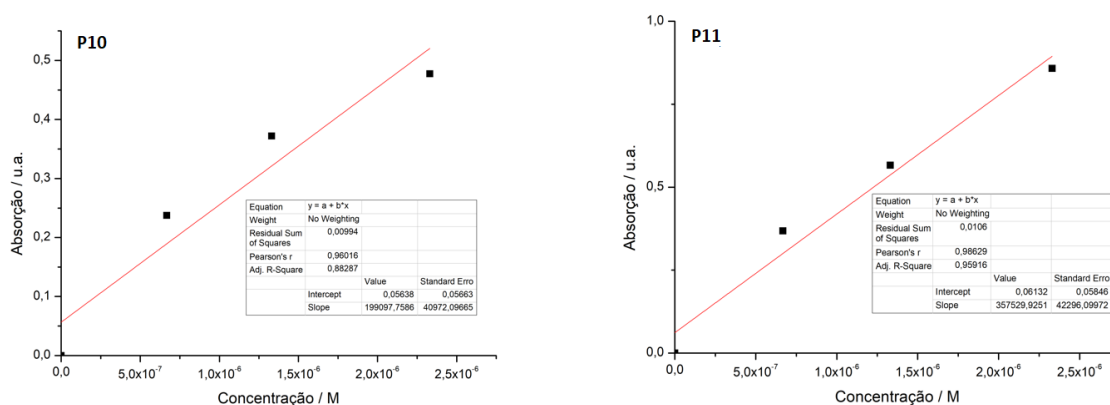


Figura 3.21. Gráficos de absorção a 410 nm em função da concentração, com ajuste linear, para as porfirinas P10 (esquerda) e P11 (direita) em etanol.

Os coeficientes de absorvidade molar obtidos foram $1.99 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a P10 e $3.58 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a P11. A porfirina P10 apresenta um ϵ relativamente baixo e é possível observar no gráfico a saturação da solução com o aumento da concentração. Este resultado é mais uma evidência da ocorrência de agregação deste fotossensibilizador quando o solvente utilizado é etanol.

Para calcular ϵ_T , foi feita mais uma experiência de fotólise por relâmpago, mas avaliando apenas o intervalo de comprimentos de onda de interesse (300-550 nm), com maior resolução (medições feitas em intervalos de 5 nm). Para tal foram preparadas soluções dos fotossensibilizadores em etanol com a absorção ajustada a 0.3 no comprimento de onda de excitação 355 nm.

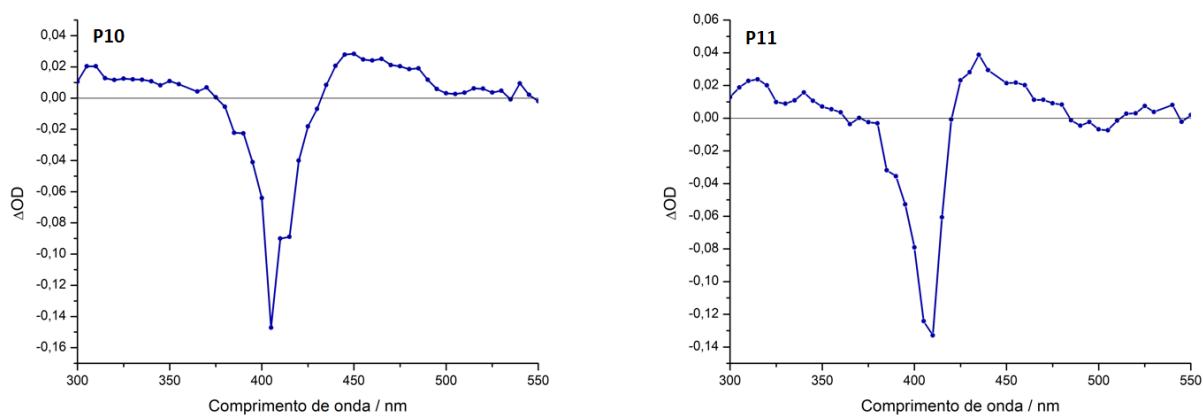


Figura 3.22. Espectros de absorção transiente com excitação a 355 nm das porfirinas P10 (esquerda) e P11 (direita) em etanol.

Dos espectros de absorção transiente obtidos é possível calcular o coeficiente de absorvidade molar do tripleto, através da equação 2.1 (tabela 3.5).

Fotossensibilizadores	ΔOD_S	ΔOD_T	$\epsilon_T \times 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$
P10	0.09	0.028	62.6
P11	0.132	0.039	104

Tabela 3.5. Variação de densidade ótica e coeficiente de absorvidade molar do tripleto para as porfirinas P10 e P11 em etanol.

Os valores de ϵ_T e ΔOD_T apresentados na tabela 3.5 correspondem ao comprimento de onda do máximo da banda positiva obtida na gama 430-490 nm (435 nm para a P10 e 450 nm para a P11). O valor de ΔOD_S foi obtido no comprimento de onda 410 nm. Este resultado é útil pois permite obter o rendimento quântico do estado tripleto por comparação com a benzofenona.^{22,23}

3.6 Referências

- (1) Arnaut, L. G. Design of Porphyrin-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Inorg. Chem.* **2011**, *63*, 187–233.
- (2) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Macyk, W.; Stochel, G. New Hybrid Materials Based on Halogenated Metalloporphyrins for Enhanced Visible Light Photocatalysis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (113), 93252–93261.
- (3) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Stochel, G. Towards Tuning PDT Relevant Photosensitizer Properties: Comparative Study for the Free and Zn²⁺-coordinated Meso-Tetrakis[2,6-Difluoro-5-(N-Methylsulfamoyl)Phenyl]Porphyrin. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (17–18), 3116–3134.
- (4) Pucelik, B.; Paczyński, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. *PLoS One* **2017**, *12* (10), 1–22.
- (5) Chandrashekar, T. K. Optical and Electron Spin Resonance Study of Cation and Cation-Crown Ether Induced Dimerization of Tetrakis (4-Sulfonatophenyl) Porphyrin. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (4), 4326–4332.
- (6) Sharma, S. K.; Kraymer, M.; Sperandio, F. F.; Huang, L.; Huang, Y.-Y.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. Synthesis and Evaluation of Cationic Bacteriochlorin Amphiphiles with Effective in Vitro Photodynamic Activity against Cancer Cells at Low Nanomolar Concentration. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2013**, *17* (01n02), 73–85.
- (7) Huang, Y.-Y.; Balasubramanian, T.; Yang, E.; Luo, D.; Diers, J. R.; Bocian, D. F.; Lindsey, J. S.; Holten, D.; Hamblin, M. R. Stable Synthetic Bacteriochlorins for Photodynamic Therapy: Role of Dicyano Peripheral Groups, Central Metal Substitution (2H, Zn, Pd), and Cremophor EL Delivery. *ChemMedChem* **2012**, *7* (12), 2155–2167.
- (8) Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Gonc, N. P. F.; Sa, F. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, G. Ultrafast Dynamics of Manganese (III), Manganese (II), and Free-Base Bacteriochlorin : Is There Time for Photochemistry ? *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (5), 2677–2689.
- (9) Luz, A. F. S. 5,10,15,20-Tetraakis(2,6-Difluoro-3-Sulfonilfenil)Bacterioclorina: Da Síntese Aos Ensaio Pré-Clínicos, University of Coimbra, 2017.
- (10) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; et al. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346–5357.
- (11) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyra, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G. Engineering of Relevant Photodynamic Processes through Structural Modifications of Metallotetrapyrrolic Photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67–101.
- (12) Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen O₂(¹Δ_g) Sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1994**, *79* (1–2), 11–17.
- (13) Merkel, P. B.; Kearns, D. R. Radiationless Decay of Singlet Molecular Oxygen in Solution. An Experimental and Theoretical Study of Electronic-to-Vibrational Energy Transfer. *J. Am. Chem.* **1972**, *94* (21), 7244–7253.
- (14) Salokhiddinov, K. I.; Byteva, I. M.; Gurinovich, G. P. Lifetime of Singlet Oxygen in Various Solvents. *J. Appl. Spectrosc.* **1981**, *34* (5), 561–564.
- (15) 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.; Dąbrowski, J. M.; Formosinho, S. J.; et al. Synthesis and Photophysical

- Characterization of a Library of Photostable Halogenated Bacteriochlorins: An Access to near Infrared Chemistry. *Tetrahedron* **2010**, *66* (49), 9545–9551.
- (16) Abdel-Shafi, A. A.; Wilkinson, F. Charge Transfer Effects on the Efficiency of Singlet Oxygen Production Following Oxygen Quenching of Excited Singlet and Triplet States of Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (24), 5747–5757.
- (17) Wilkinson, F. Quenching of Electronically Excited States by Molecular Oxygen in Fluid Solution. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69* (4), 851–856.
- (18) Schaberle, F. A.; Nunes, R. M. D.; Barroso, M.; Serpa, C.; Arnaut, L. G. Analytical Solution for Time-Resolved Photoacoustic Calorimetry Data and Applications to Two Typical Photoreactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9* (6), 812–822.
- (19) Silva, E. F. F.; Serpa, C.; Dąbrowski, J. M.; Monteiro, C. J. P.; Formosinho, S. J.; Stochel, G.; Urbanska, K.; Simões, S.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G. Mechanisms of Singlet-Oxygen and Superoxide-Ion Generation by Porphyrins and Bacteriochlorins and Their Implications in Photodynamic Therapy. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (30), 9273–9286.
- (20) Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Rocha Gonsalves, A. M. D. A.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. Photoacoustic Measurements of Porphyrin Triplet-State Quantum Yields and Singlet-Oxygen Efficiencies. *Chem. - A Eur. J.* **1998**, *4* (11), 2299–2307.
- (21) Berera, R.; van Grondelle, R.; Kennis, J. T. M. Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy: Principles and Application to Photosynthetic Systems. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 105–118.
- (22) Carmichael, I.; Hug, G. L. Triplet-Triplet Absorption Spectra of Organic Molecules in Condensed Phases. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15* (1), 1–250.
- (23) Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Monteiro, C. J. P.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. The Challenging Combination of Intense Fluorescence and High Singlet Oxygen Quantum Yield in Photostable Chlorins-a Contribution to Theranostics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (7), 1187–1192.

Capítulo 4

Conclusão

Ao longo desta dissertação, foram utilizadas diversas técnicas e métodos de determinação de propriedades fotofísicas e fotoquímicas, de maneira a estudar estas propriedades num conjunto de porfirinas e bacterioclorinas difluoradas.

A porfirina P10 (F₂POH) e a bacterioclorina derivada, LUZ10 (F₂BOH), têm na sua estrutura um grupo sulfonil que lhes confere solubilidade em água.^{1,2} Porém, a dissolução destes fotossensibilizadores em etanol revelou-se extremamente difícil, verificando-se alguns fenómenos de agregação, como por exemplo o alargamento das bandas Q no espectro de absorção UV-visível da porfirina P10³, e a saturação visível no gráfico absorção vs concentração aquando o cálculo do coeficiente de absortividade molar da P10. Estes fenómenos podem ser responsáveis pela contaminação de alguns resultados obtidos. Por outro lado, a porfirina P11 (F₂PMet) e a bacterioclorina derivada LUZ11 (F₂BMet) apresentam um grupo metilsulfonamida na sua estrutura que lhe confere um carácter mais hidrofóbico, relativamente aos fotossensibilizadores anteriores.^{4,5}

Dos fotossensibilizadores estudados, a classe das porfirinas apresentou o maior rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto, sendo o maior rendimento obtido pela P10. Esta diferença é esperada, pois nas bacterioclorinas as reações de tipo I (mecanismos de transferência de carga) são competitivas com a formação de oxigénio singuleto (reações de tipo II), o que não acontece nas porfirinas devido ao seu potencial de oxidação relativamente alto.^{6,7} Os baixos valores de rendimento quântico de oxigénio singuleto em conjunto com o, relativamente, curto tempo de vida do estado tripleto e elevada fototoxicidade publicada^{5,8,9}, sugerem que os mecanismos de transferência de carga nas bacterioclorinas estudadas têm um papel significativo nos processos de *quenching* do estado tripleto e na fototoxicidade.

As experiências de calorimetria fotoacústica permitiram calcular o intervalo provável de rendimento quântico do estado tripleto da P10 (0.69-0.75). Apesar da possível agregação, estes valores compreendem o rendimento quântico de tripleto de porfirinas semelhantes, como a P11 ($\phi_T = 0.71$) e a TPP ($\phi_T = 0.73$)⁵. Para a LUZ10, também foi calculado apenas o provável intervalo de rendimento quântico de tripleto (0.69-0.72), que está próximo do publicado para bacterioclorinas semelhantes, como a LUZ11 ($\phi_T = 0.65$).⁵ Para a P11, a calorimetria fotoacústica permitiu fortalecer a ideia de

que as reações de tipo I são pouco prováveis neste tipo de porfirinas e o *quenching* do estado tripleto é realizado essencialmente pela transferência de energia para o oxigénio ($f_{\Delta}^T = 0.99$).

De acordo com Jori¹⁰, um fotossensibilizador ideal deve apresentar uma absorção forte entre 700 e 800 nm com $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\phi_{\Delta} > 0.5$ e $\phi_T \geq 0.7$. As bacterioclorinas estudadas apresentam a banda Q_y entre 742 e 743 nm, com ϵ entre 40 e $140 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e o rendimento quântico do estado tripleto aproxima-se de $0.7^{5,8,9}$ o que vai de acordo com os intervalos definidos. Porém, o valor de rendimento quântico de oxigénio singuleto não atinge o intervalo definido. Por outro lado, as porfirinas estudadas apresentam valores de rendimento quântico de oxigénio singuleto superiores a 0.5 e rendimento quântico do estado tripleto a rondar 0.7^5 , mas não absorvem na região 700-800 nm.

A experiência de calorimetria fotoacústica em água não permitiu tirar conclusões. Porém, a deteção de formação de anião superóxido através de PAC é uma ideia que suscita interesse, dado a natureza económica da técnica. É então necessário, no futuro, uma otimização instrumental do método utilizado, de modo a que seja possível esta deteção dos produtos de reações de tipo I.

No futuro, seria de interesse a determinação dos rendimentos quânticos de formação do estado tripleto através do método de depleção do estado singuleto^{11,12}, utilizando os valores calculados do coeficiente de absorvidade molar do tripleto. Ao obter este rendimento, seria possível o cálculo da energia do estado tripleto da P10 e da LUZ10, através das experiências de calorimetria fotoacústica. Seria também de interesse a realização de experiências de Ressonância Paramagnética Eletrónica (EPR, do inglês *Electronic Paramagnetic Resonance*) de modo a detetar as espécies reativas de oxigénio (ROS) como o anião superóxido e o radical hidroxilo. O uso de sondas fluorescentes específicas para a deteção de ROS é outra técnica que poderá ser interessante utilizar para estudar a evolução do sistema após a fotoestimulação.

4.1 Referências

- (1) Pucelik, B.; Paczyński, R.; Dubin, G.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Dąbrowski, J. M. Properties of Halogenated and Sulfonated Porphyrins Relevant for the Selection of Photosensitizers in Anticancer and Antimicrobial Therapies. *PLoS One* **2017**, *12* (10), 1–22.
- (2) 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.; Dąbrowski, J. M.; Formosinho, S. J.; et al. Synthesis and Photophysical Characterization of a Library of Photostable Halogenated Bacteriochlorins: An Access to near Infrared Chemistry. *Tetrahedron* **2010**, *66* (49), 9545–9551.
- (3) Nyokong, T.; Ahsen, V. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*; 2012.
- (4) Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Stochel, G. Towards Tuning PDT Relevant Photosensitizer Properties: Comparative Study for the Free and Zn²⁺-coordinated Meso-Tetrakis[2,6-Difluoro-5-(N-Methylsulfamoyl)Phenyl]Porphyrin. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (17–18), 3116–3134.
- (5) Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbańska, K.; Stochel, G.; et al. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5346–5357.
- (6) Wilkinson, F. Quenching of Electronically Excited States by Molecular Oxygen in Fluid Solution. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69* (4), 851–856.
- (7) Abdel-Shafi, A. A.; Wilkinson, F. Charge Transfer Effects on the Efficiency of Singlet Oxygen Production Following Oxygen Quenching of Excited Singlet and Triplet States of Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (24), 5747–5757.
- (8) Luz, A. F. S. 5,10,15,20-Tetraakis(2,6-Difluoro-3-Sulfonilfenil)Bacterioclorina: Da Síntese Aos Ensaios Pré-Clínicos, University of Coimbra, 2017.
- (9) Luz, A. F. S.; Pucelik, B.; Pereira, M. M.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Translating Phototherapeutic Indices from in Vitro to in Vivo Photodynamic Therapy with Bacteriochlorins. *Lasers Surg. Med.* **2018**, *50* (5), 451–459.
- (10) Lenci, F.; Horspool, W. *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; 2004.
- (11) Carmichael, I.; Hug, G. L. Triplet-Triplet Absorption Spectra of Organic Molecules in Condensed Phases. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1986**, *15* (1), 1–250.
- (12) Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Monteiro, C. J. P.; Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G. The Challenging Combination of Intense Fluorescence and High Singlet Oxygen Quantum Yield in Photostable Chlorins-a Contribution to Theranostics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (7), 1187–1192.