



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Sofia de Sousa Teixeira

**DESENVOLVIMENTO DE AGENTES DE CONTRASTE
FLUORADOS PARA IMAGIOLOGIA DE ^{19}F MRI E
PET**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, orientada pela
Doutora Sara Martinho Almeida Pinto e apresentada ao Departamento de
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

DESENVOLVIMENTO DE AGENTES DE CONTRASTE FLUORADOS PARA IMAGIOLOGIA DE ^{19}F MRI E PET

Daniela Sofia de Sousa Teixeira

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, orientada pela
Doutora Sara Martinho Almeida Pinto e apresentada ao Departamento de
Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



"I was taught that the way of progress
was neither swift nor easy."

Marie Skłodowska Curie

Agradecimentos

O caminho percorrido ao longo destes anos permitiu-me adquirir conhecimento nas mais variadas áreas, além de me proporcionar um enorme crescimento tanto a nível profissional como pessoal.

À Professora Doutora Mariette Pereira, agradeço a possibilidade de desenvolver o trabalho conducente à escrita desta dissertação no seu grupo de investigação, por toda a disponibilidade, apoio e por todos os conhecimentos transmitidos. Agradeço ainda pela oportunidade de realizar parte desta dissertação em diferentes laboratórios, o que sem dúvida contribuiu significativamente para o meu crescimento.

À Doutora Sara Pinto, a minha orientadora, agradeço a orientação científica, disponibilidade, apoio e acompanhamento ao longo deste ano. Agradeço ainda a constante confiança que sempre demonstrou em mim. Obrigada por teres acreditado em mim e nas minhas capacidades mesmo quando tudo parecia não correr bem.

Ao Mestre Pedro Cruz do serviço de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra, agradeço pela colaboração nos estudos realizados a nível de ^{19}F RMN, por todo o conhecimento científico e por toda a paciência em responder a todas as minhas questões.

Ao Professor Doutor Antero Abrunhosa do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS) pela possibilidade de realizar os estudos de marcação nas suas instalações. Um agradecimento especial à Ângela Neves e à Vanessa Tomé pela constante disponibilidade para a realização dos estudos de radiomarkação. Obrigada por toda a ajuda a nível de HPLC e pelo espírito crítico para resolver os diferentes problemas que surgiram ao longo dos testes de radiomarkação.

À Professora Doutora Maria Paula Marques da Unidade de I&D Química Física Molecular, agradeço a possibilidade de desenvolver parte do meu trabalho no seu grupo de investigação. Um agradecimento em especial à Clara Martins pela realização dos testes *in vitro* apresentados nesta dissertação, pela possibilidade de acompanhar os mesmos e pela constante disponibilidade para o esclarecimento de todas as dúvidas.

À Doutora Sandra Nunes do Grupo de Macromoléculas, Coloides e Fotoquímica do Centro de Química de Coimbra, pela realização dos cálculos teóricos descritos nesta dissertação.

A todos os funcionários do Departamento de Química da FCTUC, em especial à D. Lurdes, ao Sr. Jorge e ao Sr. António Manuel, por todos os esforços para nos proporcionarem as melhores condições de trabalho, bem como pela constante boa disposição.

A todos os meus colegas do Grupo de Catálise e Química Fina, Mário Calvete, Rui Carrilho, Fábio Rodrigues, Rafael Aroso, Giusi Piccirillo, Andreia Gonzalez, Zoé Moreira, Alexandre Felgueiras, Iúri Tavares, Diana Marques, Vitaliy Masliy, Madalena Silva, Inês Cruz, Carolina Domingos, Carolina Neto e Yaroslav Hryhoryev, obrigada por todos os bons momentos passados e pela boa disposição. Contudo, devo destacar determinadas pessoas, sem as quais o desenvolvimento desta dissertação teria sido mais difícil.

À Andreia Gonzalez, por me ter recebido de braços abertos desde o meu primeiro dia e por ter acompanhado os meus primeiros passos no laboratório.

À Guisi, por ter sempre uma palavra de incentivo, por todos os discursos motivacionais e por ser dos melhores corações que já conheci.

Ao Rafael, por tudo! Obrigada por me “adotares” como tutoranda, por todo o apoio, conhecimento partilhado, incentivo, constante ânimo, palavras certas e por acreditares sempre em mim, mesmo quando eu tinha um problema e já parecia o fim do mundo. Sem dúvida que esta dinâmica que se estabeleceu entre nós, e as tuas perguntas sem fim, contribuíram significativamente para o meu crescimento. Prometo continuar a seguir fielmente todos os teus métodos *express* maravilha.

À Carolina, obrigada por todas as conversas, por teres sempre uma palavra amiga e por todos os desabafos e frustrações partilhadas.

À Diana, um agradecimento especial por ser a minha companhia diária, nos bons e maus momentos, pela amizade que se estabeleceu entre nós e por ser a companheira madrugadora. Sei que independentemente do caminho que seguirmos, esta amizade é para manter.

À Andreia da Costa Tuna, por ter sido uma constante ao longo destes dois anos de mestrado. Obrigada por toda a partilha, desabafos e por tentares tirar sempre o melhor mesmo das piores situações. Agradeço ainda a tua boa disposição contagiante e os inúmeros fins de semana de estudo e laser que partilhamos. Sem dúvida que este ano teria sido muito mais difícil sem a tua constante presença.

Ao grupo das seis, Ana, Anita, Bea, Bruna e Marla, agradeço pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas.

À Raquel, a companheira de casa de anos, por compreenderes a minha falta de paciência ao final do dia e por todas as vezes em que tiveste de aturar o meu mau feitio.

Ao Diogo Barradas, agradeço por sempre me ter feito acreditar em mim e no meu potencial desde a licenciatura. Pela cumplicidade, que sem dúvida tornaram estes 5 anos mais fáceis. Agradeço ainda a infindável paciência para todas as pesagens.

À minha família de praxe, em especial à Elisa e às minhas (Inês)², pela amizade bonita que temos. Obrigada por serem sempre um porto seguro!

Ao Edgar e à Lili, os fiéis amigos, por compreenderem todas as minhas ausências e nunca me cobrarem por isso. Pela contínua amizade, independentemente da distância ou da divergência dos nossos percursos.

Por fim, e porque dizem que o melhor fica para o fim, um agradecimento especial à minha família, por fazerem de mim tudo o que sou hoje. Aos meus pais, agradeço por sempre me permitirem seguir os meus sonhos, mesmo eu não sabendo quais eram, pelo apoio incondicional e por compreenderem as minhas (muitas) ausências. Ao meu irmão, agradeço por desempenhar o papel de irmão mais velho como ninguém.

Todos contribuíram para esta conquista e por isso, a todos vós, o meu mais sincero
Muito Obrigada.

Daniela Teixeira

Índice

Índice	I
Abreviaturas e Símbolos	V
Resumo	ix
Abstract	xi
Nomenclatura	xiii
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Métodos de síntese de <i>meso</i> -arilporfirinas	3
1.2 Agentes de contraste para Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI)	7
1.2.1 Agentes de contraste para Imagiologia por Ressonância Magnética de Flúor (¹⁹ F MRI)	11
1.3 Tomografia por emissão de positrões (PET)	14
1.3.1 Radioisótopo de Carbono-11	16
1.3.2 Radiofármacos para PET na detecção de tumores	17
1.4 Proposta de trabalho	22
1.5 Referências	23
Capítulo 2: Síntese e caracterização estrutural de <i>meso</i>-arilporfirinas fluoradas e respectivos complexos metálicos	35
2.1 Síntese de porfirinas mistas fluoradas e respectivos complexos de manganês	36
2.2 Tempos de relaxação	52
2.3 Coeficiente de partição	55

2.4 Caracterização fotofísica das porfirinas sintetizadas e dos respectivos complexos metálicos	58
2.4.1 Espectroscopia de UV-Visível	58
2.4.2 Espectroscopia de fluorescência	64
2.5 Conclusões	67
2.6 Referências	69
Capítulo 3: Desenvolvimento de potenciais agentes de contraste para Tomografia por Emissão de Positrões (PET)	75
3.1 Síntese de padrões para HPLC derivados de imidazolil-porfirinas catiónicas	75
3.1.1 Otimização do processo de cationização a frio	75
3.2 Estudos preliminares de avaliação do padrão Di-iodeto de [5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina] (3.1)	80
3.2.1 Coeficiente de partição	80
3.2.2 Estudos de citotoxicidade	81
3.3 Metodologia da marcação	84
3.4 Otimização das condições de HPLC para separação dos padrões	86
3.5 Estudos de radiomarcacão com carbono-11	92
3.6 Conclusões	95
3.7 Referências	97
Capítulo 4: Conclusões finais e perspectivas futuras	99
Capítulo 5: Experimental	103
5.1 Solventes e reagentes	103

5.2 Instrumentação e metodologia	103
5.3 Síntese e caracterização estrutural dos compostos	110
5.3.1 Síntese de <i>meso</i> -arilporfirinas	110
5.3.2 Complexação de <i>meso</i> -arilporfirinas com manganês	114
5.3.3 Alquilação de <i>meso</i> -arilporfirinas	117
5.4 Radiomarcção com carbono-11	118
5.4.1 Protocolo geral de radiomarcção com ^{11}C	118
5.5 Referências	119

Abreviaturas e Siglas

ε	Coeficiente de absorvidade molar
η	Rendimento
λ	Comprimento de onda
δ	Desvio químico
β^+	Positrão
β^-	Emissão beta
ϕ_F	Rendimento quântico de fluorescência
$^1\text{H MRI}$	Imagiologia de ressonância magnética de ^1H (do inglês: “ <i>Proton magnetic resonance imaging</i> ”)
$^1\text{H RMN}$	Ressonância magnética nuclear de ^1H (do inglês: “ <i>Proton nuclear magnetic resonance</i> ”)
$^{19}\text{F MRI}$	Imagiologia de ressonância magnética de ^{19}F (do inglês: “ <i>Fluorine-19 magnetic resonance imaging</i> ”)
$^{19}\text{F RMN}$	Ressonância magnética nuclear de ^{19}F (do inglês: “ <i>Fluorine-19 nuclear magnetic resonance</i> ”)
$[^{18}\text{F}] \text{FDG}$	^{18}F -fluorodesoxiglicose
$[^{11}\text{C}] \text{MET}$	L-[metil- ^{11}C]metionina
$[^{68}\text{Ga}]$ DOTA-NOC	^{68}Ga -radiomarcado[1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético]-1-Nal-octreotida
A	Absorvância
ACs	Agentes de contraste (do inglês: “ <i>Contrast agents</i> ”)
CP	Coeficiente de partição octanol-água
CPMJ	<i>Carr–Purcell–Meiboom–Gill</i>
CT	Tomografia computadorizada (do inglês: “ <i>Computed tomography</i> ”)
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto

DDQ	2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DFT	Teoria do funcional da densidade (do inglês: <i>"Density functional theory"</i>)
DiIMIDiCF ₃ P	5,15-bis(4-trifluorometil)-10,20-bis(2-metilimidazole)porfirina
DiIMIDiCF ₃ PCat	Di-iodeto de [5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina]
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12 ham</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DOTA	<i>2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid</i>
EC	Captura de elétrões (do inglês: <i>"Electron capture"</i>)
EI	Impacto eletrônico (do inglês: <i>"Electron impact"</i>)
ESI	Ionização por electrospray (do inglês: <i>"Electrospray ionization"</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de elevada performance (do inglês: <i>"High performance liquid chromatography"</i>)
HOMO	Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês: <i>"Highest occupied molecular orbital"</i>)
ICNAS	Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês: <i>"International union of pure and applied chemistry"</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LORs	Linhas de resposta (do inglês: <i>"Line of response"</i>)
LUMO	Orbital molecular desocupada de menor energia (do inglês: <i>"Lowest unoccupied molecular orbital"</i>)
[M] ⁺	ião molecular
[M+H] ⁺	ião molecular protonado
m	Multiplete

m/z	Razão massa/carga
MLCT	Transferência de carga metal-ligando (do inglês <i>“Metal to ligand charge-transfer”</i>)
Mn-DPDP	Mangafodipir
Mn(III)- DiIMiDiCF ₃ P	Acetato de 5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirinato de manganês (III)
Mn(III)- DiIMiDiCF ₃ PCat	Di-iodeto de [acetato de 5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de manganês (III)]
Mn(III)-TPP- <i>p</i> - CF ₃	Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirinato de manganês (III)
Mn(III)-TPP- <i>o</i> -F	Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirinato de manganês (III)
Mn(III)-TPyP- CF ₃	Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(6-(trifluorometil)piridin-3-il)porfirinato de manganês (III)
MRI	Imagiologia de Ressonância Magnética (do inglês: <i>“Magnetic Resonance Imaging”</i>)
MS	Espectroscopia de massa
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MW	Micro-ondas (do inglês <i>“Microwave”</i>)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês: <i>“Nicotinamide adenine dinucleotide”</i>)
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês: <i>“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”</i>)
NSF	Fibrose sistêmica nefrogênica (do inglês: <i>“Nephrogenic systemic fibrosis”</i>)
OAc	Grupo acetato
ODS	Objetivos do desenvolvimento sustentável
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>“Phosphate buffered saline”</i>)
PET	Tomografia por emissão de positrões (do inglês: <i>“Positron emission tomography”</i>)
ppm	Partes por milhão

q	Quarteto
r_1	Velocidade de relaxação longitudinal
r_2	Velocidade de relaxação transversal
RF	Radiofrequência
RIF	Fibrossarcoma induzidos por radiação (do inglês: " <i>Radiation-induced fibrosarcoma</i> ")
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês: " <i>Nuclear magnetic resonance</i> ")
s	Singleto
SPECT	Tomografia computacional de emissão de fóton único (do inglês: " <i>Single-photon emission computed tomography</i> ")
T	Transmitância
t	Tripleto
T_1	Tempo de relaxação longitudinal
T_2	Tempo de relaxação transversal
t_R	Tempo de retenção
TriIMMCF ₃ P	5-(4-(trifluorometil)fenil)-10,15,20-tris(1-metilimidazole-2-il)porfirina
TF	Transformada de Fourier
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês: " <i>Thin layer chromatography</i> ")
TOF	Tempo de voo (do inglês: " <i>Time of flight</i> ")
TPP	5,10,15,20-tetrafenilporfirina
TPP- <i>o</i> -F	5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirina
TPP- <i>p</i> -CF ₃	5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirina
TPyP-CF ₃	5,10,15,20-Tetraquis(6-(trifluorometil)piridin-3-il)porfirina
US	Ultrassons
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Resumo

A detecção cada vez mais precoce de diversas patologias poderá contribuir para o combate das mesmas. Para tal, o desenvolvimento de agentes de contraste para aplicação nas mais variadas técnicas de imagem é fundamental.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação centrou-se no desenvolvimento de potenciais agentes de contraste e a sua avaliação preliminar para aplicação em Imagiologia por Ressonância Magnética de Flúor (^{19}F MRI) e Tomografia por Emissão de Positrões (PET).

No **Capítulo 1** apresenta-se uma revisão da literatura direcionada para as diferentes temáticas abordadas ao longo desta dissertação, focando os métodos de síntese de porfirinas e os agentes de contraste para ^{19}F MRI e PET, com destaque nos agentes de contraste do tipo macrociclo tetrapirrólico.

No **Capítulo 2** apresenta-se a síntese de *meso*-arilporfirinas fluoradas, sendo estas sintetizadas através de pequenas alterações do método do nitrobenzeno tendo como objetivo tornar as reações mais sustentáveis. Neste capítulo, é também descrita a síntese dos respetivos complexos metálicos, com manganês, utilizando diferentes fontes de aquecimento (aquecimento convencional e irradiação micro-ondas (MW)). De entre estas, a utilização de irradiação MW demonstrou ser a mais eficiente, permitindo a redução do tempo de reação (de 3 horas para 30 minutos). Tendo todas as porfirinas e respetivos complexos metálicos totalmente caracterizados através de diversas técnicas espectroscópicas, iniciaram-se os estudos de ^{19}F RMN, de forma a avaliar o efeito que a presença do átomo de manganês exerce nos tempos de relaxação do flúor. Assim, iniciou-se o estudo adquirindo os respetivos espetros de ^{19}F RMN onde se observou que para o complexo de manganês da porfirina 5,10,15,20-tetra(2-fluorofenil) (TPP-*o*-F) ocorria um alargamento do sinal de flúor enquanto para o complexo de manganês da porfirina 5,10,15,20-tetra(4-trifluorometilfenil) (TPP-*p*-CF₃) não se observou esse efeito. Seguidamente, calcularam-se as distâncias entre o átomo paramagnético e os átomos de flúor presentes nos grupos substituintes das porfirinas sintetizadas observando-se que para a porfirina TPP-*o*-F, a distância obtida foi de 5,7 Å e para a porfirina TPP-*p*-CF₃ foi de 9,8 Å. Posteriormente, e para avaliar o efeito real que o manganês exerce no tempo de relaxação de F, determinaram-se os respetivos tempos de relaxação

(porfirinas de base livre e correspondentes complexos metálicos) observando-se uma redução do tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). De salientar que, para o caso da porfirina TPP-*o*-F não foi possível determinar o T_1 e o T_2 uma vez que o efeito do metal foi elevado. Neste capítulo, é ainda apresentada a caracterização fotofísica das porfirinas sintetizadas e também o cálculo do coeficiente de partição para di-iodeto de [acetato de 5,15-bis (4-(trifluorometil)fenil) -10,20-bis (1,3-dimetilimidazol-2-il) porfirinato de manganês (III)].

No **Capítulo 3** apresenta-se a síntese de di-iodeto de [5,15-bis (4-(trifluorometil)fenil) -10,20-bis (1,3-dimetilimidazol-2-il) porfirina], tendo-se otimizado o processo de síntese a frio de modo a simular o processo de radiomarcagem com carbono-11. Antes dos estudos de radiomarcagem foi também determinada a citotoxicidade e o coeficiente de partição da porfirina di-iodeto de [5,15-bis (4-(trifluorometil)fenil) -10,20-bis (1,3-dimetilimidazol-2-il) porfirina]. Neste capítulo são ainda apresentados os estudos de otimização da separação dos compostos em estudo por HPLC assim como os estudos da reação de radiomarcagem com carbono-11, onde se conseguiu obter uma mistura das porfirinas di e mono-radiomarcadas, com uma conversão de 20% cada, após 10 minutos de reação. Efetuou-se também a reação de radiomarcagem, reduzindo o tempo para 1 minuto, observando-se a obtenção de 33% da porfirina mono-radiomarcado e apenas uma quantidade residual de produto di-marcado. Estes resultados de radiomarcagem revelaram-se bastante promissores.

No **Capítulo 4** são descritas as conclusões finais e abertas perspectivas futuras.

Por fim, no **Capítulo 5** são descritos os procedimentos experimentais de síntese das porfirinas e respetivos complexos de manganês, a caracterização dos mesmos e ainda todas as técnicas utilizadas ao longo desta dissertação.

Palavras-chave: Meso-arilporfirinas; Imagiologia Médica; Agente de Contraste (AC); Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI); Flúor; Metaloporfirinas; Manganês (Mn); Tomografia por Emissão de Positrões (PET); Carbono-11 (^{11}C).

Abstract

The early detection of various pathologies may contribute to combating them. To this end, the development of contrast agents for application on the most different imaging techniques is essential.

The work presented in this dissertation is centered on the development of potential contrast agents and their preliminary evaluation for application in Fluorine Magnetic Resonance Imaging (^{19}F MRI) and Positron Emission Tomography (PET).

In **Chapter 1** a literature review is presented, directed to the different topics covered throughout this dissertation, focusing on the methods for porphyrins synthesis and contrast agents for ^{19}F MRI and PET, highlighting the macrocycle tetrapyrrole based contrast agents.

Chapter 2 presents the synthesis of fluorinated *meso*-arylporphyrins, which were synthesized through small modifications of the nitrobenzene method, aiming more sustainable reaction methodologies (conventional heating and microwave irradiation (MW)). Among these, the use of MW irradiation proved to be the most efficient, allowing the reduction of reaction time (from 3 hours to 30 minutes). As all porphyrins and their metal complexes were fully characterized using different spectroscopic techniques, ^{19}F NMR studies proceeded, to assess the effect of the presence of the manganese atom on fluorine relaxation times. Thus, the study began by acquiring the corresponding ^{19}F NMR spectra, where it was observed that the manganese complex of 5,10,15,20-tetra(2-fluorophenyl) porphyrin (TPP-*o*-F) presented a broadening of the fluorine signal, while for the manganese complex of 5,10,15,20-tetra(4-trifluoromethylphenyl) porphyrin (TPP-*p*-CF₃), this effect was not observed. Furthermore, the distances between the paramagnetic atom and the fluorine atoms present in the substituent groups of the synthesized porphyrins were calculated, observing that for porphyrin TPP-*o*-F, the distance obtained was 5.7 Å and for the porphyrin TPP-*p*-CF₃ was 9.8 Å. Subsequently, to evaluate the real effect that manganese exerts on the relaxation time of F, the respective relaxation times (free base porphyrins and corresponding metal complexes) were determined, and a reduction in the longitudinal (T_1) and transversal (T_2) relaxation time were observed. It should be noted that, in the case of TPP-*o*-F porphyrin, it was not possible to determine T_1 and T_2 , since

the effect of the metal was quite pronounced. This chapter also presents the photophysical characterization of the synthesized porphyrins and the calculation of the partition coefficient for di-iodide of manganese (III) 5,15-bis (4-(trifluoromethyl)phenyl)-10,20-bis (1,3-dimethylimidazol-2-yl) porphyrin acetate.

Chapter 3 present the synthesis of di-iodide 5,15-bis (4-(trifluoromethyl)phenyl)-10,20-bis (1,3-dimethylimidazol-2-yl) porphyrin. The cold synthesis process was optimized in order to simulate the process of radiolabeling with carbon-11. Before the radiolabeling studies, the cytotoxicity and partition coefficient of di-iodide 5,15-bis (4-(trifluoromethyl)phenyl)-10,20-bis(1,3-dimethylimidazol-2-yl) porphyrin was determined. This chapter also presents the optimization studies for the HPLC separation of the compounds, as well as studies of the radiolabeling reaction with carbon-11, where a mixture of di and mono-radiolabelled porphyrins was obtained, with a conversion of 20% each, after 10 minutes of reaction. The radiolabeling reaction was also carried out, by reducing the reaction time to 1 minute, observing the obtaining of 33% of the mono-radiolabelled porphyrin and only a residual amount of di-labeled product. These radiolabeling results proved to be quite promising.

In **Chapter 4**, the final conclusions and open future perspectives are described.

Finally, in **Chapter 5**, the experimental procedures for the synthesis of porphyrins and their manganese complexes, their characterization and all the techniques used throughout this dissertation are described.

Keywords: *meso*-Aryl porphyrins; Medical Imaging; Contrast Agent (AC); Magnetic Resonance Imaging (MRI); Fluorine; Metalloporphyrins; Manganese (Mn); Positron Emission Tomography (PET); Carbon-11 (^{11}C).

Nomenclatura

Atualmente, existem dois sistemas de nomenclatura aceites para as porfirinas, um proposto por *Hans Fischer*¹ e outro mais recente proposto pela IUPAC.^{2,3}

O primeiro sistema, denominado de nomenclatura de Fisher, baseia-se na utilização de nomes triviais combinados com um sistema de numeração. Assim, aos 4 anéis do pirrole são atribuídas letras A, B, C, D e os carbonos externos dos anéis pirrólicos são numerados de 1 a 8, sendo estas posições também denominadas por posições β -pirrólicas. Os 4 carbonos das pontes metínicas são designados pelas letras gregas alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ), sendo também designados de carbonos das posições *meso* (Figura I a).¹

Com o crescimento dos estudos da química das porfirinas, este sistema tornou-se ineficiente, levando assim ao desenvolvimento de um novo sistema de nomenclatura sistémica regulamentada pela IUPAC. Neste sistema, todos os átomos de carbono e azoto do macrociclo são numerados de 1 a 24 e os hidrogénios ligados aos átomos de azoto encontram-se no N-21 e N-23, por convenção (Figura I b)).^{3,4} Apesar desta proposta de nomenclatura, as designações *meso* e β -pirrólicas continuam a ser utilizadas atualmente.

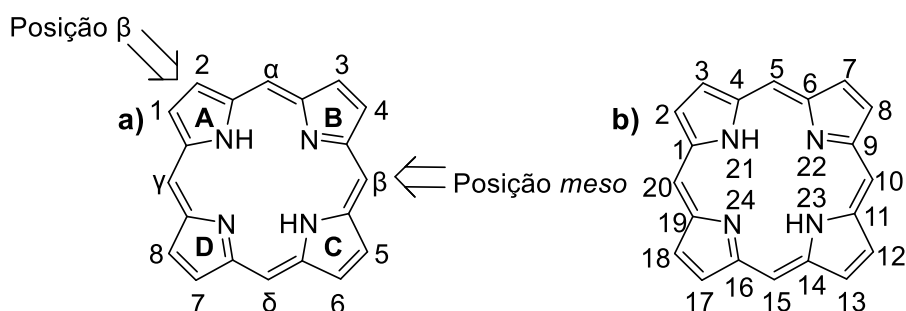


Figura I – Numeração dos macrociclos tetrapirrólico segundo a nomenclatura de a) *Fischer* e b) IUPAC.

Por uma questão de simplicidade, ao longo desta dissertação ambas as nomenclaturas serão adotadas. As porfirinas substituídas são numeradas de acordo com as recomendações da IUPAC, contudo, a nomenclatura de *Fischer* também é usada. Através desta nomenclatura referenciam-se posições *meso* ou β -pirrólicas, onde se encontram os átomos do macrociclo tetrapirrólico.

- [1] Fischer H., Orth H. (1934). Die Chemie des Pyrrols, *Akademische Verlagsgesellschaft*, Alemanha.
- [2] Moss, G. P. (1998). Nomenclature of fused and bridged fused ring systems (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and applied chemistry*, 70, 143-216.
- [3] Powell, W. H. (1993). Revised nomenclature for radicals, ions, radical ions and related species (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65, 1357-1455.
- [4] Moss, G. P. (1987). Nomenclature of tetrapyrroles (Recommendations 1986). *Pure and Applied Chemistry*, 59, 779-832.

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas tem-se verificado elevados avanços no entendimento das doenças a nível molecular.¹⁻³ O desenvolvimento de agentes de contraste (AC) capazes de detetar doenças num estado cada vez mais precoce tem sido um dos principais desafios, mas também o que tem permitido os avanços a nível de diagnóstico. Atualmente, a pesquisa a este nível centra-se no desenvolvimento de AC biocompatíveis e com elevada seletividade/sensibilidade para alvos específicos, melhorando deste modo o contraste nos vários exames de imagiologia molecular ao nosso dispor.⁴⁻⁶

As técnicas de imagiologia médica não invasivas permitem a visualização, caracterização e seguimento dos processos a nível molecular e celular *in vivo*, ou seja, fornecem informações espaço-temporais sobre processos fisiológicos e patológicos. O seu desenvolvimento é e será crucial para o diagnóstico precoce de diversas patologias, nomeadamente, doenças oncológicas,^{7,8} doenças neurodegenerativas⁹ e doenças cardiovasculares.^{10,11}

Outra área de aplicação muito relevante da imagiologia centra-se no desenvolvimento dos estudos farmacocinéticos de novos fármacos,^{12,13} evitando os estudos histológicos demorados. Além disso, sendo métodos de imagem não invasivos, permitem estudos longitudinais num único animal, aumentando a relevância estatística do estudo com significativa diminuição da quantidade de animais necessários. A imagiologia médica é uma área que engloba diferentes modalidades (Figura 1.1), sendo de destacar as que recorrem a agentes de contraste, nomeadamente a tomografia por emissão de positrões (PET), tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e ainda a imagiologia de ressonância magnética (MRI).

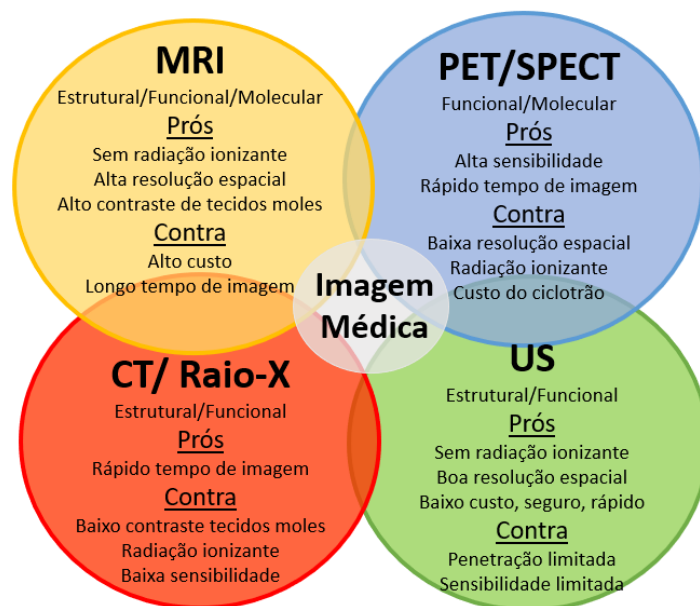


Figura 1.1: Visão geral das diferentes modalidades de imagiologia médica. MRI: imagiologia por ressonância magnética, PET: tomografia por emissão de positrões, SPECT: tomografia por emissão de fóton único, CT: tomografia computadorizada, US: ultrassonografia. ^{Adaptado de 14}

Atualmente, as técnicas de imagem médica mais utilizadas em clínica são a Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e a Imagiologia por Ressonância Magnética de próton (^1H MRI). Estas são duas técnicas complementares, uma vez que, PET apresenta uma elevada sensibilidade, mas uma baixa resolução, enquanto a MRI apresenta elevada resolução, mas baixa sensibilidade.^{15,16} Assim, a combinação destas duas técnicas permite a aquisição de dados de imagens funcionais e morfológicas com excelente contraste de tecidos moles e ótima resolução espacial.¹⁵ Contudo, o seu sucesso é dependente do tipo de agentes de contraste utilizados para visualizar, caracterizar e quantificar os processos biológicos no corpo humano. Deste modo, um AC com potencial aplicação em clínica deve possuir elevada afinidade de ligação com o alvo, elevada especificidade, elevada sensibilidade, elevada relação de contraste, elevada estabilidade *in vivo*, reduzida imunogenicidade e toxicidade e ainda deve possuir produção e viabilidade económica. Posto isto, é de extremo interesse desenvolver métodos de síntese de novos agentes de contraste de imagem molecular cada vez mais sensíveis e específicos para o alvo pretendido.^{17,18}

Deste modo, o foco desta dissertação consiste no desenvolvimento de potenciais agentes de contraste para ressonância magnética de ^{19}F e tomografia por emissão de

positrões de ¹¹C, baseados em derivados de porfirinas que incorporam átomos de flúor e as necessárias características estruturais para a sua potencial aplicação *in vivo*. Assim, nas secções seguintes será apresentada uma revisão da literatura dos principais métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas e das suas aplicações como potenciais agentes de contraste para imagiologia de MRI e PET.

1.1 Métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas

As porfirinas são uma das classes de compostos orgânicos mais estudados devido às suas características específicas, como a intensa absorção ótica, alta estabilidade química, ação catalítica, elevado rendimento quântico de oxigénio singleto, baixa toxicidade *in vivo*, entre outras. Estas características permitem que estes compostos sejam aplicados nas mais diversas áreas científicas e tecnológicas,¹⁹⁻²³ nomeadamente em medicina,²⁴⁻²⁶ salientando a sua aplicação na área da imagiologia médica como agentes de contraste.²⁷⁻³⁰

A síntese de *meso*-arilporfirinas tem sido amplamente estudada ao longo dos anos (Figura 1.2). De acordo com a literatura, os dois processos mais comuns para a síntese de porfirinas *meso*-aril substituídas são: 1) processos onde a síntese total dos compostos acontece em apenas um passo reacional³¹⁻³⁶ (condensação, ciclização e oxidação); 2) processos onde a síntese ocorre em dois passos, onde primeiro ocorre o passo de condensação e ciclização e num segundo passo a oxidação.³⁷

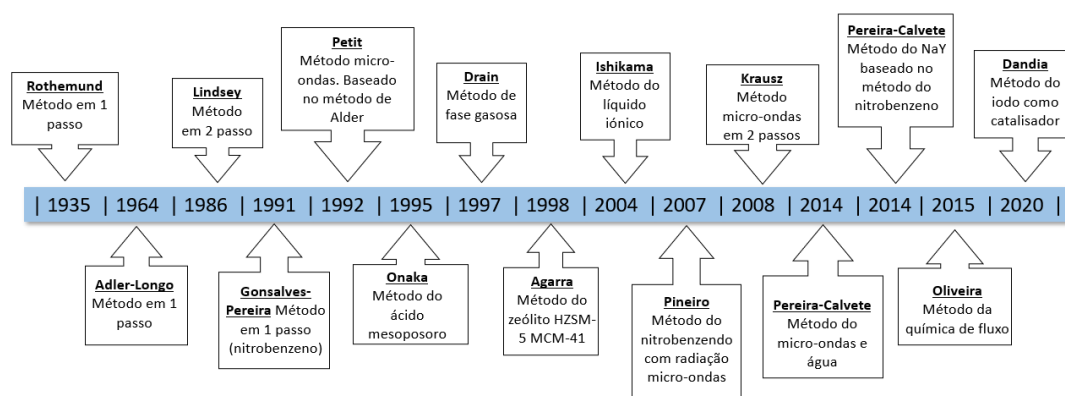


Figura 1.2: Linha cronológica de métodos sintéticos para a síntese de *meso*-arilporfirinas.

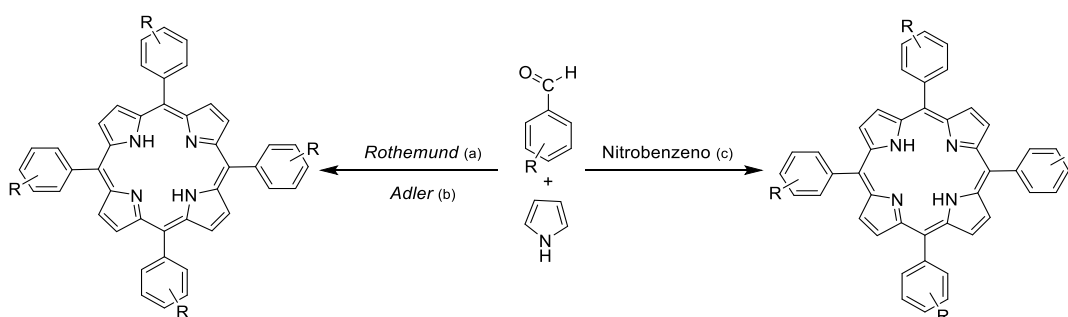
Adaptado de 20

Em 1935, *Rothmund*³¹ descreveu pela primeira vez a síntese de porfirinas simétricas num único passo, através da condensação do pirrole com o benzaldeído, utilizando

piridina como solvente, em atmosfera inerte (Esquema 1.1). Este método, apresentava como principal limitação a obtenção de vários materiais poliméricos, resultando num baixo rendimento de porfirina e sempre com contaminação de clorina.

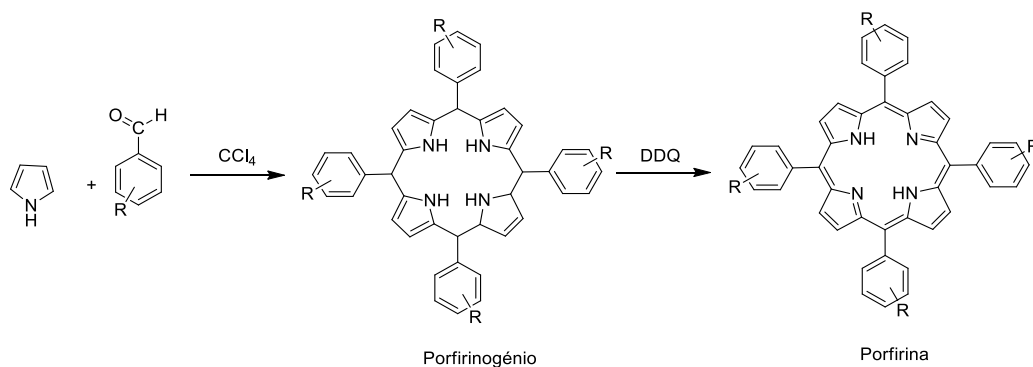
Já em 1964, *Adler, Longo* e colaboradores³²⁻³⁴ introduziram melhorias ao método anterior, como a utilização de ácido propiónico ou acético em vez da piridina no processo de condensação/oxidação do pirrole com o aldeído, sob condições aeróbicas (Esquema 1.1). Estas alterações, apesar de continuarem a levar à contaminação com clorina, permitiram melhorar o rendimento de diversas porfirinas simétricas e a obtenção de porfirinas não-simétricas com rendimentos aceitáveis.^{38,39}

Em 1991, *Pereira, Gonsalves* e colaboradores^{35,36} desenvolveram um método alternativo de síntese de porfirinas, num único passo reacional, tentando colmatar as limitações que os métodos anteriores apresentavam. Neste método, conhecido atualmente como o método do nitrobenzeno, é utilizada uma mistura de ácido acético ou propiónico e nitrobenzeno, à qual se adiciona o pirrole e o/s correspondente/s aldeído/s. Assim, num único passo reacional ocorre a formação do porfirinogénio e a concomitante oxidação à respetiva porfirina (Esquema 1.1). É importante realçar que além deste método ter demonstrado ser bastante eficiente, permitiu a obtenção de *meso*-tetraalquilporfirinas e outras com substituintes volumosos nas posições *orto* dos grupos fenilos das posições *meso*, de forma reprodutível e com rendimentos aceitáveis. Além disso, este método permite, de um modo geral, obter porfirinas diretamente do meio reacional, originando cristais com elevada pureza e com contaminação negligenciável de clorina.⁴⁰ Por esse motivo, o método do nitrobenzeno foi o selecionado para efetuar a síntese das porfirinas apresentadas nesta dissertação.



Esquema 1.1: Condensação e oxidação num único passo, através de: a) *Rothmund*³¹: piridina/metanol, tubo selado; b) *Adler*³²: ácido propiónico, ar; c) *Pereira/Nitrobenzeno*³⁵: ácido acético, nitrobenzeno.

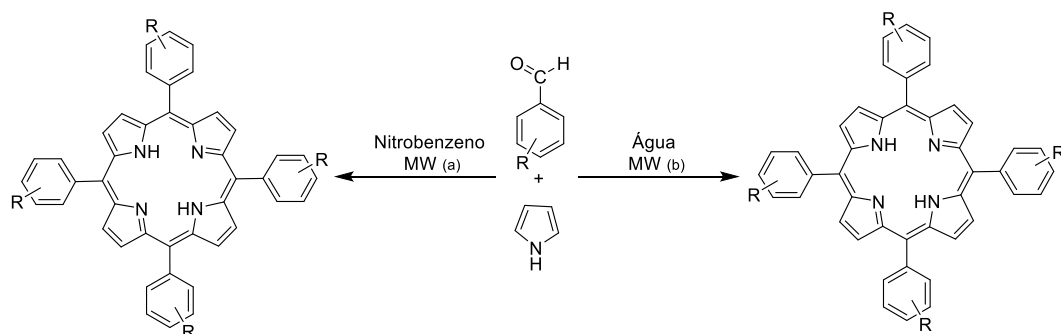
Anos mais tarde, *Pereira* e colaboradores⁴¹ e mais tarde, *Lindsey* e colaboradores³⁸ desenvolveram uma abordagem sintética em dois passos que permitiu obter várias *meso*-arilporfirinas substituídas através da condensação de pirrole com o correspondente aldeído ou acetal, à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte, numa solução altamente diluída de um solvente clorado, permitindo a obtenção do porfirinogénio. Posteriormente, este é oxidado a porfirina recorrendo a quinonas como a 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) (Esquema 1.2). Este método, por sua vez, apresenta como principal desvantagem o facto de recorrer à utilização de um oxidante dispendioso, de difícil separação do produto final e o uso de um elevado volume de solvente clorado.



Esquema 1.2: Método de síntese de porfirinas desenvolvido por Lindsey.³⁸

Apesar dos métodos apresentados anteriormente serem amplamente utilizados, nas últimas décadas tem-se verificado o desenvolvimento de métodos de síntese de porfirinas mais sustentáveis.

Assim, em 2007, *Pineiro* e colaboradores⁴² estenderam a aplicação do método do nitrobenzeno,³⁴ substituindo o aquecimento convencional pelo uso da irradiação microondas (MW) (Esquema 1.3). Este método, permitiu reduzir significativamente o tempo de reação para a obtenção de porfirinas e também dos seus respetivos complexos metálicos. Mais tarde, *Pereira*, *Calvete* e colaboradores⁴³ desenvolveram uma nova via sintética para a obtenção de *meso*-arilporfirinas utilizando água como solvente e oxidante quando submetido a irradiação MW (Esquema 1.3). Neste método, após irradiação com MW e utilizando uma temperatura superior a 200 °C, a água atua simultaneamente como solvente, catalisador e oxidante, evitando a necessidade do uso de solventes, catalisadores e oxidantes dispendiosos e prejudiciais.



Esquema 1.3: Métodos de síntese de porfirinas usando irradiação MW, através de: a) *Nitrobenzeno*⁴²: ácido acético, nitrobenzeno; b) *Pereira, Calvete* e colaboradores⁴³: água, 200 °C.

Recentemente, e com o objetivo de melhorar o rendimento de síntese de *meso*-arilporfirinas halogenadas, *Pereira, Calvete* e colaboradores⁴⁴ descreveram uma modificação do método do nitrobenzeno³⁴, pela introdução de um catalisador sólido (NaY) capaz de atuar como ácido de Lewis na ativação dos aldeídos. Este método melhorou o processo de condensação do pirrole com o aldeído, o que conduziu a uma melhoria do rendimento final da porfirina. É importante salientar que no final do processo, o catalisador sólido pode ser reutilizado, sendo esta uma característica relevante da sustentabilidade do método.

Apesar dos diversos métodos descritos na literatura, a procura de novos métodos de síntese mais eficiente de *meso*-arilporfirinas continua a ser bastante atraente, assim, em 2015, *Oliveira* e colaboradores⁴⁵ descreveram a síntese de *meso*-arilporfirinas sob condições de fluxo contínuo. Por sua vez, em 2020, *Dandia* e colaboradores⁴⁶ descreveram a síntese de *meso*-arilporfirinas recorrendo a catalisadores de iodo, o que permitiu realizar a reação à temperatura ambiente sem o recurso a ácidos orgânicos, produtos químicos extremamente tóxicos ou catalisadores dispendiosos.

Nas secções seguintes apresentar-se-á a revisão bibliográfica dos fundamentos das técnicas de MRI (Secção 1.2) e PET (Secção 1.3) bem como exemplo de potenciais AC envolvendo porfirinas encontrados na literatura.

1.2. Agentes de contraste para Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI)

Tal como referido anteriormente, uma das técnicas mais utilizadas em clínica para realizar diagnóstico é a imagiologia por ressonância magnética de próton (^1H MRI). Nesta técnica, é aplicado um campo magnético externo ($1,5\text{ T}$)⁴⁷ com o objetivo de alinhar os momentos eletrónicos do spin eletrónico dos prótons existentes na água que circunda o tecido ou órgão de interesse, com o campo magnético aplicado.⁴⁸⁻⁵⁰ Seguidamente, por aplicação de um impulso de radiofrequência (RF), ocorre a perturbação dos núcleos magnetizados e estes voltam ao seu estado inicial/equilíbrio através de processos de relaxação longitudinal (spin-rede) ou transversal (spin-spin), ocorrendo a geração de sinais (Figura 1.3).⁴⁸⁻⁵⁰

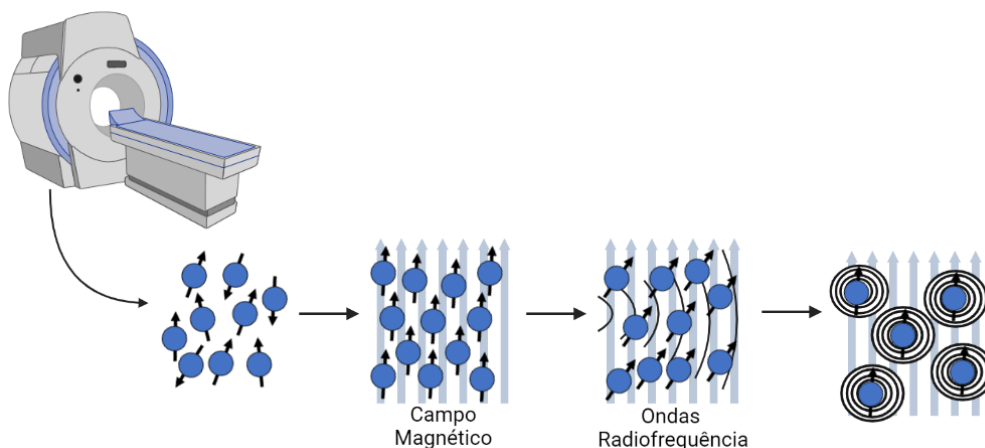


Figura 1.3: Princípio geral da MRI. Adaptado de 51

No primeiro caso, no regresso ao estado inicial/equilíbrio os spin nucleares apresentam o mesmo alinhamento do campo magnético estático, definindo-se T_1 como sendo o tempo necessário para ocorrer o processo e r_1 como a velocidade em que o processo ocorre. No segundo caso, por aplicação de RF ocorre a distorção do campo magnético local e a alteração de fase do spin nuclear, ocorrendo a redução da magnetização e retornando este ao seu estado inicial/equilíbrio (T_2 - tempo de relaxação transversal e r_2 - velocidade de relaxação transversal). Para a conversão dos sinais obtidos de forma a gerar a imagem MRI, é utilizada a transformada de Fourier (TF) que permite a transformação dos sinais gerados em pixéis que irão criar a imagem.⁵²

Esta técnica permite uma boa visualização dos tecidos, mas o contraste obtido nas imagens é geralmente baixo devido à pequena diferença de densidade protônica existente entre os vários tecidos presentes no organismo.⁴⁸ Assim, a utilização de agentes de contraste é crucial para o sucesso desta técnica em clínica. Estes, são compostos paramagnéticos exógenos que podem ser administrados quer oralmente, quer intravenosamente aos pacientes antes do exame MRI de modo a melhorar a visibilidade das estruturas do corpo para o diagnóstico clínico.⁵³

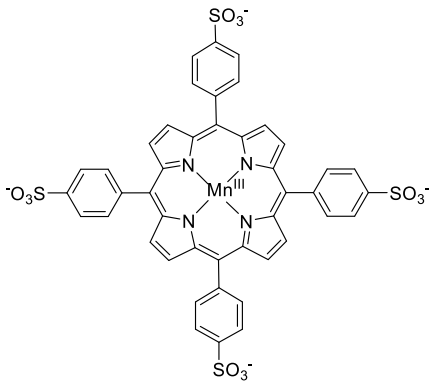
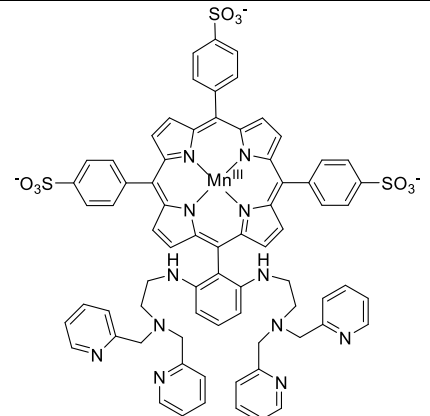
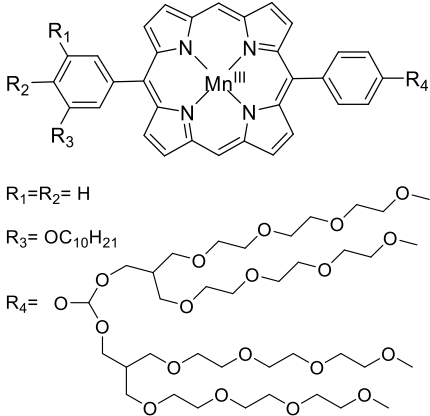
Tipicamente, podemos ter dois tipos de agentes de contraste, os que são capazes de diminuir o tempo de relaxação longitudinal (complexos de metais paramagnético) e os capazes de diminuir o tempo de relaxação transversal (ACs superparamagnéticos).^{54,55} Os agentes de contraste T_1 são responsáveis por aumentar a velocidade de relaxação longitudinal (r_1) dos prótons de água presentes nos tecidos. Uma vez que, usando estes agentes o tempo de relaxação T_1 é menor, os prótons da água visualizam-se como pontos brilhantes de maior intensidade, fazendo com que estes também sejam denominados de agentes de contraste positivos. O mecanismo de relaxação de T_1 ocorre via interação dipolo-dipolo, através do espaço entre os eletrões não emparelhados do íon do metal paramagnético e o spin nuclear dos prótons das moléculas de água coordenadas em difusão.⁵⁵⁻⁵⁷

Entre os metais paramagnéticos mais utilizados é de destacar o íon gadolínio (Gd^{3+}) que apresenta sete eletrões desemparelhados, elevado momento magnético e reduzido tempo de relaxação no seu estado trivalente. Contudo, e apesar de tipicamente formar quelatos cineticamente e termodinamicamente estáveis com ligandos cíclicos⁵⁸ e não cíclicos,⁵⁸ o Gd na sua forma livre apresenta-se como sendo bastante tóxico para o ser humano⁵⁹ e em alguns casos tem sido associado ao aparecimento de fibrose sistémica nefrogénica (NSF)⁶⁰ em pacientes com problemas renais graves ou após transplante de fígado. Tendo como objetivo reduzir os problemas associados à toxicidade do Gd, outros íons metálicos têm sido estudados como o Mn^{2+} ,⁶¹ Fe^{3+} ,⁶² Co^{2+} ,⁶³ e Ni^{2+} ,⁶⁴ uma vez que são menos prejudiciais para o organismo comparados com o Gd em caso de libertação.

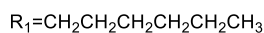
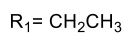
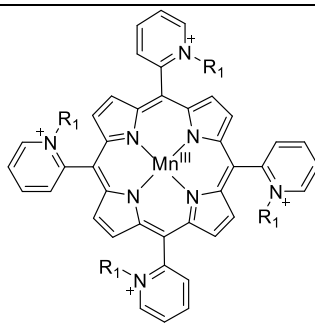
De salientar que o manganês é um metal biogénico e no seu estado de oxidação (+2) possui características de relaxação similares com o Gd^{3+} , sendo por isso bastante atrativo para a utilização em MRI.^{65,66} Seguidamente, apresenta-se na Tabela 1.1 a revisão bibliográfica de complexos de manganês de porfirinas com potencialidade para

a utilização como AC, visto que um dos focos desta dissertação envolve a utilização deste metal.

Tabela 1.1: Complexos de manganês (III) de porfirinas usadas como agentes de contraste para MRI.

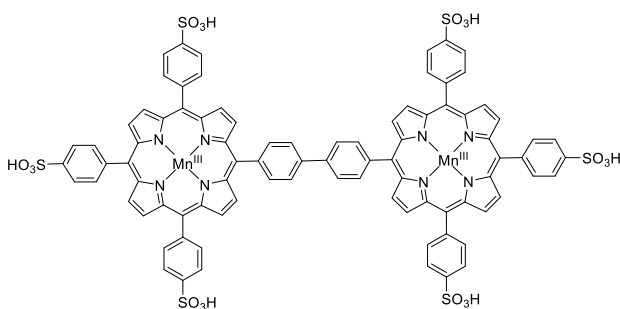
Entrada	Porfirina	Notas Relevantes
1	 <p>The structure shows a central manganese(III) ion coordinated to four nitrogen atoms of a porphyrin ring. Each of the four meso positions of the porphyrin ring is substituted with a para-sulfonate group ($-\text{SO}_3^-$).</p>	<p>Avaliação <i>in vivo</i> como potencial agente de contraste para diferentes tumores, evidenciando a redução do valor de T_1 em cerca de 500 ms e de T_2 em 12 ms.⁶⁷⁻⁶⁹</p>
2	 <p>The structure shows a central manganese(III) ion coordinated to four nitrogen atoms of a porphyrin ring. Each of the four meso positions is substituted with a para-sulfonate group ($-\text{SO}_3^-$). Additionally, two bis-pyridyl ligands are coordinated to the manganese center, each consisting of two pyridine rings linked by a methylene group.</p>	<p>Síntese e avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> como potencial sensor de zinco, evidenciando a redução do valor de T_1 em cerca de 1000 ms e de T_2 em 24 ms.^{70,71}</p>
3	 <p>The structure shows a central manganese(III) ion coordinated to four nitrogen atoms of a porphyrin ring. The four meso positions are substituted with groups R_1, R_2, R_3, and R_4. Below the structure, the substituents are defined: $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OC}_{10}\text{H}_{21}$, and R_4 is a long, branched polyether chain.</p>	<p>A síntese foi reportada, sendo obtidos valores de T_1 de 80 ms em meio aquoso.⁷²</p>

4



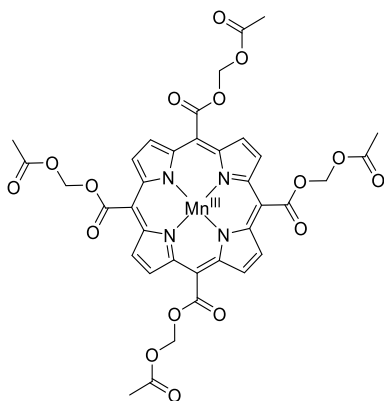
Avaliação *in vivo* como potencial sonda para cancro da próstata, sendo observada a redução do T₁ em cerca de 200 ms.⁷³

5



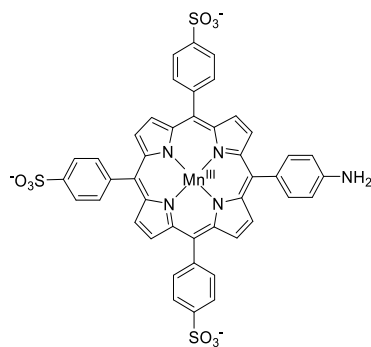
Avaliação *in vitro* e *in vivo* como potencial agente de contraste T₁, evidenciando *in vivo* uma redução de 1500 ms do mesmo.⁷⁴

6



Design, síntese, caracterização e avaliação *in vitro* como potencial agente de contraste para marcação de células, evidenciando uma redução do T₁ de 700 ms e de T₂ de 50 ms.⁷⁵

7



Avaliação *in vitro* como potencial agente de contraste para cancro da mama, evidenciando a redução do T₁ em cerca de 500 ms.⁷⁶

Através dos exemplos reportados na literatura, é possível observar que a complexação de porfirinas com manganês provoca uma redução significativo do valor de T_1 (Tabela 1.1, Entradas 1-2 e 4-7). Esta revisão da literatura também evidenciou a redução do T_2 (Tabela 1.1, Entradas 1-2 e 6), mas menos significativa comparativamente ao observado para os valores de T_1 . Um dos exemplos reportados (Tabela 1.1, Entrada 3) apresentou um valor de T_1 de 80,3 ms em meio aquoso.

Apesar de existirem diversos exemplos reportados de porfirinas complexadas com manganês, (Tabela 1.1) verifica-se que até ao momento da escrita desta dissertação, nenhum destes compostos foi utilizado em clínica. Até ao momento, apenas um AC contendo manganês na sua estrutura foi aprovado para utilização em humanos, apresentando-se na Figura 1.4 a respetiva estrutura.⁷⁷

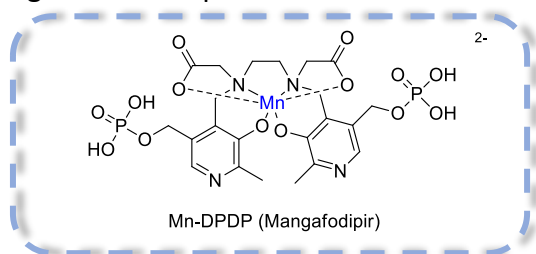


Figura 1.4: Agente de contraste T_1 aprovado para uso em humanos.⁷⁷

Apesar de todas as vantagens da utilização de ^1H MRI como técnica de diagnóstico, esta apresenta como principais desvantagens a baixa sensibilidade e a presença de sinal de ruído de fundo devido à elevada quantidade de água existente no organismo, podendo dificultar a visualização do tecido/órgão de interesse.⁷⁸ Nos últimos anos, a utilização de agentes de contraste fluorados tem-se apresentado como uma boa solução, visto que a abundância natural do ^{19}F é de 100% e está praticamente ausente nos tecidos biológicos, permitindo obter imagens de flúor sem interferência do sinal de fundo.⁷⁹ Seguidamente, e por ser um dos objetivos desta dissertação, apresenta-se uma breve descrição da técnica de ^{19}F MRI bem como exemplos de porfirinas fluoradas de manganês desenvolvidas até à data, para potencial aplicação como AC.

1.2.1 Agentes de contraste para Imagiologia por Ressonância Magnética de Flúor (^{19}F MRI)

As principais características do ^{19}F que o tornam um núcleo apelativo para aplicação em MRI, são o fato de possuir abundância natural de 100%, spin nuclear $I=1/2$, e uma

extensa gama de desvios químicos onde é detetado (> 300 ppm).⁸⁰ De salientar que este é o único isótopo natural de flúor estável e sua sensibilidade RMN é de 83,4% em comparação com a sensibilidade do protão (100%). Para além disso possui uma razão giromagnética de $40,05 \text{ MHzT}^{-1}$ ligeiramente inferior à de ^1H ($42,58 \text{ MHzT}^{-1}$) e tal como referido anteriormente, praticamente ausente no organismo, em concentrações fisiológicas de $<10^{-6}\text{M}$, estando abaixo dos limites de deteção das técnicas de ressonância magnética, fazendo com que a imagem resultante seja obtida apenas através do sinal dos átomos de flúor presentes no AC.^{48,79,81,82}

No desenvolvimento de agentes de contraste fluorados é necessário ter em conta uma série de parâmetros, nomeadamente o facto de ser necessário ter na estrutura um elevado número de átomos de flúor quimicamente equivalentes o que na maioria das vezes torna a estrutura bastante hidrofóbica. Para além disso, o ^{19}F possui velocidade de relaxação longitudinal lenta (entre $0,5$ e 3 s^{-1}) implicando a utilização de elevados tempos de aquisição.⁸¹⁻⁸³ Nos últimos anos, a introdução de átomos paramagnéticos tem-se mostrado como uma solução eficiente, uma vez que poderá reduzir o tempo de relaxação longitudinal possibilitando uma aquisição mais rápida. Contudo, é importante referir que a distância entre o grupo fluorado e o átomo paramagnético é crucial para a eficiência da redução do tempo de relaxação. De acordo com alguns autores,^{79,84} a distância ideal quando são utilizados lantanídeos, situa-se entre $4,5 \text{ \AA}$ e 7 \AA . Se a distância for menor que $4,5 \text{ \AA}$, o efeito observado é elevado, resultando num alargamento do sinal. Se por outro lado a distância for superior a 7 \AA , o efeito não é significativo. De salientar que, até à data, não foi reportada na literatura a distância ideal, quando é utilizado o manganês como átomo paramagnético.

Como o objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de agentes de contraste baseados em porfirinas fluoradas, efetuou-se a pesquisa bibliográfica entre 2000 e 2020, tendo-se encontrado apenas os três exemplos descritos na Figura 1.5.

O primeiro exemplo remonta ao ano de 2001, onde *Songca* e colaboradores⁸⁵ sintetizaram *meso*-tetra(hidroxifenil)porfirinas fluoradas através do método do nitrobenzeno (Figura 1.5 a)). De modo a comprovar o seu potencial como agente de contraste de ^{19}F MRI, recorreu a ratos BALB/c com e sem tumores de modo a observar a capacidade internalização, retenção e localização tumoral destas porfirinas.

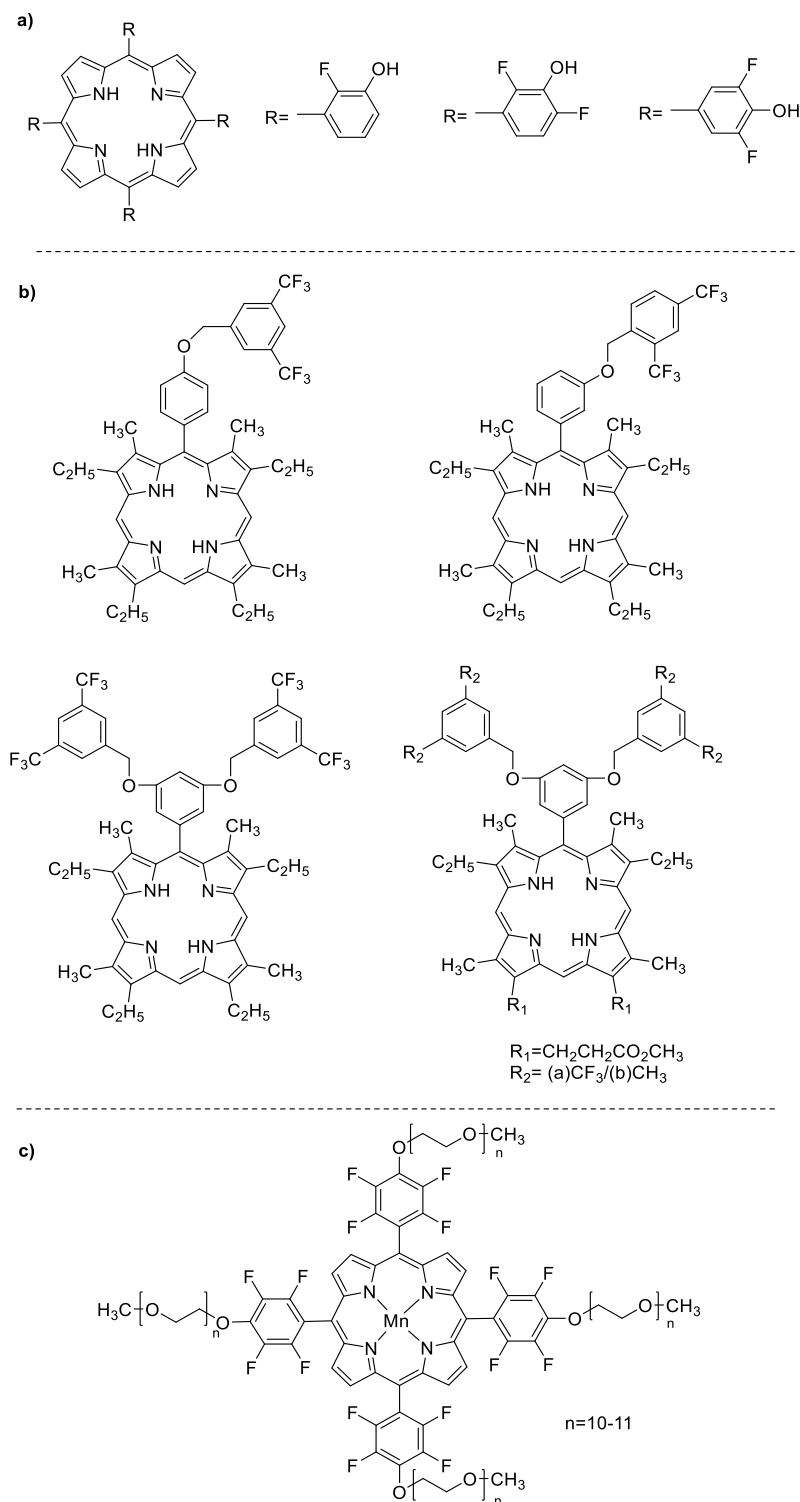


Figura 1.5: Estrutura de porfirinas fluoradas descritas como potenciais agentes de contraste para ^{19}F MRI sintetizadas por (a) *Songca* e colaboradores,⁸⁵ (b) *Pandey* e colaboradores⁸⁶ e (c) *Pinto* e colaboradores.⁸⁷

Já em 2003, o segundo exemplo deste tipo de compostos foi reportado por *Pandey* e colaboradores,⁸⁶ que sintetizaram porfirinas com um número variável de átomos de flúor (contendo 6 ou 12 átomos) através do método de *MacDonald*, partindo de 3

derivados diferentes do pirrole (Figura 1.5 b)). Recorrendo a ^{19}F MRI, avaliaram a localização celular destes compostos através de imagens adquiridas de ratos C3H/HeJ com tumores de fibrossarcoma induzidos por radiação (RIF). Os resultados obtidos, demonstraram que os compostos se localizam preferencialmente na mesma região celular que a rodamina-123, sugerindo assim que se acumulam nas mitocôndrias.

É importante notar que os exemplos de porfirinas fluoradas com potencial aplicação em imagiologia de ^{19}F MRI apresentadas até ao momento não são complexadas com o Mn. Deste modo, apenas um exemplo de porfirina contendo Mn e átomos de flúor simultaneamente foi encontrado, onde *Pinto* e colaboradores⁸⁷ descreveram a síntese e a caracterização física e química de uma nova porfirina fluorada Mn (II)/ Mn (III) (Figura 1.5 c)). Deste modo, o principal objetivo dos autores foi desenvolver porfirinas complexadas com Mn hidrossolúveis, biocompatíveis e com potencial *redox* sensível a diferentes ambientes biológicos. Este exemplo é particularmente importante não só pela importância de atuar como sonda *redox* permitindo um diagnóstico precoce, mas também devido aos resultados obtidos através de ressonância de ^{19}F RMN que podem abrir a possibilidade de explorar este tipo de complexos como AC paramagnéticos ^{19}F MRI.

1.3 Tomografia por emissão de positrões (PET)

A tomografia por emissão de positrões é uma técnica de imagem baseada em medicina nuclear, capaz de produzir uma imagem tridimensional dos processos funcionais do organismo através da deteção e quantificação do padrão de distribuição de uma sonda emissora de positrões no corpo humano, podendo fornecer informações sobre as funções metabólicas em que intervêm.^{88,89} Esta técnica é caracterizada por um elevado nível de sensibilidade (10^{-11} a 10^{-12} mol/L), permitindo uma quantificação e diagnósticos precisos.

Tipicamente, um exame de PET inicia-se com a administração de uma sonda emissora de positrões ao paciente, geralmente incorporada numa molécula biologicamente ativa, seguido de um período de incubação de modo a permitir que o radiofármaco se concentre no tecido alvo. O radioisótopo do radiofármaco decai para a sua forma mais estável, emitindo um positrão que, por sua vez, viaja por uma curta distância até

interagir com um eletrão. Uma vez que o positrão é a antipartícula do eletrão, estas duas partículas anulam-se mutuamente, produzindo um par de raios gama de 511 keV em direções opostas (180 graus). Uma matriz circular de detetores que circunda o paciente permite localizar a fonte do processo de aniquilação, desenhando um conjunto de linhas retas, as linhas de resposta (LORs). É importante notar que para a imagem ser válida no equipamento PET, o par de raios gama emitidos no processo de aniquilação deve ser detetado simultaneamente. Assim, com base nas linhas de resposta geradas e em equações matemáticas desenvolvidas para o efeito, é possível obter uma imagem tridimensional que fornece informação sobre o padrão de distribuição do radiofármaco no paciente (Figura 1.6).⁹⁰⁻⁹²

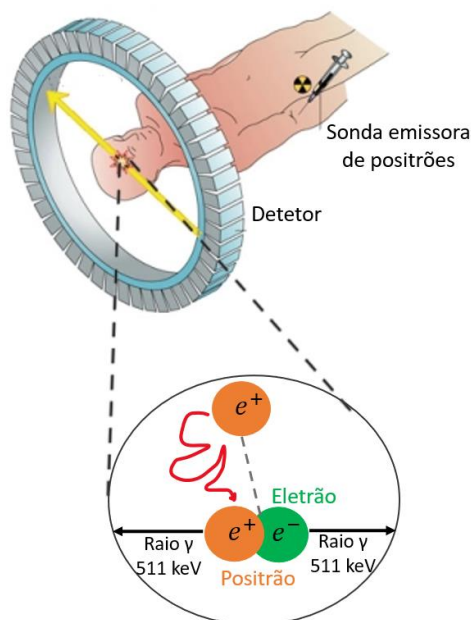


Figura 1.6: Princípio geral do procedimento PET. Adaptado de 93,94

Como referido anteriormente, apenas radioisótopos emissores de positrões podem ser usados em PET, sendo os mais comumente usados o flúor-18 (^{18}F), nitrogénio-13 (^{13}N), carbono-11 (^{11}C) e oxigénio-15 (^{15}O) (Tabela 1.2), uma vez que estes apresentam uma elevada percentagem de decaimento por emissão de positrões (β^+) mas, em contrapartida, apresentam um reduzido tempo de semi-vida, o que pode ser um fator limitante para o tempo de síntese, purificação, controlo de qualidade e aplicação clínica. É importante notar que existem outros radioisótopos emissores de positrões, como o cobre-64 (^{64}Cu), que por um lado possui tempos de semi-vida elevados, mas o seu decaimento por emissão de positrões é de apenas 17,9% (Tabela 1.2).⁹⁵

Tabela 1.2: Características dos radioisótopos emissores de positrões mais comuns produzidos no ciclotrão.^{96,97} (β^+ : emissão positrões; β^- : emissão beta; EC: captura de eletrões)

Radioisótopos	Meia-vida (min)	Modo decaimento (%)	Produto decaimento
^{15}O	2	β^+ (100)	^{15}N
^{13}N	10	β^+ (100)	^{13}C
^{11}C	20,4	β^+ (99,8); EC (0,2)	^{11}B
^{18}F	109,8	β^+ (97); EC (3)	^{18}O
^{68}Ga	68,3	β^+ (17,8); EC (11)	^{68}Zn
^{64}Cu	768	β^+ (17,9); β^- (39,4) EC (43,8)	^{64}Ni

Uma vez que nesta dissertação se pretende obter uma porfirina passível de ser radiomarcada com carbono-11 para potencialmente ser utilizada como agente de contraste PET, é neste radioisótopo que se foca a revisão da literatura apresentada de seguida.

1.3.1 Radioisótopo de Carbono-11

O carbono-11 é um dos radioisótopos mais usados em PET uma vez que o carbono está presente em todas as biomoléculas e fármacos e, portanto, a marcação isotópica destas estruturas com este isótopo de carbono emissor de positrões poderá originar radiomarcadores com farmacocinética e farmacodinâmica inalterada face ao composto original. Além disso, o tempo de meia vida curto de 20,4 minutos, reduz o tempo de exposição do paciente ao radioisótopo e permite a repetição do exame, caso necessário. Apesar do tempo de meia vida curto deste radioisótopo, a instalação generalizada de ciclotrões nas proximidades dos hospitais e centros de pesquisa contribuiu muito para o crescente interesse na marcação de fármacos de agentes de contraste com ^{11}C .^{98,99}

É importante referir que o tempo de meia vida curto condiciona a radioquímica de ^{11}C para reações simples e rápidas, como alquilação de álcoois ou aminas, onde o tempo de síntese e purificação não excede 2 a 3 vezes a meia vida física do radionuclídeo e, por isso, as estratégias para a radiomarcção devem ter como objetivo introduzir a

radiomarcagem na sequência sintética o mais tarde possível. Deste modo, ^{11}C é atualmente considerado um dos isótopos de PET mais interessantes devido à sua fácil preparação, bem como devido às propriedades químicas e biológicas semelhantes às dos compostos não marcados.^{88,99}

1.3.2 Radiofármacos para PET na detecção de tumores

Atualmente, existem vários radiofármacos aprovados clinicamente para oncologia (Figura 1.7), sendo o flúor-18-fluorodeoxiglicose ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$) o mais usado em PET devido ao uso omnipresente de glicose pelo corpo humano. Este radiofármaco apresenta aplicação em diversos tipos de cancro, nomeadamente em cancro do esófago, pulmão, mama, pescoço, colorretal, linfomas malignos e melanomas, entre outros.¹⁰⁰

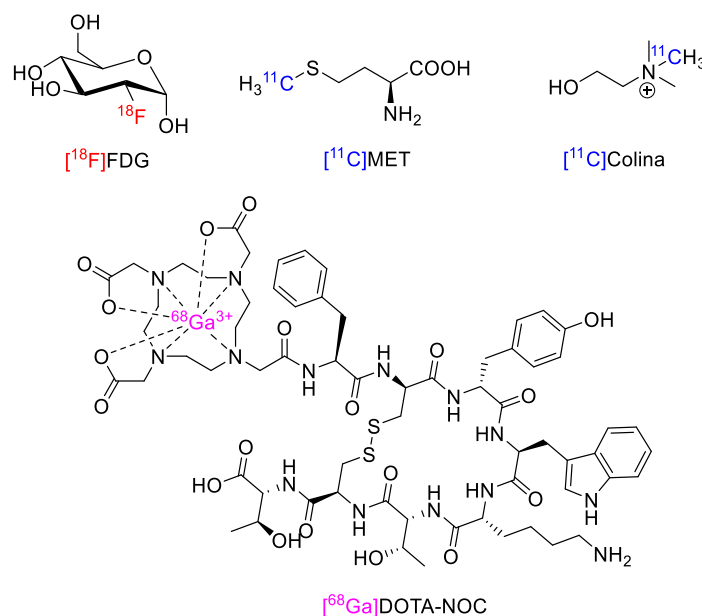


Figura 1.7: Radiofármacos PET aprovados clinicamente para oncologia.

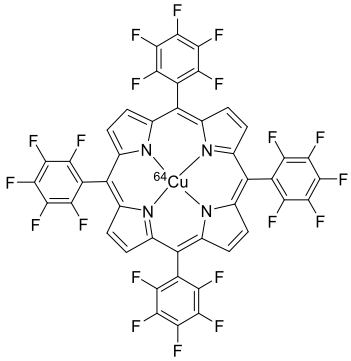
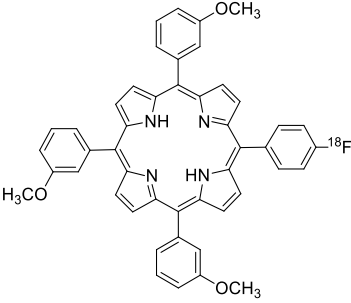
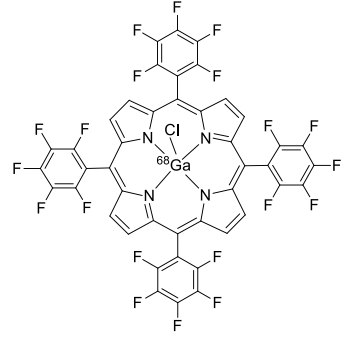
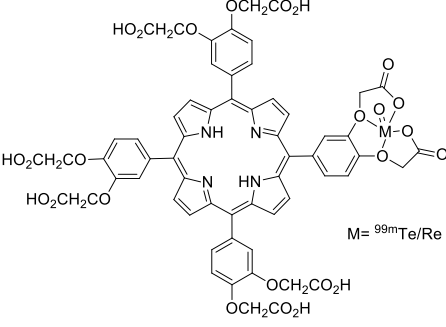
Contudo, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ não é um radiofármaco altamente específico uma vez que não consegue diferenciar entre as células que possuem uma alta taxa metabólica associada à neoplasia e células com um metabolismo aumentado relacionado com outras etiologias, como infeção ou inflamação.¹⁰¹

Outros radiofármacos atualmente em uso incluem o *L*-[metil- ^{11}C]Metionina ($[^{11}\text{C}]\text{MET}$), o aminoácido radiomarcado mais frequentemente usado, uma vez que apresenta uma produção radioquímica conveniente, permitindo uma síntese rápida com elevado rendimento radioquímico e sem a necessidade de purificação complexa,

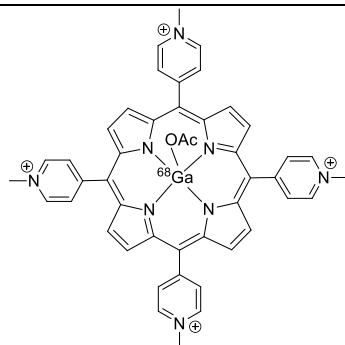
sendo usado essencialmente para o diagnóstico de cancro do cérebro, fígado, pulmão e urinário.^{102,103} Outro radiofármaco de carbono-11 com amplo uso é a [¹¹C]Colina, usada para o cancro da próstata, pulmões e bexiga.^{104,105} Usando gálio-68, diversos radioisótopos foram desenvolvidos, sendo de destacar o ⁶⁸Ga-radiomarcado [1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético]-1-Nal-octreotida ([⁶⁸Ga]DOTA-NOC), um radiofármaco usado essencialmente para tumores neuro-endócrinos.⁹¹

Uma vez que as porfirinas apresentam diversas características que as tornam relevantes a nível biológico e devido ao sucesso da imagem PET,¹⁰⁶ é de extremo interesse desenvolver novos agentes de contraste PET incorporando porfirinas para potencial aplicação no diagnóstico de tumores. Na Tabela 1.3, encontra-se uma revisão da literatura desde 2000 até ao momento da escrita desta dissertação de agentes de contraste PET incorporando porfirinas, sendo de destacar que de todos os exemplos reportados apenas um deles consiste numa porfirina marcada com ¹¹C (Entrada 8, Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Porfirinas radiomarcadas com radioisótopos emissores de pósitrons usados para PET de tumores.

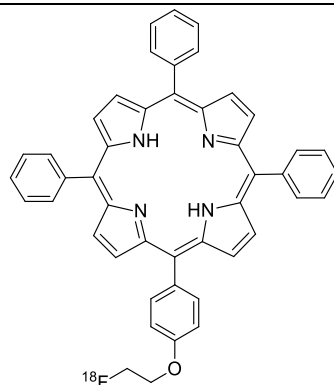
Entrada	Porfirina radiomarcada	Estudos/ aplicações
1		Síntese e avaliação (<i>in vivo</i>) como potencial aplicação como AC para tumores. ¹⁰⁷
2		Apenas descrição da síntese. ¹⁰⁸
3		Síntese e avaliação (<i>in vivo</i>) como potencial AC PET para fibrossarcoma. ¹⁰⁹
4		Síntese e avaliação (<i>in vivo</i>) como potencial AC PET para gliomas e tumores da mama. ¹¹⁰

5



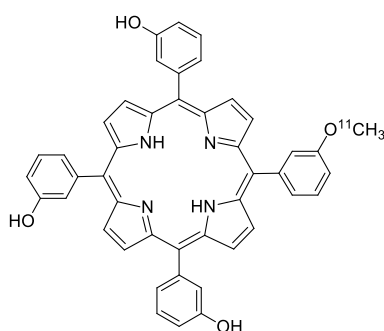
Síntese e estudos de biodistribuição (*in vivo*) como potencial AC PET para fibrossarcoma.¹¹¹

6



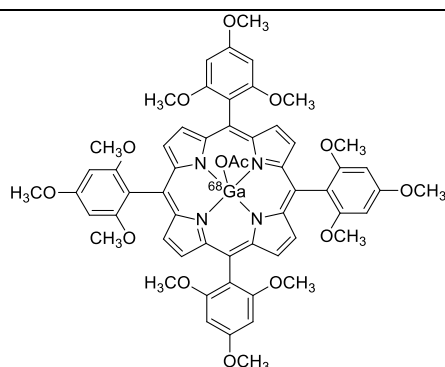
Síntese e avaliação (*in vitro/ in vivo*) como potencial AC PET para tumores da bexiga.¹¹²

7



Síntese e avaliação (*in vitro/ in vivo*) como potencial AC PET para detecção precoce de tumores e/ou para identificação de metabolitos.¹¹³

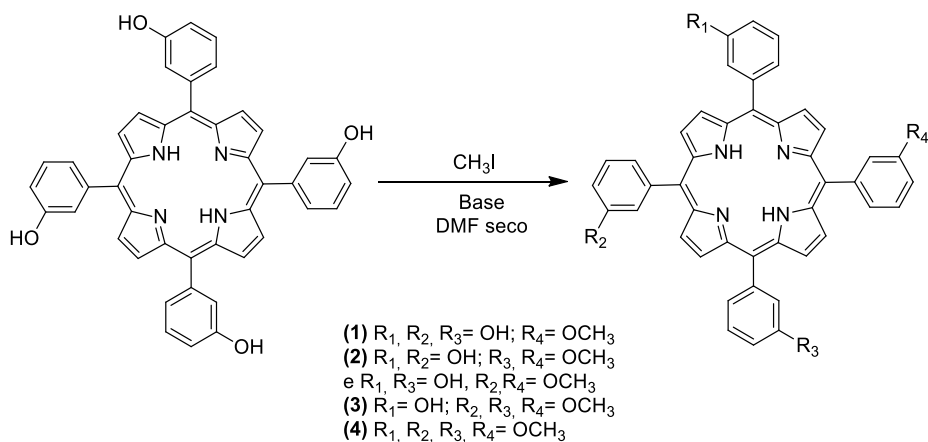
8



Síntese e avaliação (*in vivo*) como potencial AC PET para fibrossarcoma.¹¹⁴

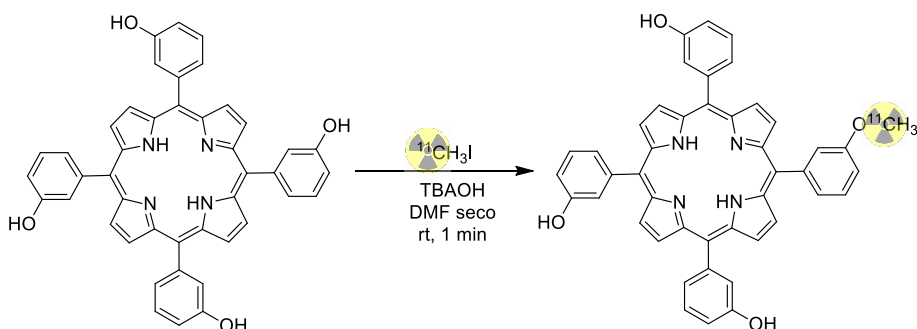
Como referido, de todas as porfirinas relacionadas, para esta dissertação a porfirina radiomarcada com carbono-11 tem especial interesse (Tabela 1.3, Entrada 7). Assim, a 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil) porfirina foi sintetizada através do método do

nitrobenzeno, sendo posteriormente alquilada com CH_3I de modo a simular a frio a radiomarcção com carbono-11 (Esquema 1.4).¹¹³



Esquema 1.4: Reagentes e condições para a síntese de porfirinas hidroxifenil alquiladas a frio.¹¹³

Estes resultados obtidos permitiram a transposição das condições de reação a frio para a radiomarcção com ^{11}C , através de $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ (Esquema 1.5).



Esquema 1.5: Síntese da porfirina 5,10,15-tris(3-hidroxifenil)-20-(3- ^{11}C)metoxifenil).

Tendo obtido a porfirina radiomarcada, os autores¹¹³ realizaram estudos *in vivo* em ratos BALB/c saudáveis de modo a avaliar a biodistribuição do composto. Estes estudos permitiram observar que a captação preferencial ocorre no fígado demonstrado que esta é a principal via de excreção do composto. Este composto também apresentou mínima penetração cerebral e baixa absorção no pulmão e no músculo.

1.4 Proposta de trabalho

Tendo em consideração que a detecção precoce de doenças é essencial para o combate das mesmas, o desenvolvimento de agentes de contraste biocompatíveis capazes de melhorar o contraste entre tecidos normais e danificados é fundamental. Deste modo, o objetivo deste trabalho (Figura 1.8) consiste em sintetizar um conjunto de agentes de contraste biocompatíveis, do tipo porfirinas, passíveis de aplicação em Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI) de ^{19}F e Tomografia por Emissão de Positrões (PET). É de extrema importância que os potenciais agentes sintetizados possuam, por um lado, um número suficiente de átomos de flúor quimicamente equivalentes (^{19}F MRI), solubilidade em meios biológicos (^{19}F MRI e PET) e, por outro lado, devem ser passíveis de ser radiomarcados (PET).

Deste modo, numa primeira parte dos estudos, pretende-se sintetizar e avaliar um conjunto de complexos de porfirinas com Mn(III) com diferentes grupos fluorados a diferentes distâncias do íon de manganês de forma a avaliar a sua capacidade como potencial agente de contraste. Numa segunda parte, serão efetuados estudos de radiomarcagem da porfirina que apresente as melhores propriedades, para potencial aplicação como agente de contraste para PET em meios biológicos.

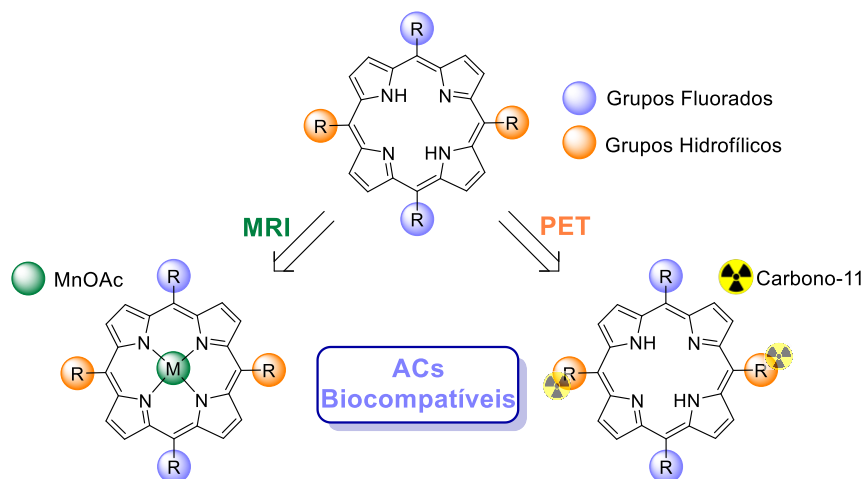


Figura 1.8: Esquema da proposta de trabalho apresentada nesta dissertação.

1.5 Referências

- [1] Weber, G. F. (2007). Molecular mechanisms of cancer. *Springer*, 39, 45-99.
- [2] Gotlieb, A. I. (2018). Molecular basis of cardiovascular disease. *Molecular pathology*, 14, 251-276.
- [3] Moujalled, D., Strasser, A., Liddell, J. R. (2021). Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death and Differentiation*, 28, 2029-2044.
- [4] Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69, 7-34.
- [5] Weissleder, R. (2006). Molecular imaging in cancer. *Science*, 312, 1168-1171.
- [6] Lim, J. W., Son, S. U., Lim, E. K. (2018). Recent advances in bioimaging for cancer research. *State of the Art in Nano-bioimaging*, 4, 11-33.
- [7] Weissleder, R., Pittet, M. J. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452, 580-589.
- [8] Shahbazi-Gahrouei, D., Khaniabadi, P. M., Khaniabadi, B. M., Shahbazi-Gahrouei, S. (2019). Medical imaging modalities using nanoprobe for cancer diagnosis: A literature review on recent findings. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 24, 38-64.
- [9] Hammes, J., Bischof, G. N., Drzezga, A. (2017). Molecular imaging in early diagnosis, differential diagnosis and follow-up of patients with neurodegenerative diseases. *Clinical and translational imaging*, 5, 465-471.
- [10] Chaher, N., Hajhosseiny, R., Phinikaridou, A., Botnar, R. M. (2020). Imaging the Extracellular Matrix in Prevalent Cardiovascular Diseases. *Applied Sciences*, 10, 4001-4041.
- [11] Tu, Y., Sun, Y., Fan, Y., Cheng, Z., Yu, B. (2018). Multimodality molecular imaging of cardiovascular disease based on nanoprobe. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48, 1401-1415.

- [12] Rudin, M., Weissleder, R. (2003). Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*, 2, 123-131.
- [13] Willmann, J. K., Van Bruggen, N., Dinkelborg, L. M., Gambhir, S. S. (2008). Molecular imaging in drug development. *Nature reviews Drug discovery*, 7, 591-607.
- [14] Rieffel, J., Chitgupi, U., Lovell, J. F. (2015). Recent advances in higher-order, multimodal, biomedical imaging agents. *Small*, 11, 4445-4461.
- [15] Jadvar, H., Colletti, P. M. (2014). Competitive advantage of PET/MRI. *European journal of radiology*, 83, 84-94.
- [16] Jennings, L. E., Long, N. J. (2009). 'Two is better than one'—probes for dual-modality molecular imaging. *Chemical communications*, 24, 3511-3524.
- [17] Weissleder, R., Mahmood, U. (2001). Molecular imaging. *Radiology*, 219, 316-333.
- [18] Massoud, T. F., Gambhir, S. S. (2003). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & development*, 17, 545-580.
- [19] Castro K. A., Silva S., Pereira P. M., Simões M. M., Neves M. G., Cavaleiro J. A., Wypych F., Tomé J. P., Nakagaki S. (2015). Galactodendritic porphyrinic conjugates as new biomimetic catalysts for oxidation reactions. *Inorganic Chemistry*, 54, 4382-4393.
- [20] Pereira, M. M., Dias, L. D., Calvete, M. J. (2018). Metalloporphyrins: bioinspired oxidation catalysts. *Acs Catalysis*, 8, 10784-10808.
- [21] Higashino, T., Imahori, H. (2015). Porphyrins as excellent dyes for dye-sensitized solar cells: recent developments and insights. *Dalton Transactions*, 44, 448-463.
- [22] Grimsdale, A. C., Müllen, K. (2005). The chemistry of organic nanomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 5592-5629.
- [23] Jurow, M., Schuckman, A. E., Batteas, J. D., Drain, C. M. (2010). Porphyrins as molecular electronic components of functional devices. *Coordination chemistry reviews*, 254, 2297-2310.

- [24] Sandland, J., Malatesti, N., Boyle, R. (2018). Porphyrins and related macrocycles: Combining photosensitization with radio-or optical-imaging for next generation theranostic agents. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 23, 281-294.
- [25] Ferino, A., Nicoletto, G., D'Este, F., Zorzet, S., Lago, S., Richter, S. N., Xodo, L. E. (2020). Photodynamic therapy for ras-driven cancers: Targeting G-Quadruplex RNA structures with bifunctional alkyl-modified porphyrins. *Journal of medicinal chemistry*, 63, 1245-1260.
- [26] Lakouas, D. K., Huglo, D., Mordon, S., Vermandel, M. (2017). Nuclear medicine for photodynamic therapy in cancer: Planning, monitoring and nuclear PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 18, 236-243.
- [27] Calvete, M., Simões, A., Henriques, C., Pinto, S., Pereira, M. (2014). Tetrapyrrolic Macrocyces: Potentialities in Medical Imaging Technologies. *Current Organic Synthesis*, 11, 127–140.
- [28] Zhang, Y., Lovell, J. F. (2012). Porphyrins as theranostic agents from prehistoric to modern times. *Theranostics*, 2, 905-915.
- [29] Calvete, M. J., Pinto, S. M., Pereira, M. M., & Geraldes, C. F. (2017). Metal coordinated pyrrole-based macrocycles as contrast agents for magnetic resonance imaging technologies: Synthesis and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 333, 82-107.
- [30] Tsolekile, N., Nelana, S., Oluwafemi, O. S. (2019). Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent. *Molecules*, 24, 2669-2684.
- [31] Rothemund, P. (1935). Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*, 57, 2010-2011.
- [32] Adler, A. D., Longo, F. R., Shergalis, W. (1964). Mechanistic investigations of porphyrin syntheses. I. Preliminary studies on *ms*-tetraphenylporphin. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 3145-3149.

- [33] Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J., Korsakoff, L. (1967). A simplified synthesis for *meso*-tetraphenylporphine. *The Journal of Organic Chemistry*, 32, 476-476.
- [34] Adler, A. D., Sklar, L., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Finarelli, M. G. (1968). A mechanistic study of the synthesis of *meso*-tetraphenylporphin. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 5, 669-678.
- [35] Pereira, M. M. (1991). Estudos de activação de peróxido de hidrogénio como oxidante – catálise por metaloporfirinas e preparação de ácidos peroxocarboxílicos, Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- [36] Gonsalves, A. D. A. R., Varejão, J. M., Pereira, M. M. (1991). Some new aspects related to the synthesis of *meso*-substituted porphyrins. *Journal of heterocyclic chemistry*, 28, 635-640.
- [37] Wagner, R. W., Lawrence, D. S., Lindsey, J. S. (1987). An improved synthesis of tetramesitylporphyrin. *Tetrahedron letters*, 28, 3069-3070.
- [38] Lindsey J. S. (2000). The Porphyrin Handbook, (Eds.), Academic Press: San Diego, Volume 1.
- [39] Pereira, M. M., Monteiro, C. J. P., Peixoto, A. F. (2010). *Meso*-substituted porphyrin synthesis from monopyrrole: na overviem. *Società Chimica Italiana*, Itália, 12, 258-278.
- [40] Johnstone, R. A. W., Nunes, M. L. P. G., Pereira, M. M., Gonçalves, A. M. A. R., Serra, A. C. (1996). Improved syntheses of 5,10,15,20-tetrakisaryl- and tetrakisalkylporphyrins. *Heterocycles*, 43, 1423-1437.
- [41] Gonsalves, A. M. D. R, Pereira, M. M. (1985). A new look into the Rothmund *meso*-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 22, 931-933.
- [42] Nascimento, B. F. O., Pineiro, M., Gonsalves, A. M. A. R., Silva, M. R., Beja, A. M., Paixão, J. A. (2007). Microwave-assisted synthesis of porphyrins and metalloporphyrins: a rapid and efficient synthetic method. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 11, 77–84.

- [43] Henriques C. A., Pinto S. M., Aquino G. L., Pineiro M., Calvete M. J., Pereira M. M. (2014) Ecofriendly porphyrin synthesis by using water under microwave irradiation. *ChemSusChem*, 7, 2821-2824.
- [44] Silva, M., Fernandes, A., Bebiano, S. S., Calvete, M. J., Ribeiro, M. F., Burrows, H. D., Pereira, M. M. (2014) Size and ability do matter! Influence of acidity and pore size on the synthesis of hindered halogenated *meso*-phenyl porphyrins catalysed by porous solid oxides. *Chemical Communications*, 50, 6571-6573.
- [45] Momo, P. B., Belleste, B. S., Brocksom, T. J., de Souza, R. O., de Oliveira, K. T. (2015). Exploiting novel process windows for the synthesis of *meso*-substituted porphyrins under continuous flow conditions. *RSC advances*, 5, 84350-84355.
- [46] Dandia, A., Chauhan, S. M. (2020). Synthesis of *meso*-substituted corroles and porphyrins using iodine as a catalyst. *Journal of Chemical Sciences*, 132, 1-8.
- [47] Rashid, H. U., Martines, M. A. U., Jorge, J., de Moraes, P. M., Umar, M. N., Khan, K., Rehman, H. U. (2016). Cyclen-based Gd^{3+} complexes as MRI contrast agents: Relaxivity enhancement and ligand design. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 24, 5663-5684.
- [48] Tirota, I., Dichiarante, V., Pigliacelli, C., Cavallo, G., Terraneo, G., Bombelli, F. B., Resnati, G. (2015). ^{19}F magnetic resonance imaging (MRI): from design of materials to clinical applications. *Chemical reviews*, 115, 1106-1129.
- [49] Grover, V. P., Tognarelli, J. M., Crossey, M. M., Cox, I. J., Taylor-Robinson, S. D., McPhail, M. J. (2015). Magnetic resonance imaging: principles and techniques: lessons for clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 5, 246-255.
- [50] Katti, G., Ara, S. A., Shireen, A. (2011). Magnetic resonance imaging (MRI)—A review. *International journal of dental clinics*, 3, 65-70.
- [51] <https://www.medicwiz.com/medtech/diagnostics/what-is-a-mri-scan-quick-info-about-this-amazing-technology> (Dia 18 de Setembro às 18h30)
- [52] Gallagher, T. A., Nemeth, A. J., Hacin-Bey, L. (2008). An introduction to the Fourier transform: relationship to MRI. *American journal of roentgenology*, 190, 1396-1405.

- [53] Xiao, Y. D., Paudel, R., Liu, J., Ma, C., Zhang, Z. S., Zhou, S. K. (2016). MRI contrast agents: Classification and application. *International journal of molecular medicine*, *38*, 1319-1326.
- [54] Pierre, V. C., Allen, M. J., Caravan, P. (2014). Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going?. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *19*, 127–131.
- [55] Rashid, H. U., Martines, M. A. U., Jorge, J., de Moraes, P. M., Umar, M. N., Khan, K., Rehman, H. U. (2016). Cyclen-based Gd³⁺ complexes as MRI contrast agents: Relaxivity enhancement and ligand design. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *24*, 5663-5684.
- [56] Frullano, L., Meade, T. J. (2007). Multimodal MRI contrast agents. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *12*, 939-949.
- [57] Caravan, P., Farrar, C. T., Frullano, L., Uppal, R. (2009). Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium-and manganese-based T₁ contrast agents. *Contrast media & molecular imaging*, *4*, 89-100.
- [58] Rees, J. A., Deblonde, G. J. P., An, D. D., Ansoberlo, C., Gauny, S. S., Abergel, R. J. (2018). Evaluating the potential of chelation therapy to prevent and treat gadolinium deposition from MRI contrast agents. *Scientific reports*, *8*, 1-9.
- [59] Rogosnitzky, M., & Branch, S. (2016). Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals*, *29*, 365-376.
- [60] Grobner, T. (2006). Gadolinium—a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *21*, 1104-1108.
- [61] Drahoš, B., Lukeš, I., Tóth, É. (2012). Manganese (II) complexes as potential contrast agents for MRI. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2012*, 1975-1986.
- [62] Kužník, N., Wyskocka, M. (2016). Iron (III) contrast agent candidates for MRI: a survey of the structure–effect relationship in the last 15 years of studies. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2016*, 445-458.

- [63] Tsitovich, P. B., Sperryak, J. A., & Morrow, J. R. (2013). A redox-activated MRI contrast agent that switches between paramagnetic and diamagnetic states. *Angewandte Chemie*, *125*, 14247-14250.
- [64] Olatunde, A. O., Dorazio, S. J., Sperryak, J. A., Morrow, J. R. (2012). The NiCEST approach: nickel (II) paraCEST MRI contrast agents. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 18503-18505.
- [65] Pan, D., Schmieder, A. H., Wickline, S. A., Lanza, G. M. (2011). Manganese-based MRI contrast agents: past, present and future. *Tetrahedron*, *67*, 8431.
- [66] Pan, D., Caruthers, S. D., Senpan, A., Schmieder, A. H., Wickline, S. A., Lanza, G. M. (2011). Revisiting an old friend: manganese-based MRI contrast agents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *3*, 162-173.
- [67] Fiel, R. J., Button, T. M., Gilani, S., Mark, E. H., Musser, D. A., Henkelman, R. M., Van Heteren, J. G. (1987). Proton relaxation enhancement by manganese (III) TPPS₄ in a model tumor system. *Magnetic resonance imaging*, *5*, 149-156.
- [68] Place, D. A., Faustino, P. J., Berghmans, K. K., van Zijl, P. C., Chesnick, A. S., Cohen, J. S. (1992). MRI contrast-dose relationship of manganese (III) tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with human xenograft tumors in nude mice at 2.0 T. *Magnetic resonance imaging*, *10*, 919-928.
- [69] Bockhorst, K., Hoehn-Berlage, M., Ernestus, R. I., Tolxdorff, T., Hossmann, K. A. (1993). NMR-contrast enhancement of experimental brain tumors with MnTPPS: qualitative evaluation by in vivo relaxometry. *Magnetic resonance imaging*, *11*, 655-663.
- [70] Zhang, X. A., Lovejoy, K. S., Jasanoff, A., Lippard, S. J. (2007). Water-soluble porphyrins as a dual-function molecular imaging platform for MRI and fluorescence zinc sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 10780-10785.
- [71] Lee, T., Zhang, X. A., Dhar, S., Faas, H., Lippard, S. J., Jasanoff, A. (2010). In vivo imaging with a cell-permeable porphyrin-based MRI contrast agent. *Chemistry and biology*, *17*, 665-673.

- [72] Choi, K. M., Lee, D. H., Jang, W. D. (2010). Supramolecular micelle from amphiphilic Mn (III)-porphyrin derivatives as a potential MRI contrast agent. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *31*, 639-644.
- [73] Mouraviev, V., Venkatraman, T. N., Tovmasyan, A., Kimura, M., Tsivian, M., Mouravieva, V., Lascola, C. (2012). Mn porphyrins as novel molecular magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of endourology*, *26*, 1420-1424.
- [74] Cheng, W., Ganesh, T., Martinez, F., Lam, J., Yoon, H., Macgregor, R. B., Zhang, X. A. (2014). Binding of a dimeric manganese porphyrin to serum albumin: towards a gadolinium-free blood-pool T₁ MRI contrast agent. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *19*, 229-235.
- [75] Haedicke, I. E., Li, T., Zhu, Y. L. K., Martinez, F., Hamilton, A. M., Murrell, D. H., Zhang, X. A. (2016). An enzyme-activatable and cell-permeable Mn III-porphyrin as a highly efficient T₁ MRI contrast agent for cell labeling. *Chemical science*, *7*, 4308-4317.
- [76] Alhamami, M., Cheng, W., Lyu, Y., Allen, C., Zhang, X. A., Cheng, H. L. M. (2018). Manganese-porphyrin-enhanced MRI for the detection of cancer cells: A quantitative in vitro investigation with multiple clinical subtypes of breast cancer. *Plos one*, *13*, 1-17.
- [77] Gupta, A., Caravan, P., Price, W. S., Platas-Iglesias, C., Gale, E. M. (2020). Applications for transition-metal chemistry in contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Inorganic chemistry*, *59*, 6648-6678.
- [78] Xie, D., Yu, M., Kadakia, R. T., Que, E. L. (2019). ¹⁹F magnetic resonance activity-based sensing using paramagnetic metals. *Accounts of chemical research*, *53*, 2-10.
- [79] Hequet, E., Henoumont, C., Muller, R. N., Laurent, S. (2019). Fluorinated MRI contrast agents and their versatile applications in the biomedical field. *Future medicinal chemistry*, *11*, 1157-1175.
- [80] Dolbier Jr, W. R. (2016). *Guide to fluorine NMR for organic chemists*. John Wiley & Sons.

- [81] Peterson, K. L., Srivastava, K., Pierre, V. C. (2018). Fluorinated paramagnetic complexes: sensitive and responsive probes for magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Frontiers in chemistry*, 6, 160.
- [82] Cho, M. H., Shin, S. H., Park, S. H., Kadayakkara, D. K., Kim, D., Choi, Y. (2019). Targeted, stimuli-responsive, and theranostic ¹⁹F magnetic resonance imaging probes. *Bioconjugate chemistry*, 30, 2502-2518.
- [83] Knight, J. C., Edwards, P. G., Paisey, S. J. (2011). Fluorinated contrast agents for magnetic resonance imaging; a review of recent developments. *Rsc Advances*, 1, 1415-1425.
- [84] Harvey, P., Kuprov, I., Parker, D. (2012). Lanthanide complexes as paramagnetic probes for ¹⁹F magnetic resonance. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 2015-2022.
- [85] Songca, S. P. (2001). In-vitro activity and tissue distribution of new fluorinated meso-tetrahydroxyphenylporphyrin photosensitizers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1469-1475.
- [86] Pandey, S. K., Gryshuk, A. L., Graham, A., Ohkubo, K., Fukuzumi, S., Dobhal, M. P., Pandey, R. K. (2003). Fluorinated photosensitizers: synthesis, photophysical, electrochemical, intracellular localization, in vitro photosensitizing efficacy and determination of tumor-uptake by ¹⁹F in vivo NMR spectroscopy. *Tetrahedron*, 59, 10059-10073.
- [87] Pinto, S. M., Calvete, M. J., Ghica, M. E., Soler, S., Gallardo, I., Pallier, A., Geraldes, C. F. (2019). A biocompatible redox MRI probe based on a Mn(II)/Mn(III) porphyrin. *Dalton Transactions*, 48, 3249-3262.
- [88] Dollé F. (2013). Carbon-11 and fluorine-18 chemistry devoted to molecular probes for imaging the brain with positron emission tomography. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56, 65-67.
- [89] Saha, G. B. (2016). Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry and Regulations, 3rd edition, *Springer*, 1, 1-18.

- [90] Shukla, A. K., Kumar, U. (2006). Positron emission tomography: An overview. *Journal of medical physics/Association of Medical Physicists of India*, 31, 13-21.
- [91] Saha, G. B. (2016). Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry and Regulations, 3rd edition, Springer, 3, 55-91.
- [92] Bailey, D. L., Maisey, M. N., Townsend, D. W., Valk, P. E. (2005). Positron emission tomography. *Springer*, 3, 41-62.
- [93] Ametamey, S. M., Honer, M., Schubiger, P. A. (2008). Molecular imaging with PET. *Chemical reviews*, 108, 1501-1516.
- [94] <https://multimodalneuroimaging.wordpress.com/2015/04/28/c-positron-emission-tomography/> (Dia 18 de Setembro às 15h10)
- [95] Waarde, A. V. (2012). Introduction on PET: Description of Basics and Principles. *Trends On The Role Of Pet In Drug Development*, 1-13.
- [96] Saha, G. B. (2016). Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry and Regulations, 3rd edition, Springer, 7, 143–160.
- [97] Kadrmas, D. J., Hoffman, J. M. (2013). Methodology for quantitative rapid multi-tracer PET tumor characterizations. *Theranostics*, 3, 757-773.
- [98] Dahl, K., Halldin, C., Schou, M. (2017). New methodologies for the preparation of carbon-11 labeled radiopharmaceuticals. *Clinical and translational imaging*, 5, 275-289.
- [99] Neumann, K., Flavell, R., Wilson, D. M. (2017). Exploring metabolism in vivo using endogenous ¹¹C metabolic tracers. *Seminars in nuclear medicine*, 47, 461-473.
- [100] Derlin, T., Grünwald, V., Steinbach, J., Wester, H. J., Ross, T. L. (2018). Molecular imaging in oncology using positron emission tomography. *Deutsches Ärzteblatt International*, 115, 175-181.
- [101] Jiang, L., Tu, Y., Shi, H., Cheng, Z. (2014). PET probes beyond ¹⁸F-FDG. *Journal of biomedical research*, 28, 435-446.

- [102] Jager, P. L., Vaalburg, W., Pruim, J., de Vries, E. G., Langen, K. J., Piers, D. A. (2001). Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *Journal of nuclear medicine*, 42, 432-445.
- [103] Milicevic Sephton, S., Aigbirhio, F. I. (2016). Radiosynthesis of Carbon-11 Labeled Puromycin as a Potential PET Candidate for Imaging Protein Synthesis in Vivo. *ACS medicinal chemistry letters*, 7, 647-651.
- [104] Hara, T. (2002). Review ^{11}C -Choline and 2-Deoxy-2- ^{18}F Fluoro-D-Glucose in Tumor Imaging with Positron Emission Tomography. *Molecular Imaging & Biology*, 4, 267-273.
- [105] Tian, M., Zhang, H., Oriuchi, N., Higuchi, T., Endo, K. (2004). Comparison of ^{11}C -choline PET and FDG PET for the differential diagnosis of malignant tumors. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 31, 1064-1072.
- [106] Anand, S. S., Singh, H., & Dash, A. K. (2009). Clinical applications of PET and PET-CT. *Medical Journal Armed Forces India*, 65, 353-358.
- [107] Fazaeli, Y., Jalilian, A. R., Amini, M. M., Aboudzadeh, M., Feizi, S., Rahiminezhad, A., Yousefi, K. (2013). Preparation, nano purification, quality control and labeling optimization of ^{64}Cu -5, 10, 15, 20-tetrakis (penta fluoro phenyl) porphyrin complex as a possible imaging agent. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 295, 255-263.
- [108] Kavali, R. R., Chul Lee, B., Seok Moon, B., Dae Yang, S., Soo Chun, K., Woon Choi, C., Yoon Chi, D. (2005). Efficient methods for the synthesis of 5-(4- ^{18}F fluorophenyl)-10, 15, 20-tris (3-methoxyphenyl) porphyrin as a potential imaging agent for tumor. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals: The Official Journal of the International Isotope Society*, 48, 749-758.
- [109] Fazaeli, Y., Jalilian, A. R., Amini, M. M., Ardaneh, K., Rahiminejad, A., Bolourinovin, F., Majdabadi, A. (2012). Development of a ^{68}Ga -fluorinated porphyrin complex as a possible PET imaging agent. *Nuclear medicine and molecular imaging*, 46, 20-26.
- [110] Waghorn, P. A. (2014). Radiolabelled porphyrins in nuclear medicine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 57, 304-309.

[111] Bhadwal, M., Das, T., Sarma, H. D., Banerjee, S. (2015). Radiosynthesis and bioevaluation of [^{68}Ga]-labeled 5,10,15,20-tetra(4-methylpyridyl)-porphyrin for possible application as a PET radiotracer for tumor imaging. *Molecular imaging and biology*, 17, 111-118.

[112] Simões, A. V., Pinto, S. M., Calvete, M. J., Gomes, C. M., Ferreira, N. C., Castelo-Branco, M., Abrunhosa, A. J. (2015). Synthesis of a new ^{18}F labeled porphyrin for potential application in positron emission tomography. In vivo imaging and cellular uptake. *RSC advances*, 5, 99540-99546.

[113] Gonçalves, N. P., Simões, A. V., Abreu, A. R., Abrunhosa, A. J., Dąbrowski, J. M., Pereira, M. M. (2015). Synthesis and biological distribution study of a new carbon-11 labeled porphyrin for PET imaging. Photochemical and biological characterization of the non-labeled porphyrin. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 19, 946-955.

[114] Fazaeli, Y., Hosseini, M. A., Shahabinia, F., Feizi, S. (2019). ^{68}Ga -5,10,15,20-Tetrakis (2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin: a novel radio-labeled porphyrin complex for positron emission tomography. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 320, 201-207.

Capítulo 2

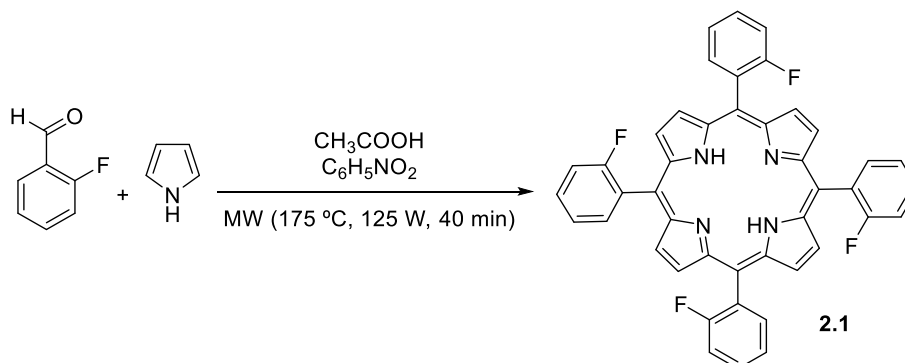
Síntese e caracterização estrutural de *meso*- arilporfirinas fluoradas e respectivos complexos metálicos

A introdução de átomos de flúor em compostos orgânicos tem merecido uma especial atenção visto que permite modelar as suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas.^{1,2} Além disso, compostos fluorados têm sido descritos com potenciais agentes de contraste para imagiologia de ^{19}F MRI.^{2,3} Como referido no Capítulo 1, a crescente aplicação de porfirinas em medicina desempenhou um papel fulcral no seu desenvolvimento, levando à melhoria dos métodos de síntese das mesmas bem como à sua modelação estrutural. Assim, a síntese de porfirinas com diferentes substituintes nas posições *meso* pode ser efetuada através de diferentes métodos, que envolvem a condensação do pirrole com uma mistura de diferentes aldeídos no vaso reacional, permitindo a obtenção de porfirinas contendo diferentes funcionalidades nos seus substituintes.⁴⁻⁶

Deste modo, a junção das já conhecidas propriedades dos macrociclos tetrapirrólicos, com a introdução de átomos de flúor na sua estrutura, poderá levar à obtenção de agentes de contraste com elevada sensibilidade para ^{19}F MRI. Neste sentido, um dos objetivos desta dissertação foi o desenvolvimento de métodos sintéticos sustentáveis para a obtenção de porfirinas de base livre e respetivos complexos de manganês, a sua caracterização físico-química e também a sua avaliação preliminar em termos de relaxação, como potenciais agentes de contraste ^{19}F MRI, apresentando-se de seguida os resultados obtidos.

2.1 Síntese de porfirinas fluoradas e respetivos complexos de manganês

De entre todos os métodos de síntese apresentados, para a síntese das *meso*-arilporfirinas apresentadas no Capítulo 1, foi selecionado para este estudo o método do nitrobenzeno recorrendo a aquecimento através da irradiação com micro-ondas (MW). É importante referir que a síntese de *meso*-arilporfirinas recorrendo a esta fonte de energia é um processo sustentável que permite não só reduzir o tempo de reação bem como aumentar a sua eficiência. Tal facto acontece, uma vez que enquanto o aquecimento convencional ocorre através da convecção, isto é, o aquecimento ocorre através da periferia para o centro, aquecendo inicialmente o vaso reacional e só depois a mistura reacional, no aquecimento por irradiação MW, o aquecimento ocorre de modo inverso, ou seja, a mistura reacional é aquecida a partir do centro para a periferia, resultando num aquecimento mais rápido e eficiente.^{7,8-11} Deste modo, começou por se sintetizar a porfirina simétrica 5,10,15,20-tetra(2-fluorofenil)porfirina **2.1** (TPP-*o*-F), de acordo com a reação apresentada no Esquema 2.1.



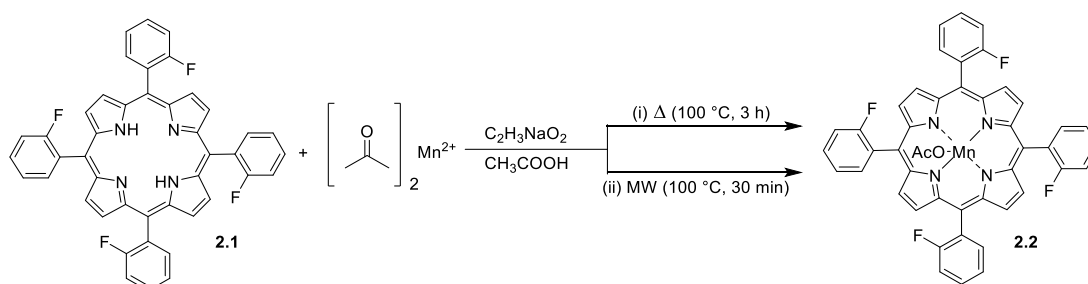
Esquema 2.1: Metodologia sintética seguida na preparação da porfirina TPP-*o*-F.

A reação foi conduzida utilizando irradiação MW com uma potência máxima de 125 W e uma temperatura de 175 °C, durante 40 minutos. Após terminada a reação, foi possível precipitar a porfirina **2.1** diretamente do meio reacional pela adição de metanol, tendo-se obtido após filtração e secagem, um rendimento de 13%. Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.¹²

Como mencionado anteriormente, neste estudo pretende-se desenvolver moléculas com potencialidade para aplicação como agentes de contraste para ^{19}F MRI. Relativamente a ^1H MRI, e tal como referido no Capítulo 1, a ^{19}F MRI apresenta variadas

vantagens, sendo a principal o facto da concentração de flúor no corpo humano ser abaixo dos 10^{-6} M, levando a que o sinal observado na imagem seja resultado apenas do agente de contraste. Contudo, os átomos de flúor apresentam uma velocidade de relaxação longitudinal lenta (r_1), entre 0,5 e 3 s^{-1} , o que implica um elevado tempo de aquisição. De modo a contornar esta desvantagem, têm sido descritos exemplos na literatura que evidenciam que a conjugação de compostos fluorados com átomos paramagnéticos permite reduzir o T_1 dos respetivos compostos de 1 s para 10 ms, permitindo uma aquisição mais rápida por unidade de tempo.¹³⁻¹⁵

Assim, procedeu-se à preparação do complexo de manganês da TPP-*o*-F tendo como objetivo avaliar o efeito da presença do Mn(III) na redução do tempo de relaxação T_1 . Numa experiência geral, a porfirina foi dissolvida numa solução de ácido acético saturada com acetato de sódio, seguindo-se a adição de um grande excesso de acetato de manganês (II) (Esquema 2.2). A reação foi seguida através de espectroscopia de absorção UV-Visível, sendo possível observar que as quatro bandas Q se transformavam em apenas 2 bandas e que a banda *Soret* sofre um desvio batocrómico. Após conclusão da reação, efetuaram-se várias extrações líquido-líquido, utilizando diclorometano e água de forma a remover o ácido acético e os sais ainda presentes. No final, foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica de modo a remover os resíduos de água resultantes das extrações e após filtração do agente secante, a fase orgânica foi evaporada.



Esquema 2.2: Metodologia sintética seguida no processo de complexação da porfirina TPP-*o*-F.

Inicialmente começou por se realizar a reação através de aquecimento convencional. Assim, estabeleceu-se a temperatura do banho de parafina nos $100 \text{ }^\circ\text{C}$, colocando-se de seguida a mistura reacional sob refluxo durante 3 h. Após se observar que a reação estava completa, através de espectroscopia UV-Visível, procedeu-se à devida purificação do crude, tendo-se obtido o complexo de manganês (III) **2.2** com um rendimento de 76%. Tendo como finalidade tornar a reação mais sustentável, otimizaram-se as

condições de reação de preparação do complexo metálico, usando irradiação MW ($P_{\text{máx}}=120$ W, 100 °C), tendo-se obtido o respectivo complexo metálico **2.2** após 30 minutos, com um rendimento de 81%. Após caracterização do complexo de manganês (Ver Capítulo 5 – Experimental, Secção 5.3.2) por espectrometria de massa, iniciaram-se os estudos de ^{19}F RMN preparando-se soluções das duas porfirinas, com concentrações na ordem dos 10^{-6} M, em DMSO- d_6 e adquirindo os respectivos espectros de ^{19}F RMN, que se apresentam na Figura 2.1.

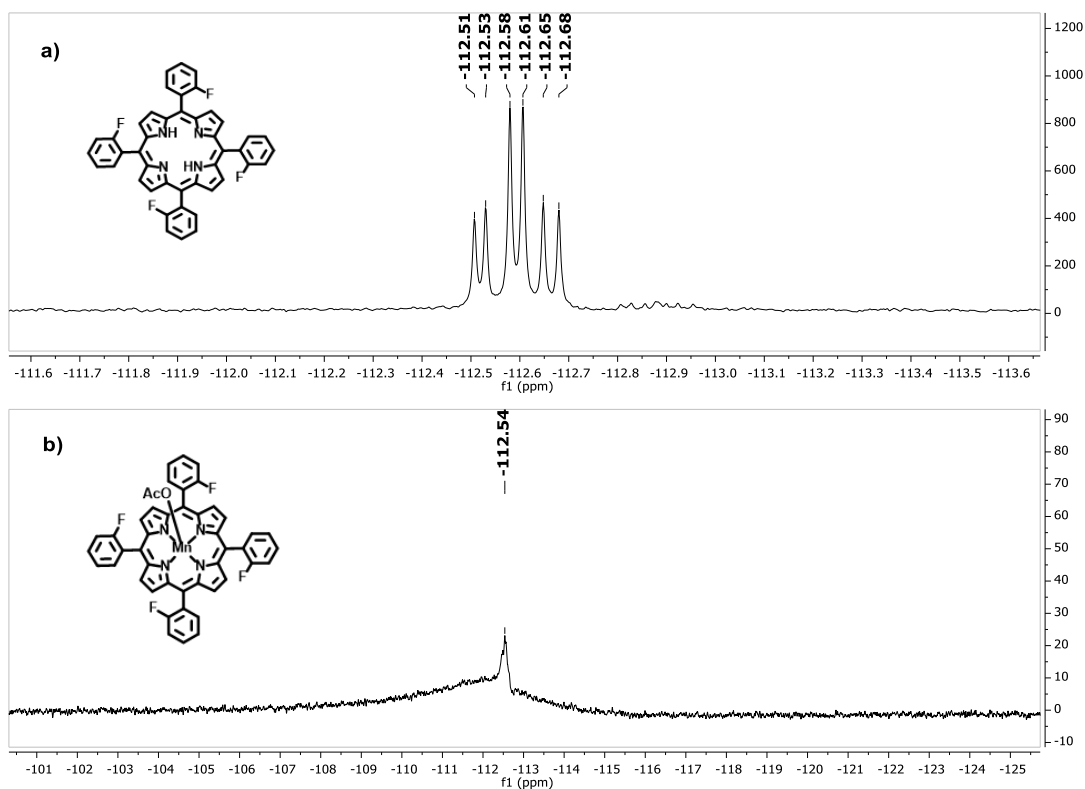


Figura 2.1: Espectro de ^{19}F RMN das porfirinas: a) TPP-*o*-F **2.1** e b) Mn(III)-TPP-*o*-F **2.2** em DMSO- d_6 .

Pela análise dos espectros de ^{19}F RMN, é possível observar que a porfirina TPP-*o*-F (Figura 2.1 a)) apresenta um multiplete com seis sinais distintos entre -112,51 e -112,68 ppm. Por sua vez, o respectivo complexo metálico (Figura 2.1 b)) apresenta apenas um sinal largo a -112,54 ppm, o que leva a uma redução significativa da intensidade do sinal. A supressão do sinal de ^{19}F da Mn(III)-TPP-*o*-F, poderá ser um indicador de que a sua aplicação em ^{19}F MRI não é exequível, visto que é importante que a molécula apresente um sinal intenso e bem definido.

Com o objetivo de colmatar as falhas apresentadas pela TPP-*o*-F, sintetizou-se a porfirina simétrica 5,10,15,20-tetra(4-trifluorometilfenil)porfirina **2.3** (TPP-*p*-CF $_3$). O

procedimento seguido foi semelhante ao descrito anteriormente, tendo-se obtido a porfirina de interesse com um rendimento de 30%. De seguida, procedeu-se à preparação do complexo de manganês através dos dois métodos descritos para a porfirina Mn(III)-TPP-*o*-F, tendo-se obtido a porfirina Mn(III)-TPP-*p*-CF₃ **2.4** com um rendimento de 76% quando a reação foi realizada através de aquecimento convencional a 100 °C durante 3 h e um rendimento de 85% quando utilizada irradiação MW, com $P_{\text{máx}}=120$ W, a 100 °C durante 30 minutos.

Os espetros de ^{19}F RMN da porfirina TPP-*p*-CF₃ e Mn(III)-TPP-*p*-CF₃ foram adquiridos em DMSO-*d*₆, estando representados na Figura 2.2, respetivamente. Pela análise das figuras é possível observar que ambas apresentam apenas um pico bem definido atribuído aos doze átomos equivalentes de flúor das porfirinas em estudo. Comparando os espetros obtidos para a porfirina de base livre **2.3** e respetivo complexo metálico **2.4**, é possível observar que o pico atribuído aos átomos de flúor da TPP-*p*-CF₃ se encontra a -60,55 ppm e para a Mn(III)-TPP-*p*-CF₃ o pico encontra-se a -61,11 ppm.

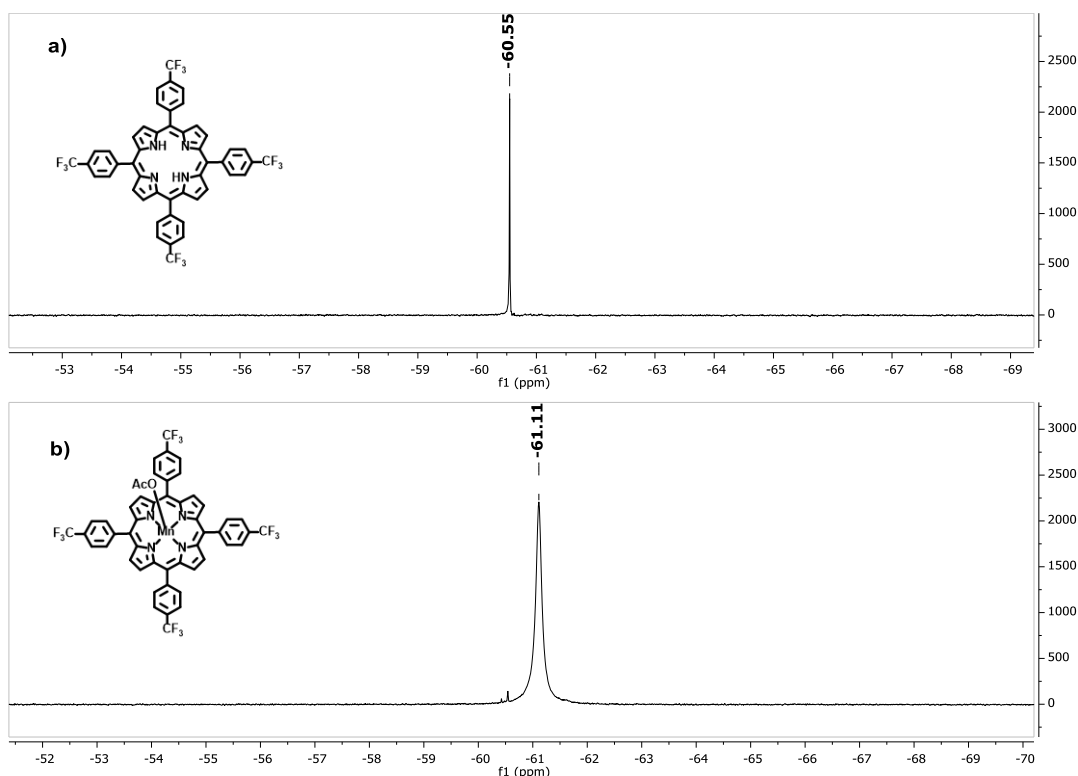


Figura 2.2: Espectro de ^{19}F RMN das porfirinas: a) TPP-*p*-CF₃ **2.3** e b) Mn(III)- TPP-*p*-CF₃ **2.4** em DMSO-*d*₆.

De acordo com a literatura¹³, a intensidade do sinal é maximizada quando a molécula em estudo apresenta uma ressonância de ^{19}F dominante, ou seja, quando todos os

átomos de flúor são quimicamente equivalentes, resultando num único sinal no espetro de ^{19}F RMN. Deste modo, para aplicação em ^{19}F MRI é preferível moléculas que apresentem grupos CF_3 homotópicos.¹⁶ Tal fator não é observado para a TPP-*o*-F, uma vez que esta apresenta anéis fenilo fluorados em *orto*, mas em contrapartida, é observado para a TPP-*p*- CF_3 , que apresenta anéis fenilo com grupos CF_3 em *para*. Assim, a redução significativa do sinal de ^{19}F nas porfirinas TPP-*o*-F **2.1** e Mn(III)-TPP-*o*-F **2.2** pode dever-se a dois fatores: (1) o sinal de ressonância de ^{19}F RMN da porfirina de base livre é um multiplete; (2) a distância entre o átomo paramagnético e os átomos de flúor é muito reduzida, fazendo com que o efeito do átomo seja muito acentuado, resultando numa elevada velocidade de relaxação.

Diversos estudos evidenciaram que a distância ideal entre metais lantanídeos paramagnéticos e complexos do tipo DOTA é de 4,5 Å a 7,5 Å.¹⁶ Até ao momento da escrita desta dissertação, não foram reportados estudos relativamente às distâncias entre os átomos paramagnéticos, nomeadamente o manganês, e os átomos de flúor presentes em porfirinas. Deste modo, e tendo como objetivo compreender a influência da distância dos átomos no sinal de ^{19}F MRI, procedeu-se à realização dos cálculos teóricos DFT da distância entre o átomo paramagnético de manganês e os átomos de flúor. Estes cálculos foram realizados pela Doutora Sandra Nunes do Grupo de Macromoléculas, Coloides e Fotoquímica do Centro de Química de Coimbra. Assim, após otimização estrutural, as distâncias foram calculadas através de cálculos DFT usando o funcional *B3LYP* e *6-31G(d,p)*. As distâncias obtidas foram de 5,7 Å e 9,8 Å para a TPP-*o*-F e TPP-*p*- CF_3 , respetivamente (Figura 2.3).

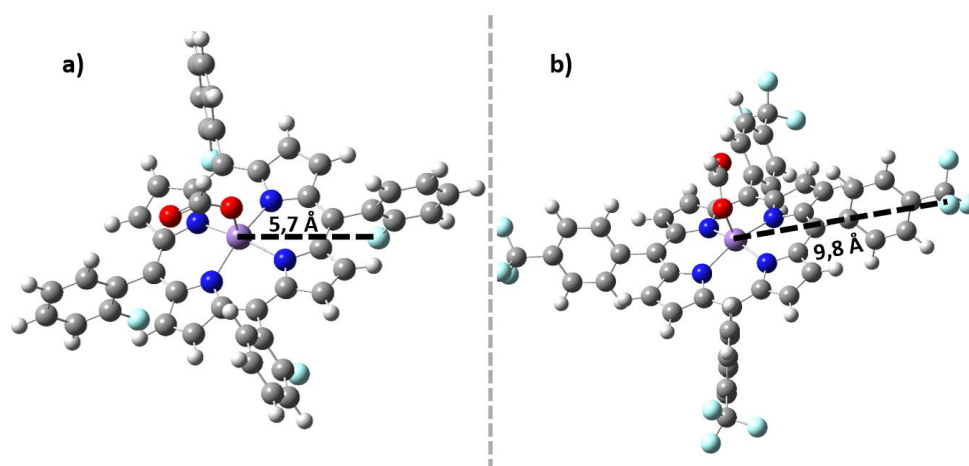
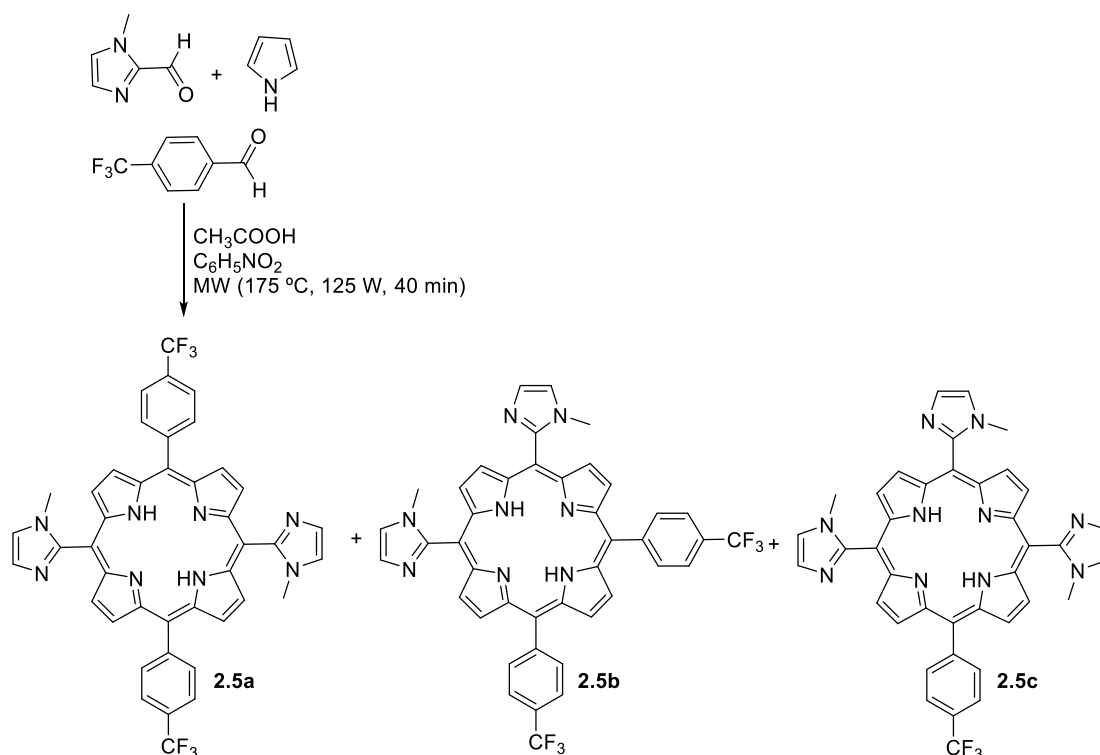


Figura 2.3: Representação das conformações de menor energia das porfirinas: a) Mn(III)- TPP-*o*-F **2.2** e b) Mn(III)- TPP-*p*-CF₃ **2.4**. As estruturas foram otimizadas através de cálculos DFT com os funcionais *B3LYP* e *6-31G(d,p)*.

É importante destacar que além da ressonância de ^{19}F dominante, a molécula deve idealmente apresentar solubilidade em meios biológicos e seletividade para células tumorais. Assim, sabendo que para aplicação de porfirinas em ^{19}F MRI é importante que estas apresentem grupos CF₃ homotópicos, que sejam solúveis em meios biológicos e que apresentem uma distância entre o átomo de manganês e os átomos de flúor de aproximadamente 9,8 Å, os estudos prosseguiram com a síntese da porfirina 5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina **2.5a** (DiIMIDiCF₃P). Sendo esta uma porfirina não simétrica, o procedimento seguido foi semelhante ao descrito anteriormente para a TPP-*o*-F, mas foi utilizada uma mistura de dois aldeídos, 1-metilimidazole-2-carboxaldeído e 4-(trifluorometil)-benzaldeído. Como esperado, esta mistura de aldeídos originou um conjunto de porfirinas não simétricas com diferentes substituintes, estando representado no Esquema 2.3 o esquema reacional seguido e os produtos obtidos.



Esquema 2.3: Metodologia sintética seguida na preparação da porfirina DiIMIDiCF₃P.

É importante notar que inicialmente, utilizou-se uma proporção de aldeídos de 3:1, isto é, 3 equivalentes de 1-metilimidazole-2-carboxaldeído para 1 equivalente de 4-(trifluorometil) benzaldeído, visto que este último é mais reativo comparativamente ao primeiro. Esta proporção de aldeídos favoreceu principalmente a 5-(4-trifluorometil)-10,15,20-tris(2-metilimidazol)porfirina **2.5c** (TriIMIMCF₃P), uma porfirina que possui apenas 3 átomos de flúor limitando a sua aplicação em ¹⁹F MRI. Deste modo, e com o propósito de favorecer as porfirinas com o mesmo número de grupos imidazole e grupos trifluorometilo, alterou-se a estequiometria da reação para 2 equivalentes de 1-metilimidazole-2-carboxaldeído e apenas 1 equivalente de 4-(trifluorometil)-benzaldeído. Os rendimentos obtidos para as diferentes porfirinas usando as diferentes proporções de aldeídos encontram-se sumarizados na Tabela 2.1. Apesar da diversidade de porfirinas obtidas, os estudos apresentados ao longo desta dissertação foram realizados para a porfirina DiIMIDiCF₃P **2.5a**, uma vez que esta apresenta simultaneamente um número equivalente de átomos de flúor, com uma distância ideal entre estes (9,8 Å) e o átomo paramagnético e ainda apresenta grupos imidazole que, após cationização, lhe permitem melhorar a sua solubilidade em meios biológicos.

Tabela 2.1: Otimizações realizadas para obtenção da porfirina **2.5a** e respectivos rendimentos.

Proporção de aldeídos		Rendimento dos produtos (%)		
1-metilimidazole-2-carboxaldeído	4-(trifluorometil) benzaldeído	2.5a	2.5b	2.5c
3	1	4	11	12
2	1	7	12	8

Atendendo à sua estrutura não foi possível induzir a precipitação da porfirina diretamente do meio reacional, tendo sido necessário proceder à evaporação dos solventes a pressão reduzida. De modo a isolar e purificar o produto de interesse, realizou-se uma coluna cromatográfica contendo gel de sílica como fase estacionária e como eluente foi utilizada uma mistura de diclorometano e *n*-hexano. De seguida, aumentou-se gradualmente a polaridade do eluente para diclorometano e em seguida para diclorometano-metanol. É de salientar que a alteração do eluente de apolar para polar deve ser feita de uma forma lenta e gradual para permitir a separação das diferentes porfirinas com estruturas e tempos de retenção no TLC muito semelhantes, muito em particular para separar as porfirinas isoméricas **2.5a** e **2.5b**. Após evaporação do solvente, observou-se por TLC e RMN que a porfirina de interesse **2.5a** ainda continha impurezas e por isso, realizaram-se sucessivas lavagens da mesma com éter dietílico e água, sendo no final precipitada com pentano. Em seguida, procedeu-se à caracterização da DiIMiDiCF₃P **2.5a**, recorrendo a ^1H RMN, ^{19}F RMN e ainda espectroscopia de massa.

Nas Figuras 2.4 e 2.5 apresentam-se os espectros de ^1H RMN obtidos para as porfirinas **2.5a** e **2.5b**.

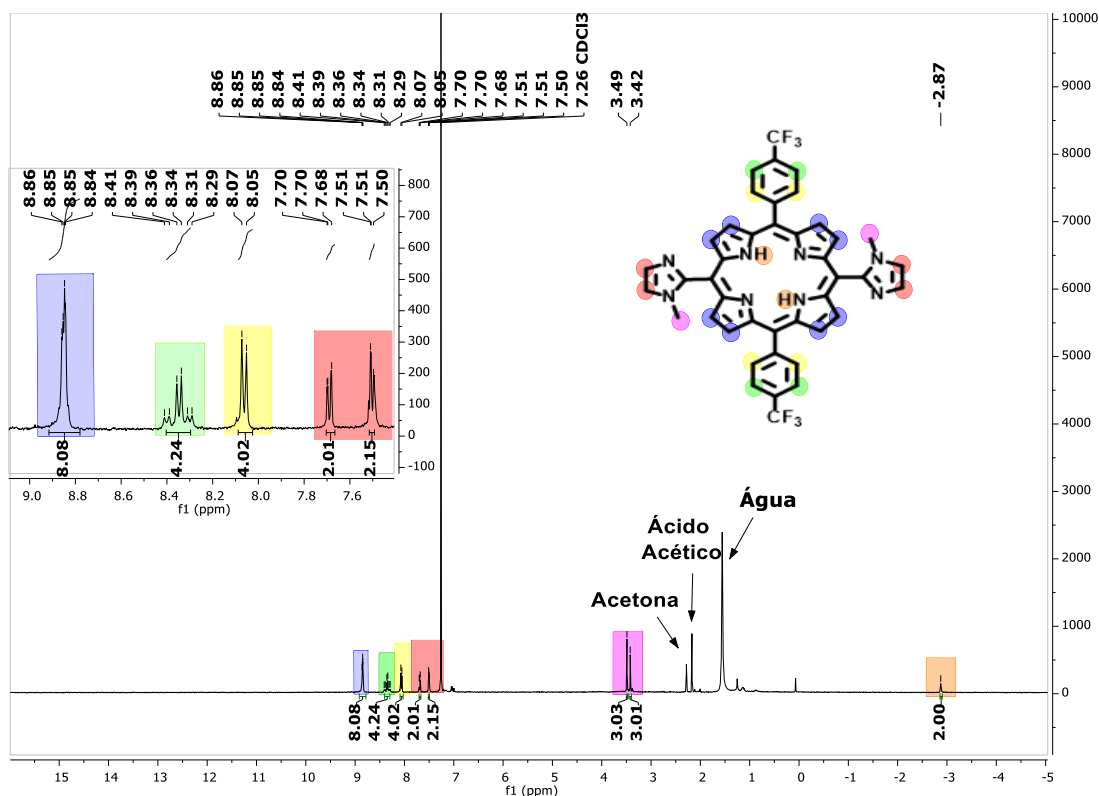


Figura 2.4: Espectro de ^1H RMN da DiIMiDiCF₃P **2.5a** em CDCl_3 , e respectiva ampliação da região aromática.

Da análise do espectro de ^1H RMN da porfirina **2.5a** é possível observar entre 8,86-8,84 ppm um multipletto, atribuído aos oito prótons β -pirrólicos, sendo feita esta atribuição uma vez que estes prótons se encontram desprotegidos devido aos fortes desvios resultantes da deslocalização de elétrons π do sistema aromático. Este sinal deveria ser um dupletto, contudo, devido à presença de atropisómeros observa-se um sinal mais complexo. O multipletto entre 8,41-8,29 ppm é atribuído aos prótons *meta* dos grupos fenilo, sendo estes os quatro prótons mais próximos do grupo CF_3 . Por sua vez, o dupletto a 8,07-8,05 ppm foi atribuído aos quatro prótons *orto* dos grupos fenilo, que se encontram próximos do macrociclo. Entre 7,70-7,68 ppm e 7,51-7,50 ppm apresentam-se quatro dupletos, cada um atribuído a dois prótons sendo estes sinais atribuídos os prótons do imidazole. Novamente, este sinal comprova a presença dos atropisómeros uma vez que seria de esperar dois dupletos. A 3,49 e 3,42 ppm apresentam-se dois singletos, cada um correspondente aos grupos metílicos diretamente ligados ao azoto do grupo imidazole. Uma vez que todos os prótons do grupo metilo do imidazole são equivalentes, seria de esperar um único singletto bem definido, tal não acontece devido à presença de atropisómeros, o que faz com que os

grupos metilo se encontrem em ambientes químicos diferentes, levando a que apareçam dois sinais distintos. Por fim, tipicamente o singlete a $-2,88$ ppm é atribuído aos dois prótons do interior do macrociclo, sendo este valor negativo devido ao forte efeito de proteção da corrente no anel aromático da porfirina.

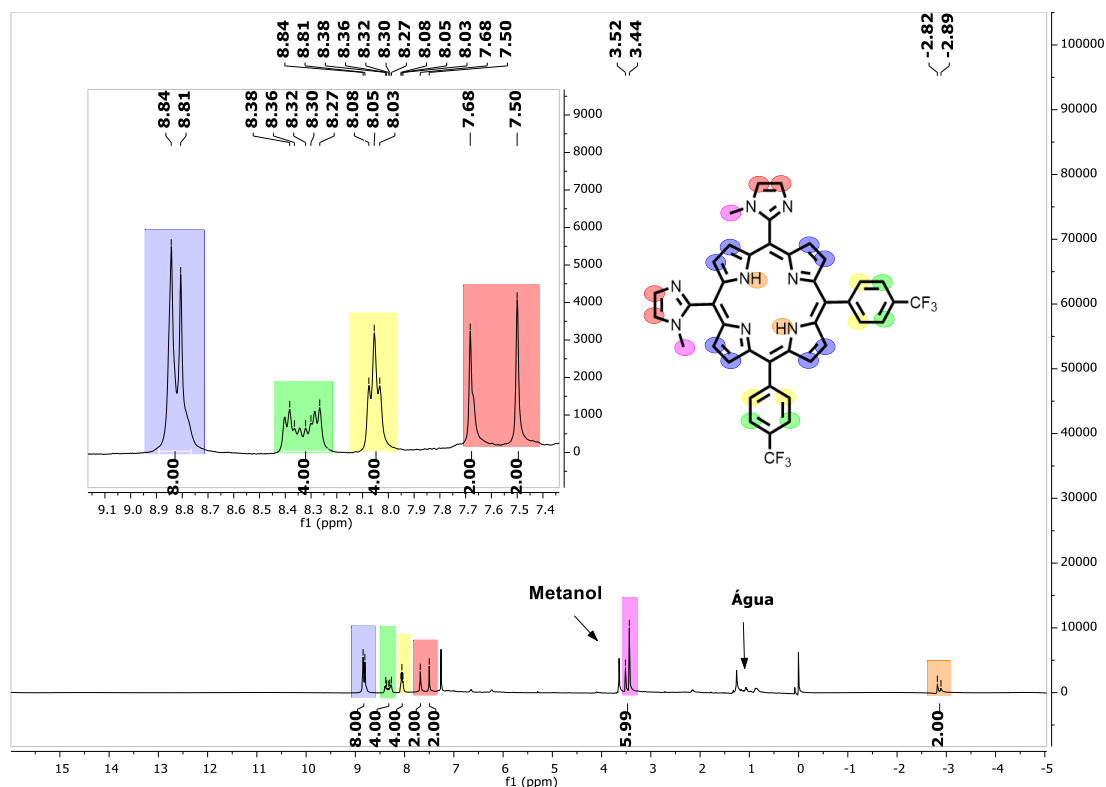


Figura 2.5: Espectro de ^1H RMN da porfirina **2.5b** em CDCl_3 , e respetiva ampliação da região aromática.

Da análise do espectro de ^1H RMN da porfirina **2.5b** é possível observar um multipletto entre 8,84-8,86 ppm, atribuído aos oito prótons β -pirrólicos. O multipletto entre 8,38-8,27 ppm é atribuído aos prótons *meta* dos grupos fenilo, sendo estes os quatro prótons mais próximos do grupo CF_3 . Por sua vez, o triplete a 8,08-8,03 ppm, atribuído aos quatro prótons *orto* dos grupos fenilo, que se encontram próximos do macrociclo. A 7,68 ppm e 7,50 apresentam-se dois singletos, cada um atribuído a dois prótons sendo estes sinais atribuídos os prótons do imidazole. A 3,52 e 3,44 ppm apresentam-se dois singletos, cada um correspondente aos grupos metílicos diretamente ligados ao azoto do grupo imidazole. Por fim, o sinal entre $-2,82$ e $-2,89$ ppm é atribuído aos dois prótons do interior do macrociclo.

Sendo o principal objetivo avaliar as potencialidades destes compostos no desenvolvimento de potenciais agentes de contraste para ^{19}F MRI, os estudos prosseguiram com o registo do espectro de ^{19}F RMN. Na Figura 2.6 apresenta-se uma sobreposição dos espectros de ^{19}F das porfirinas **2.5a** e **2.5b** e como seria expectável não se observaram diferenças significativas entre as duas porfirinas.

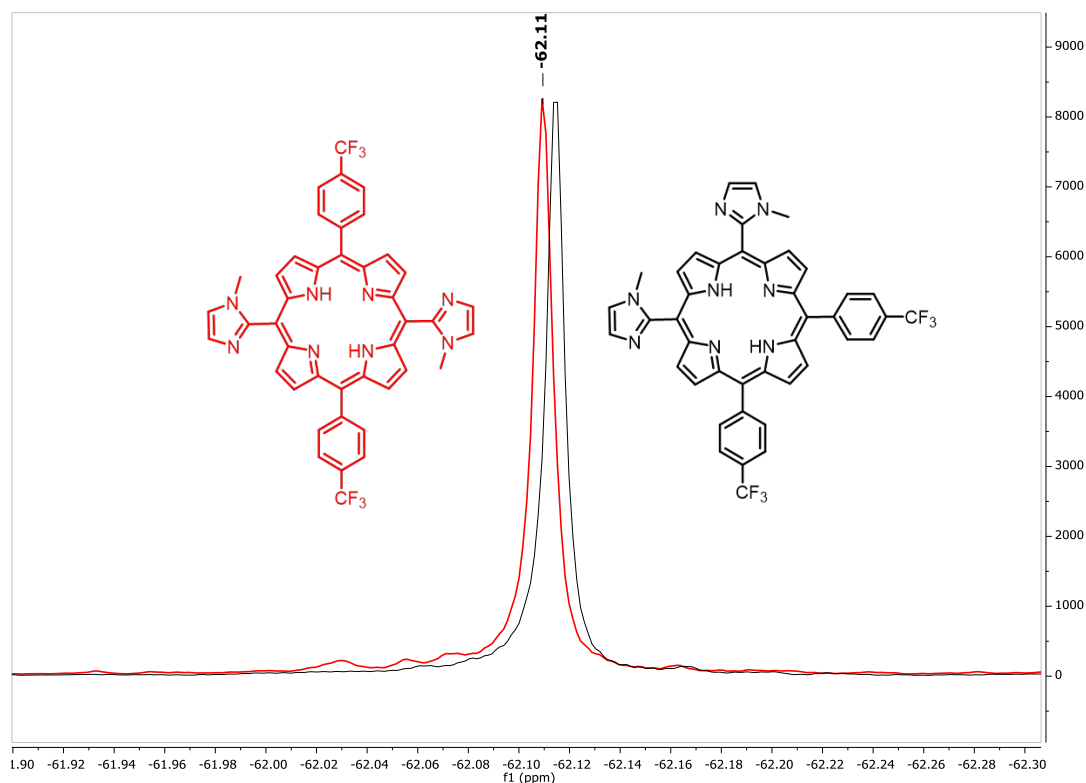


Figura 2.6: Sobreposição dos espectros de ^{19}F RMN das porfirinas **2.5a** e **2.5b**, em CDCl_3 .

Através da análise do espectro de ^{19}F RMN, é possível observar, para os dois compostos, a presença de um único sinal, um singleto bem definido a $-62,11$ ppm que é atribuído à ressonância dos 6 átomos de flúor quimicamente equivalentes.

De modo a complementar a caracterização dos novos compostos sintetizados, obtiveram-se os espectros de massa pela técnica de ionização ESI-TOF. Como exemplo, na Figura 2.7, apresenta-se o espectro da porfirina DiIMiDiCF₃P **2.5a**, onde se pode observar o ião molecular $[\text{M}+\text{H}^+]$ com uma massa de 759,2418.

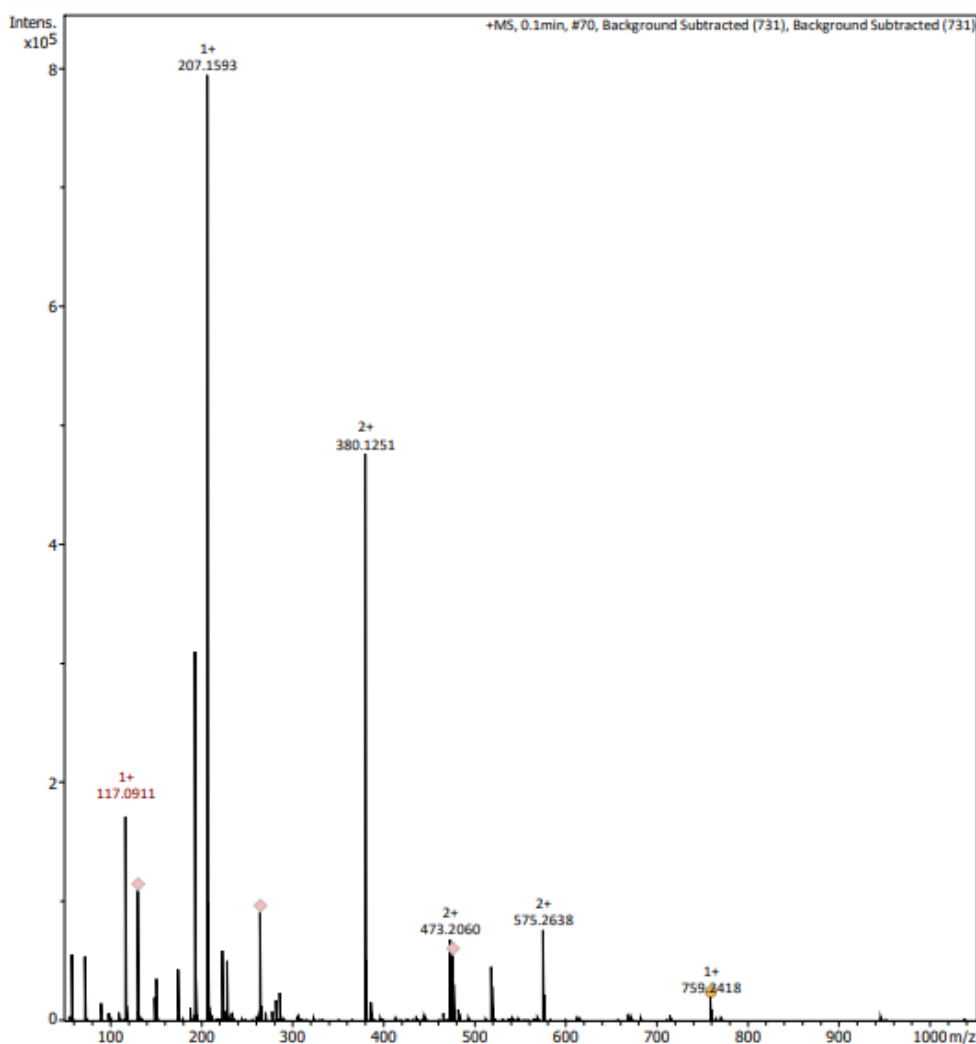


Figura 2.7: Espectro de massa ESI para a porfirina DiIMiDiCF₃P **2.5a** adquirida no modo positivo.

Tendo a DiIMiDiCF₃P **2.5a** isolada e caracterizada procedeu-se à preparação do respetivo complexo de manganês recorrendo aos dois métodos descritos anteriormente (aquecimento convencional e irradiação MW). Após isolamento e purificação obteve-se o complexo Mn(III)-DiIMiDiCF₃P **2.6** com um rendimento de 77% quando a reação foi realizada através de aquecimento convencional e um rendimento de 80% quando realizada através de irradiação MW.

Tendo como objetivo aumentar a biocompatibilidade do complexo de Mn(III)-DiIMiDiCF₃P, procedeu-se à cationização dos dois grupos imidazole. Para tal, a porfirina **2.6** foi dissolvida em DMF e, inicialmente, adicionaram-se 0,1 mL de iodeto de metilo. A mistura foi aquecida e deixada em agitação a 25 °C. Ao longo do dia foram adicionadas pequenas quantidades de iodeto de metilo até se obter um máximo de 100 equivalentes. Após 12 horas, procedeu-se à análise por TLC e deu-se a reação por

concluída. O DMF foi evaporado a pressão reduzida e após sucessivas lavagens com éter dietílico obteve-se a porfirina Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat **2.7** de interesse com um rendimento de 89%.

Proseguindo com os objetivos desta dissertação, os estudos continuaram com o registo dos espectros de ¹⁹F RMN das porfirinas DiIMIDiCF₃P e Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat (Figura 2.8) em DMSO-d₆. Observou-se que o espectro de ¹⁹F da porfirina de base livre apresenta um sinal intenso com desvio químico de -60,57 ppm e o respetivo complexo de Mn(III) apresenta dois sinais alargados a δ= -61,20 e -61,38 ppm. O alargamento do sinal observado para o complexo de manganês poderá ser devido à formação de agregados ou agregação devido ao solvente utilizado. Assim, adquiriram-se novamente os espectros, mas utilizando metanol deuterado (Figura 2.9), tendo-se observado uma melhoria na definição do sinal para o complexo de manganês.

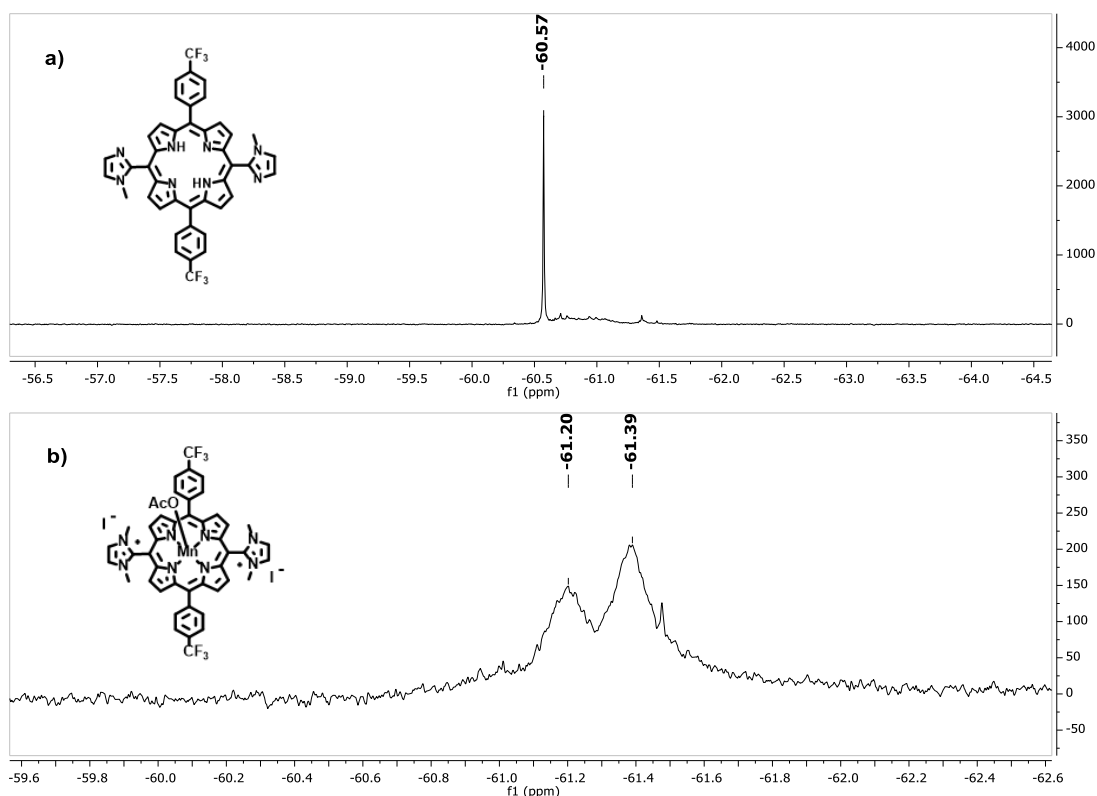


Figura 2.8: Espectro de ¹⁹F RMN das porfirinas: a) DiIMIDiCF₃P e b) Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat em DMSO-d₆.

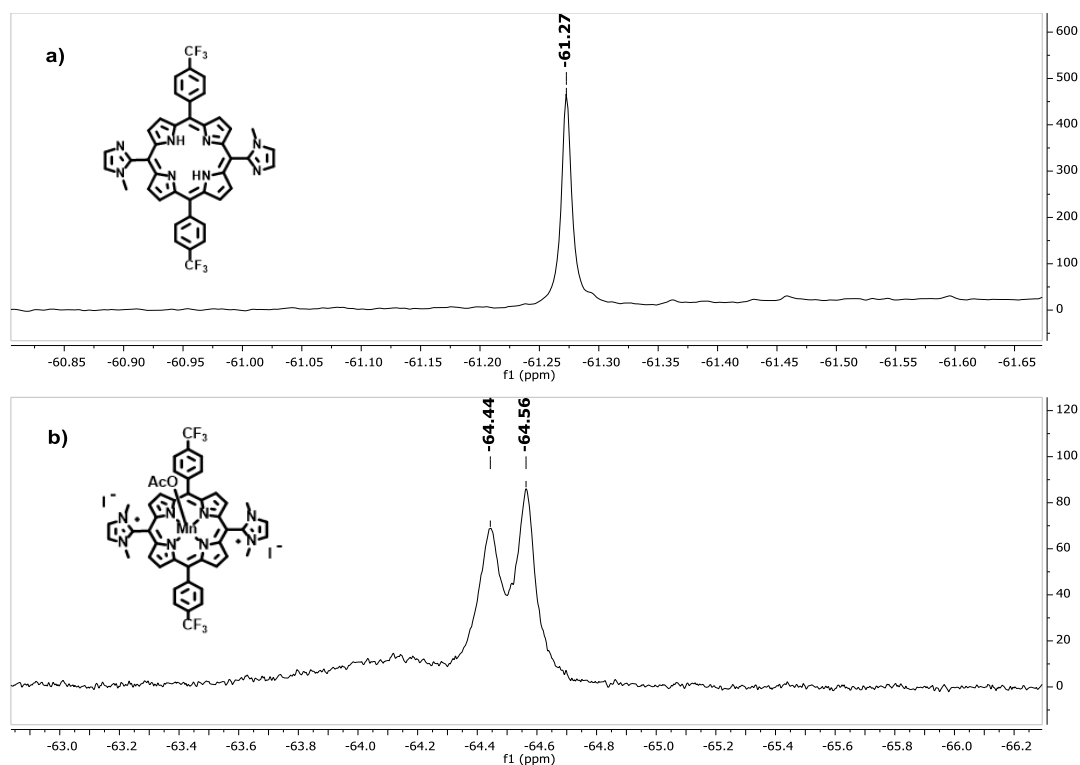


Figura 2.9: Espectro de ^{19}F RMN das porfirinas: a) DiIMIDiCF₃P **2.5a** e b) Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat **2.7** em MeOD.

De seguida, e recorrendo ao método sintético referido anteriormente, sintetizou-se a 5,10,15,20-tetra(6-(trifluorometil)piridin-3-il)porfirina (TPyP-CF₃) **2.8**. Neste caso foi possível precipitar a porfirina TPyP-CF₃ diretamente do meio reacional por precipitação após adição de éter dietílico, tendo-se obtido após filtração um rendimento de 21%.

Na Figura 2.10 apresenta-se o espectro de RMN protónico da porfirina TPyP-CF₃, onde se observam 5 sinais distintos. Um sinal na forma de singlete a 9,58 ppm atribuído aos quatro prótons mais desprotegidos, uma vez que são os prótons mais próximos do átomo de azoto do anel piridil. A 8,86 ppm observa-se um singlete atribuído aos oito prótons β -pirrólicos e um duplete entre 8,74-8,72 ppm atribuído aos quatro prótons *meta* dos grupos piridil. Por sua vez, o duplete a 8,22-8,20 ppm foi atribuído aos quatro prótons *orto* dos grupos piridil, que se encontram próximos do macrociclo. Por fim, observa-se um singlete a -2,85 ppm, sendo este atribuído aos dois prótons do interior do macrociclo.

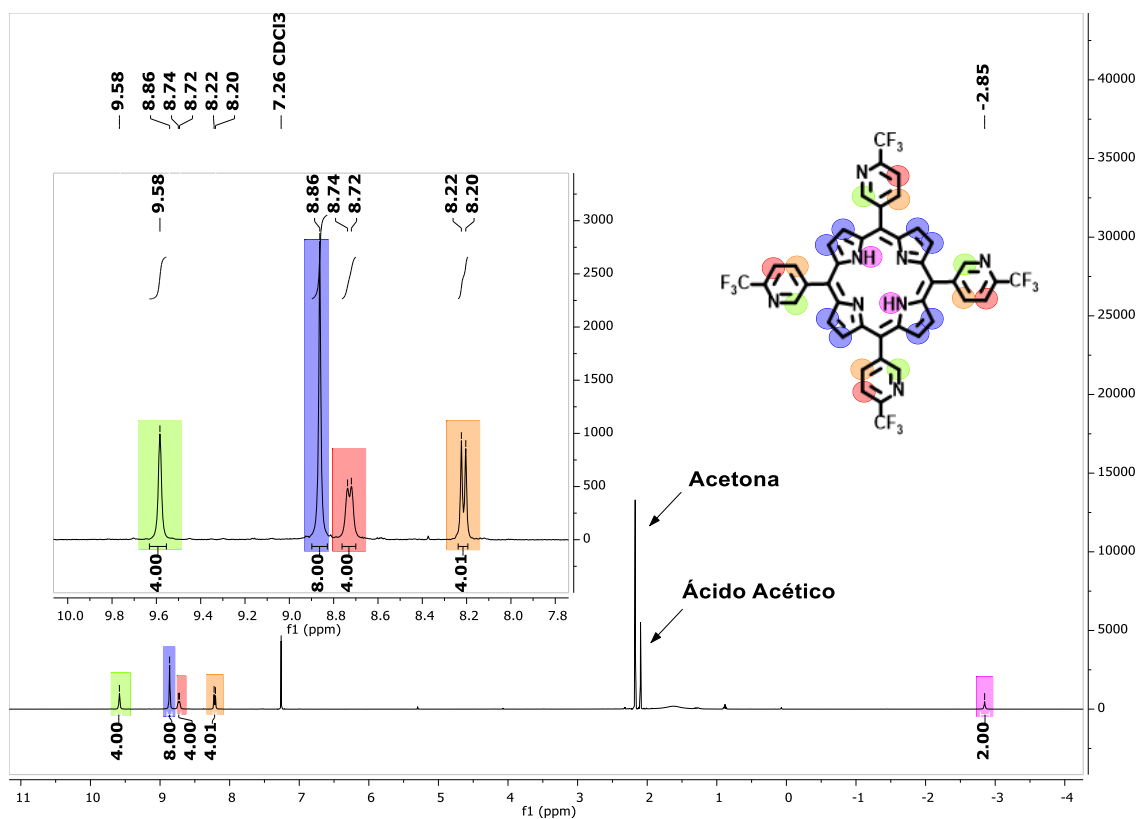


Figura 2.10: Espectro de ^1H RMN da TPyP- CF_3 , em CDCl_3 , e respetiva ampliação.

Para além da análise por ^1H RMN, efetuou-se a análise do espectro de massa obtido com a técnica de ionização ESI-TOF, onde é possível observar a presença do ião molecular $[\text{M}+\text{H}^+]$ a 891,1864 (Figura 2.11).

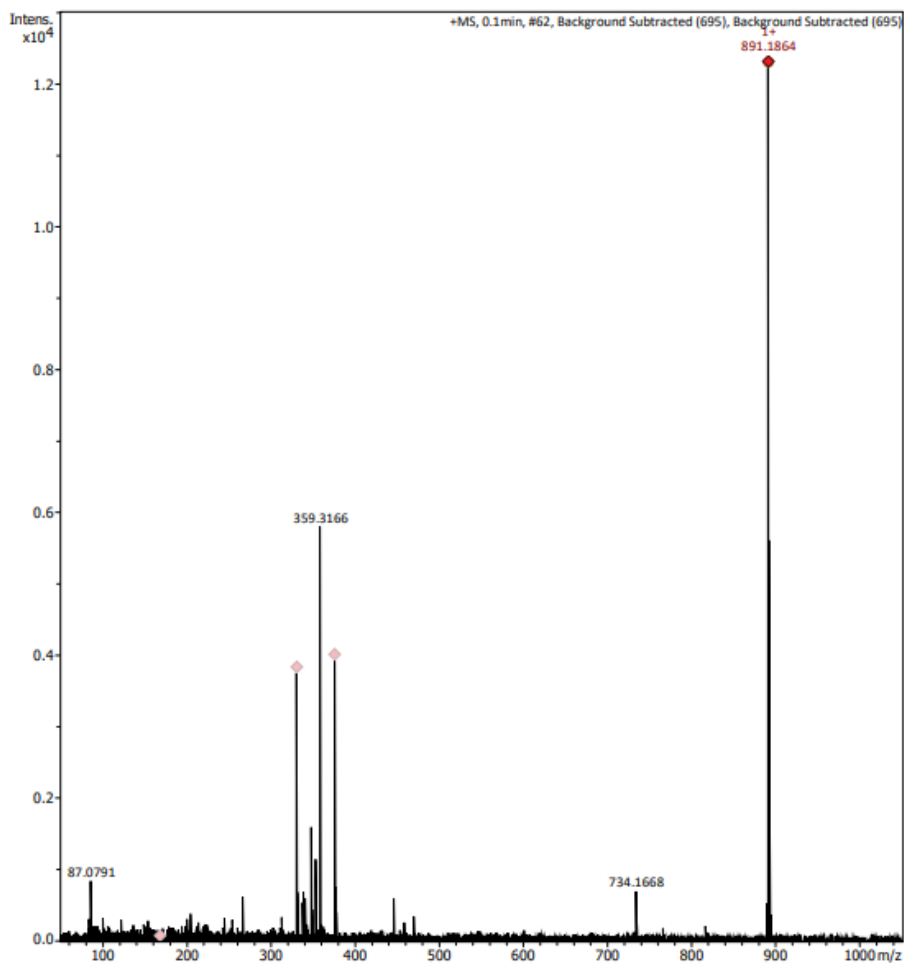


Figura 2.11: Espectro de massa ESI para a TPYP-CF₃ adquirida no modo positivo.

Tal como descrito para as porfirinas sintetizadas anteriormente, a preparação do complexo de manganês da TPYP-CF₃ foi realizada pelos dois métodos previamente descritos. Após conclusão da reação foram efetuadas várias extrações líquido-líquido, utilizando diclorometano e água, sendo no final adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica, sendo esta posteriormente evaporada, permitindo obter a porfirina Mn(III)-TPYP-CF₃ **2.9** com um rendimento de 62% quando a reação foi realizada através de aquecimento convencional (100 °C durante 3 h) e um rendimento de 79% quando utilizada irradiação MW ($P_{\text{máx}}=120$ W, a 100 °C durante 30 minutos). Novamente, os espectros de ^{19}F RMN da porfirina TPYP-CF₃ e Mn(III)-TPYP-CF₃ foram adquiridos em DMSO-d₆, estando representados na Figura 2.12, respetivamente.

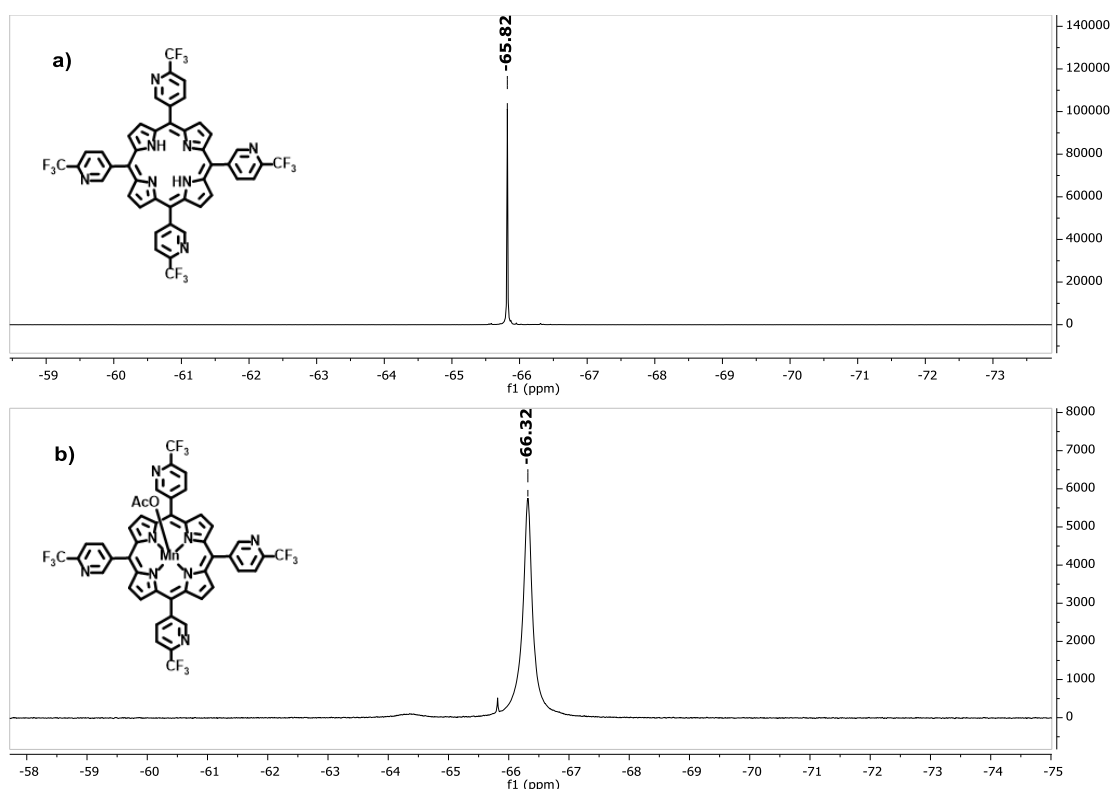


Figura 2.12: Espectro de ^{19}F RMN das porfirinas: a) TPyP-CF₃ **2.8** e b) Mn(III)-TPyP-CF₃ **2.9** em DMSO-d₆.

A observação dos espectros de ^{19}F dos dois compostos permite concluir que tanto a porfirina de base livre como o respetivo complexo de Mn(III) são promissores para os fins pretendidos, visto que apresentam apenas um pico bem definido, na zona dos -65,82 ppm e -66,32 ppm, respetivamente. Este pico, em ambas as porfirinas foi atribuído aos doze átomos de flúor que são quimicamente equivalentes, observando-se apenas um ligeiro desvio devido à presença do átomo de manganês.

As porfirinas TPyP-CF₃ **2.8** e Mn(III)-TPyP-CF₃ **2.9** não são solúveis em meios biológicos. Atualmente, encontra-se a ser desenvolvido no laboratório de Catálise & Química Fina um procedimento experimental de forma a cationizar as respetivas porfirinas.

2.2 Tempos de relaxação

Tendo sintetizado no trabalho experimental conducente à escrita desta dissertação uma série de porfirinas fluoradas assim como os respetivos complexos de Mn(III) e pretendendo selecionar-se uma delas como composto líder para potencial

desenvolvimento de um AC de ^{19}F para MRI, os estudos prosseguiram com a determinação dos tempos de relaxação longitudinal T_1 e transversal T_2 .

Para tal, foram preparadas soluções das porfirinas **2.1-2.5a**, **2.7-2.9** com concentrações na ordem dos 10^{-6} M em DMSO- d_6 e MeOD, de acordo com a solubilidade das mesmas. Os resultados obtidos para T_1 e T_2 apresentam-se na Tabela 2.2.

É importante notar que para o cálculo do T_1 , o tempo necessário para o componente z da magnetização retornar 63% em direção ao estado de equilíbrio após sujeita a um impulso de radiofrequência (Figura 2.13), foi utilizada uma recuperação de inversão seqüência de impulso, de acordo com a equação geral:

$$M_z(t) = M_0 \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right]$$

Onde $M_z(t)$ se refere à magnetização do longo do eixo z, M_0 se refere à magnetização inicial, t corresponde ao tempo e T_1 ao tempo de relaxação longitudinal.

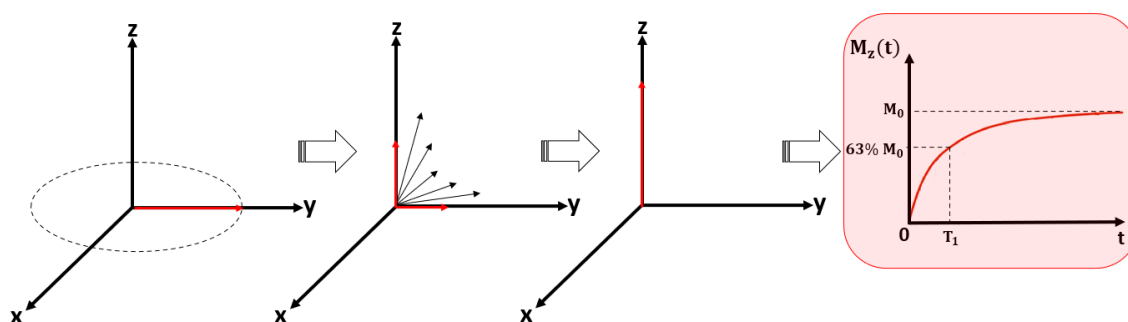


Figura 2.13: Processo de relaxação longitudinal (T_1).

Por sua vez, para o cálculo do T_2 , o tempo necessário para a componente transversal (eixo xy) da magnetização decair para 37% do seu valor inicial (Figura 2.14), foi utilizada uma seqüência spin-eco CPMG, de acordo com a equação geral:

$$M_{xy}(t) = M_0 \times \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

Onde $M_{xy}(t)$ se refere à magnetização no plano xy, M_0 se refere à magnetização inicial, t corresponde ao tempo e T_2 ao tempo de relaxação transversal.

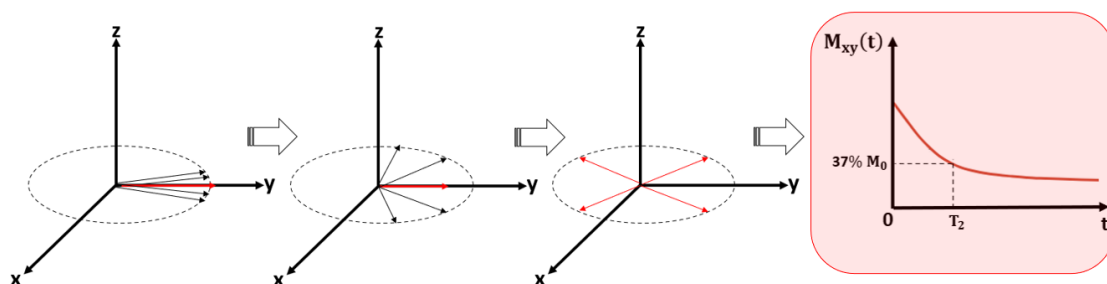


Figura 2.14: Processo de relaxação transversal (T_2).

É importante referir que os espectros que posteriormente permitiram o cálculo dos diferentes tempos de relaxação foram adquiridos a 25 °C.

Tabela 2.2: Tempos de relaxação T_1 e T_2 (ms) de ^{19}F e respectivas velocidades de relaxação r_1 e r_2 (s^{-1}), obtidas para as porfirinas em estudo e respectivos complexos de manganês, em DMSO- d_6 e MeOD.

Relaxação ^{19}F MRI					
Entrada	Composto	T_1 (ms)	r_1 (s^{-1})	T_2 (ms)	r_2 (s^{-1})
1	TPP- <i>o</i> -F 2.1 ⁱ⁾	884	1,1	52	19,2
2	Mn(III)-TPP- <i>o</i> -F 2.2 ⁱ⁾	--	--	--	--
3	TPP- <i>p</i> -CF ₃ 2.3 ⁱ⁾	916	1,1	652	1,5
4	Mn(III)-TPP- <i>p</i> -CF ₃ 2.4 ⁱ⁾	14	71,4	3,0	333,3
5	DiIMIDiCF ₃ P 2.5a ⁱⁱ⁾	849	1,2	496	2,0
6	Mn(III)-DiIMIDiCF ₃ PCat 2.7 ⁱⁱ⁾	15	66,9	3,9	250,6
7	TPyP-CF ₃ 2.8 ⁱ⁾	1342	0,8	323	3,1
8	Mn(III)-TPyP-CF ₃ 2.9 ⁱ⁾	10	95,4	7,0	148,8

i) DMSO- d_6 ; ii) MeOD

Pela análise da Tabela 2.2, é possível observar que a TPP-*o*-F **2.1** (Tabela 2.2, Entrada 1) apresenta um valor de T_1 de 884 ms e de T_2 de 52 ms. Para o respetivo complexo de manganês (Tabela 2.2, Entrada 2), como observado anteriormente, o espectro de ^{19}F RMN apresenta um sinal largo devido à elevada velocidade de relaxação, impedindo assim o cálculo dos tempos de relaxação, comprovando a importância da distância entre o átomo paramagnético e os átomos de flúor. No caso da TPP-*p*-CF₃ **2.3** (Tabela 2.2, Entrada 3), observa-se que esta porfirina de base livre apresenta tempos de relaxação longos, com um valor de T_1 de 916 ms e T_2 de 652 ms. Por sua vez, a introdução do

átomo de manganês (Tabela 2.2, Entrada 4) levou a uma redução do T_1 e T_2 para 14 ms e 3 ms, respectivamente, aumentando a velocidade de relaxação (r_1 e r_2). Para as porfirinas DiIMiDiCF₃P **2.5a**, Mn(III)-DiIMiDiCF₃PCat **2.7**, TPyP-CF₃ **2.8** e Mn(III)-TPyP-CF₃ **2.9** (Tabela 2.2, Entradas 5-8), os valores obtidos para ambos os tempos de relaxação (T_1 e T_2) foram semelhantes aos obtidos para a TPP-*p*-CF₃, sendo este resultado expectável, uma vez que ambas as porfirinas de base livre apresentam grupos CF₃ homotópicos e os respetivos complexos de manganês apresentam distâncias entre o átomo paramagnético e os átomos de flúor semelhantes. Posto isto, de um modo geral, pode-se concluir que a complexação de porfirinas com manganês, quando apresenta uma distância adequada, permite a redução dos valores de T_1 da zona dos 1000 ms para a zona dos 10 ms e a redução dos valores de T_2 da zona dos 300-500 ms para a zona dos 3-10 ms, estando estes resultados de acordo com os valores descritos na literatura para diferentes compostos e respetivos complexos paramagnéticos.¹⁴

2.3 Coeficiente de partição

A absorção, biodistribuição, metabolização e a excreção de um fármaco é dependente da sua afinidade com a membrana celular. Deste modo, é fundamental realizar a previsão desta afinidade, sabendo que as moléculas para atingirem o meio intracelular da célula alvo, passam de um meio extracelular aquoso para um meio hidrofóbico (lípidos membranares) e de seguida para um meio aquoso intracelular.¹⁷

Assim, para simular este processo e prever o comportamento *in vivo* da permeação de fármacos através das membranas celulares recorre-se a diversos modelos experimentais, sendo o coeficiente de partição octanol-água (CP) o mais utilizado pela indústria farmacêutica.^{17,18} Este modelo centra-se no equilíbrio entre 1-octanol e água, visto que o álcool possui uma cadeia alquílica longa e um grupo funcional com características de aceitador e dador de ligação de hidrogénio, simulando assim os fosfolípidos das membranas celulares. Além disso, o 1-octanol é capaz de dissolver uma ampla gama de compostos orgânicos e é transparente no ultravioleta, permitindo determinações espectroscópicas sem interferências.

Deste modo, o coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração de composto (porfirina) na fase orgânica (C_o) e na fase aquosa (C_w):

$$CP = \frac{C_0}{C_w}$$

De acordo com a literatura, são dois os métodos mais utilizados para a determinação dos coeficientes de partição. O primeiro baseia-se na determinação dos coeficientes de partição de analitos neutros e recorre ao HPLC com coluna de fase reversa (saturada com 1-octanol) e água como fase móvel.¹⁹ O segundo método, conhecido como “*shake-flash method*”^{20,21} baseia-se na agitação da amostra em estudo numa mistura de água e 1-octanol, seguido da quantificação da concentração do composto nas duas fases através de técnicas espectroscópicas de fluorescência ou UV-Visível, após determinadas as curvas de calibração com os padrões adequados.

Deste modo, para a determinação do coeficiente de partição da Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat **2.7**, recorreu-se ao “*shake-flash method*”, onde a fase utilizada foi o 1-octanol e como fase aquosa utilizou-se uma solução tampão fosfato, PBS. Foi usada uma solução tampão em vez de água destilada, tendo como objetivo simular o ambiente celular.¹⁷

Deste modo, começaram por se calcular os valores dos coeficientes de partição da porfirina **2.7** em ambos os solventes utilizados, PBS e 1-octanol. Para tal, foram preparadas duas soluções base com ~1 mg de Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat **2.7**, tendo sido preparadas 7 novas soluções obtidas por diluições sucessivas, com concentrações entre 10⁻⁷ a 10⁻⁶ M.

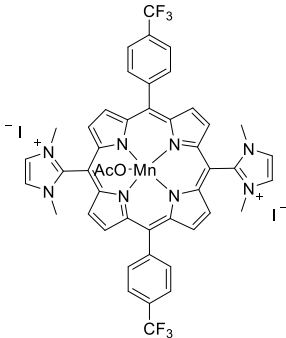
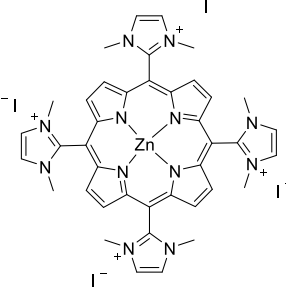
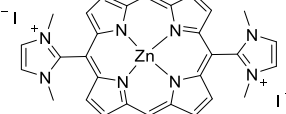
Para o cálculo dos coeficientes de partição, o composto foi dissolvido num volume definido de 1-octanol anteriormente saturado com PBS e, de seguida, adicionou-se um volume igual de PBS saturado com 1-octanol. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 3700 rpm, durante 5 minutos, a 25 °C. De seguida, foram recolhidos volumes definidos de ambas as fases (1-octanol e PBS), diluídos e foram adquiridos os espectros de UV-Visível. Tendo os espectros de UV-Visível e respetivas absorções e concentrações, foi possível proceder ao cálculo do coeficiente de partição através da seguinte equação:

$$\log P_{ow} = \log \left(\frac{Abs_{1-octanol}}{\epsilon_{1-octanol}} \right) / \left(\frac{Abs_{PBS}}{\epsilon_{PBS}} \right)$$

Deste modo, para a porfirina **2.7** foi obtido um $\log P_{ow}=1,82$, demonstrando a lipofilicidade do composto em estudo. Sendo a lipofilicidade um parâmetro que relaciona a permeabilidade da membrana e, portanto, a absorção e distribuição, com a via de depuração, este carácter lipofílico do composto poderá ser um indicador primário da capacidade da porfirina **2.7** penetrar a bicamada lipídica das membranas celulares, atingindo o meio intracelular da célula alvo.²²

Como observado na Tabela 2.3, estudos reportados na literatura,²³ demonstraram que porfirinas tetra e di substituídas com grupos imidazole catiónicos apresentam valores de coeficientes de partição de -1,81 e -1,16, respetivamente. Estes valores evidenciam a hidrofiliicidade destes compostos, uma vez que possuem quatro e duas cargas positivas, particionando mais facilmente para a fase aquosa. O mesmo não se observa para a porfirina em estudo **2.7**, evidenciando que o grupo fenilo e os átomos de flúor induzem um carácter hidrofóbico à mesma.²⁴

Tabela 2.3: Valores dos coeficientes de partição da porfirina sintetizada **2.7** e exemplos reportados na literatura.

Coeficiente de partição		
Entrada	Composto	Log P
1		1,82
2		-1,81 ²³
3		-1,16 ²³

2.4 Caracterização fotofísica das porfirinas sintetizadas e dos respectivos complexos metálicos

De modo a complementar os estudos de caracterização realizados anteriormente, efetuou-se também a determinação de alguns parâmetros fotofísicos para todas as porfirinas sintetizadas e respectivos complexos metálicos, salientando-se a caracterização das porfirinas **2.5a** e **2.8** bem como os respectivos complexos metálicos, uma vez que estes compostos ainda não foram reportados na literatura.

2.4.1 Espectroscopia de UV-Visível

As porfirinas apresentam um sistema de eletrões π deslocalizados, o que faz com que sejam capazes de absorver radiação na zona do UV-Visível e, por isso, apresentam um espectro na zona do UV-Visível muito característico.

De acordo com a terminologia descrita por *Platt*,^{25,26} o espectro de absorção UV-Visível de uma porfirina de base livre caracteriza-se pela presença de uma banda de forte intensidade entre os 400-500 nm, designada de banda B ou *Soret*, e quatro bandas de menor intensidade entre 500-750 nm, denominadas de bandas Q.

Por sua vez, em 1961, *Gouterman*²⁷⁻²⁹ propôs um modelo simplificado designado por modelo das quatro orbitais, que tem sido largamente utilizado até aos dias de hoje visto que interpreta de forma relativamente simples as propriedades espectroscópicas dos macrociclos tetrapirrólicos. Conforme este modelo, os espectros de UV-Visível são interpretados de acordo com as transições eletrónicas entre quatro orbitais: duas orbitais ocupadas de maior energia, HOMO (do inglês: “*highest occupied molecular orbital*”), denominadas de b_1 e b_2 (orbitais π) e duas orbitais desocupadas de menor energia, LUMO (do inglês: “*lowest unoccupied molecular orbital*”), denominadas de c_1 e c_2 (orbitais π^*) (Figura 2.15 a)). Assim, de acordo com este modelo pode atribuir-se um sistema de eixos cartesianos x e y sobre o anel porfirínico, sendo possíveis transições entre B_x , B_y , Q_x e Q_y . É importante notar que a banda Q_x resulta da transição entre as orbitais $b_1 \rightarrow c_1$ enquanto a banda Q_y resulta da transição entre as orbitais $b_1 \rightarrow c_2$.

Por sua vez, as bandas B_x e B_y têm origem nas transições $b_2 \rightarrow c_1$ e $b_2 \rightarrow c_2$, respetivamente (Figura 2.15 b)). Estas bandas, podem ainda ser representadas por $B_x(0,0)$, $B_y(0,0)$, $Q_x(0,0)$ e $Q_y(0,0)$, uma vez que as transições se efetuam entre o nível

vibracional zero do estado fundamental e o nível vibracional zero do estado excitado. Contudo poderá ainda aparecer um *overtone* vibrónico nas bandas Q surgindo as transições representadas por $Q_x(1,0)$ e $Q_y(1,0)$.

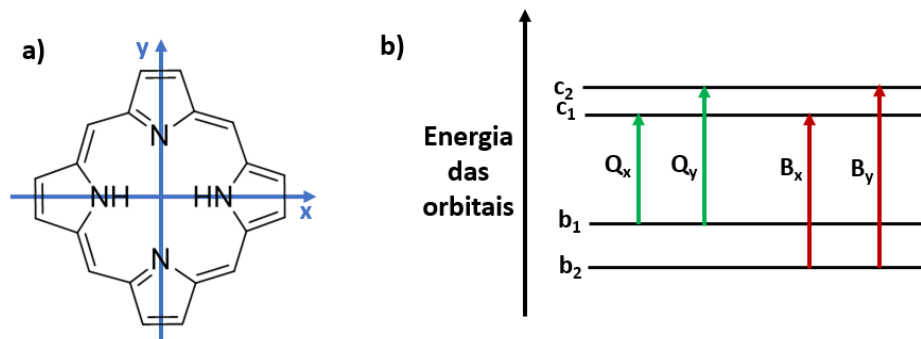


Figura 2.15: a) Representação do sistema de eixos coordenados nas porfirinas; b) Representação das transições eletrônicas entre o estado fundamental e o estado excitado de porfirinas de acordo com o modelo de *Gouterman*²⁷⁻²⁹.

Deste modo, e de acordo com a previsão teórica, no espectro de absorção de uma porfina de base livre, deveriam aparecer duas bandas B, contudo apenas se observa uma banda deste tipo. Este fenómeno deve-se ao facto de a diferença de energia entre as bandas B_x e B_y ser muito reduzida, fazendo com que estas duas apareçam sob a forma de apenas uma banda B alargada.

A intensidade das bandas Q varia de acordo com a natureza e posição dos grupos substituintes no macrociclo. Esta variação levou *Stern* a desenvolver uma classificação dos espectros de absorção de acordo com esta intensidade relativa. Assim, esta classificação compreende quatro tipos, de acordo com a intensidade das quatro bandas Q (Figura 2.16): *etio* ($IV > III > II > I$), *rhodo* ($III > IV > II > I$), *oxorhodo* ($III > II > IV > I$) e *filo* ($IV > II > III > I$).³⁰

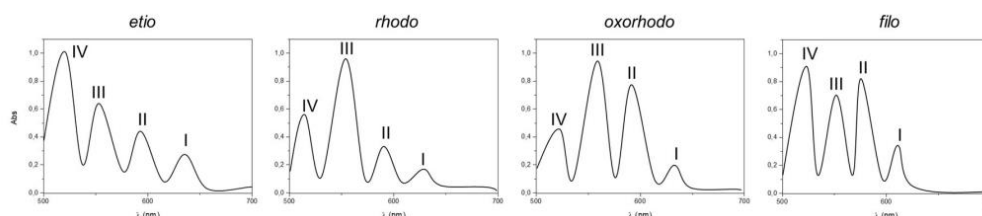


Figura 2.16: Tipos de espectros de absorção eletrônica de porfirinas, na região das bandas Q (IV-I).

Para o caso de metaloporfirinas, apenas se observa uma banda *Soret* e duas bandas *Q*, uma vez que a introdução do metal no centro da porfirina aumenta a simetria do anel, passando de D_{2h} para D_{4h} .³¹

No caso específico de metaloporfirinas de Mn, estas são classificadas como irregulares do tipo *hiper*, observando-se um desvio da banda *Soret* para o vermelho e bandas adicionais na zona dos 300-400 nm, resultantes da transferência de carga metal-ligando (MLCT). Na Figura 2.17 encontra-se a representação dos espectros típicos para as porfirinas de base livre e metaloporfirinas.³²⁻³⁶

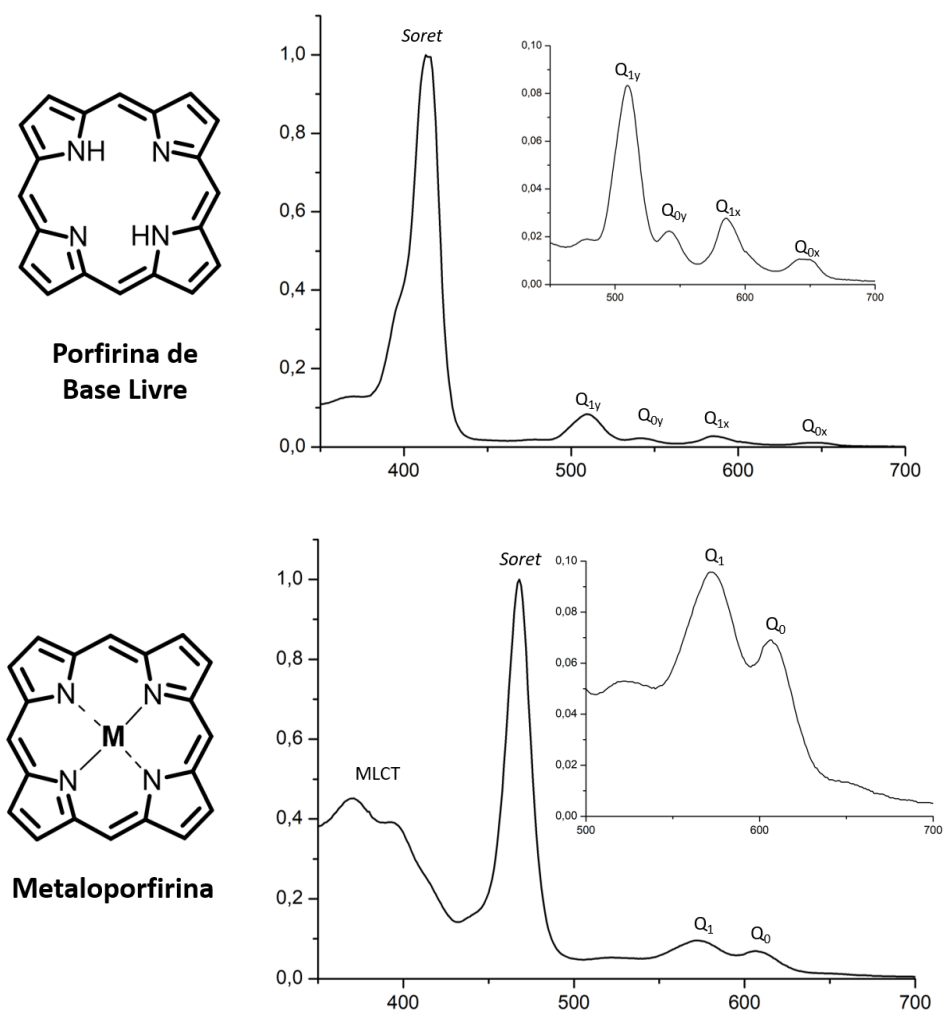


Figura 2.17: Espectros de absorção típicos de porfirinas de base livre e metaloporfirinas.

Tendo como objetivo adquirir os espectros de UV-Visível das porfirinas sintetizadas, prepararam-se soluções de todas as porfirinas de base livre e metaloporfirinas em tolueno, com concentração de aproximadamente 10^{-7} M (Figura 2.18).

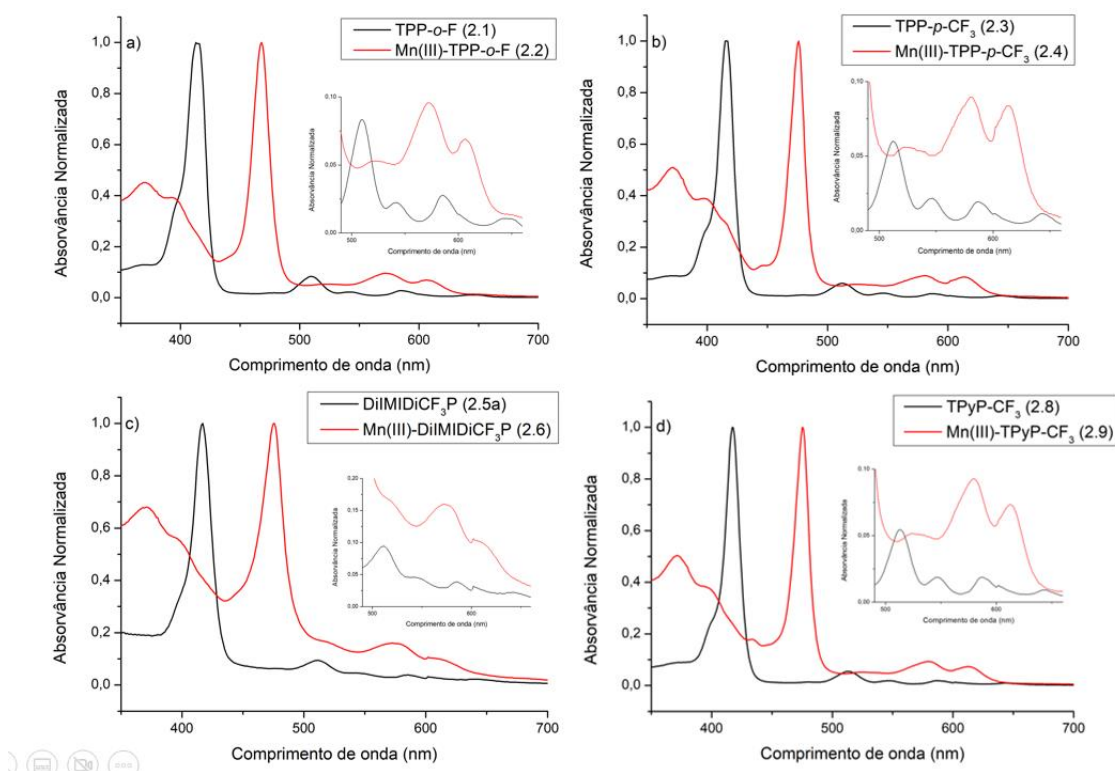


Figura 2.18: Espectros de absorção UV-Visível em tolueno das *meso*-aril porfirinas sintetizadas: a) TPP-*o*-F (2.1) e Mn(III)-TPP-*o*-F (2.2); b) TPP-*p*-CF₃ (2.3) e Mn(III)-TPP-*p*-CF₃ (2.4); c) DiIMiDiCF₃P (2.5a) e Mn(III)-DiIMiDiCF₃P (2.6); d) TPYP-CF₃ (2.8) e Mn(III)-TPYP-CF₃ (2.9).

Pela análise dos espectros, podem-se concluir que todos os espectros das porfirinas de base livre apresentam o padrão típico, com uma banda de maior intensidade (banda *Soret* ou B) na zona dos 414 - 420 nm, seguida de quatro bandas de menor intensidade (bandas Q) entre os 500 – 650 nm, atribuídas às transições vibracionais (0,0) e (1,0) das bandas Q_x e Q_y. Como discutido anteriormente, a intensidade das bandas Q varia de acordo com a natureza e a posição dos grupos substituintes do macrociclo, deste modo, todos os espectros de base livre apresentados são classificados como *filo* (IV > II > III > I) sendo esta classificação típica para essencialmente dois tipos de porfirinas: a) porfirinas que apresentam uma única substituição *meso*-alquil (não aplicável); b) porfirinas com quatro ou mais posições β não substituídas (aplicável).³⁰

Já as metaloporfirinas, como exposto anteriormente, apresentam bandas na zona dos 350-400 nm resultantes da transferência de carga metal-ligando (MLCT), uma banda *Soret* na zona dos 470 nm e apenas duas bandas Q entre 570-620 nm.

Os coeficientes de absorção molar (ϵ) de cada uma das moléculas em estudo foi determinada com recurso à Lei de Beer-Lambert, sendo que esta lei fornece uma relação

logarítmica entre a absorvância (A) e a transmitância (T), sendo a transmitância, por sua vez, obtida a partir da razão entre a intensidade da luz antes (I_0) e após (I) incidir na amostra. A absorvância relaciona-se linearmente com a concentração da amostra (c), o comprimento ótico (l) e a absorvidade molar (ϵ).³⁷

$$A = -\log(T) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l$$

Deste modo, os coeficientes de absorção molar (ϵ) foram determinados usando soluções de tolueno com concentrações variando entre 10^{-6} e 10^{-7} M. Assim, foram preparadas 7 soluções diluídas a partir da solução-mãe. De modo a assegurar uma relação linear entre todos os pontos, as soluções foram preparadas de modo a terem picos com uma absorção entre 0,1 e 1,0. Seguidamente, mediram-se os valores de absorvância nos seus respetivos máximos de absorção em função da concentração, sendo o coeficiente de absorção molar calculado através do declive da reta obtida a partir do ajuste linear dos pontos. A título de exemplo, apresenta-se o cálculo do coeficiente de absorção molar obtido para a porfirina DiIMIDiCF₃P **2.5a**, no seu máximo de absorção a 420 nm em tolueno (Figura 2.19).

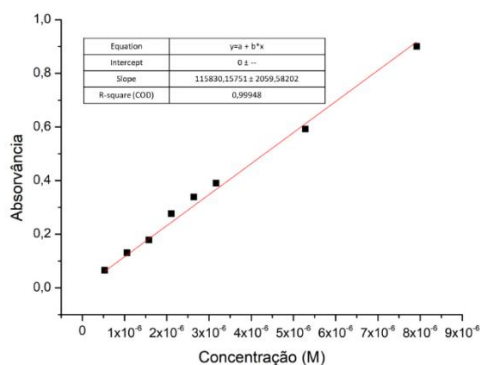


Figura 2.19: Determinação do coeficiente de absorção molar (ϵ) da DiIMIDiCF₃P **2.5a**, no seu máximo de absorção (420 nm), obtido em tolueno.

Na Tabela 2.4 apresentam-se os coeficientes de absorção molar obtidos pelo procedimento descrito acima. A determinação dos coeficientes de absorção molar foi realizada com uma boa correlação, evidenciando que na gama de concentrações utilizadas não se observam desvios à lei de Beer-Lambert, e conseqüentemente, não se observam processos de agregação.³⁷

Tabela 2.4: Comprimento de onda do máximo de absorção e respectivos coeficientes de absorvidade molar das porfirinas sintetizadas, em tolueno e DMSO.

Entrada	Composto	Absorção λ (nm) / ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)				
		B (0,0)	Q _y (1,0)	Q _y (0,0)	Q _x (1,0)	Q _x (0,0)
1	TPP ^{a)}	419	515	548	592	650
		2,7x10 ⁵	1,8x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,0x10 ⁴	9,6x10 ³
2	Mn(III)-TPP ^{a)}	477	585	621		--
		1,1x10 ⁵	8,4x10 ³	9,9x10 ³		
3	TPP- <i>o</i> -F 2.1 ⁱ⁾	417	511	543	586	649
		3,4x10 ⁵	1,4x10 ⁴	3,9x10 ³	4,6x10 ³	1,5x10 ³
4	Mn(III)-TPP- <i>o</i> -F 2.2 ⁱ⁾	471	577	608		--
		5,9x10 ⁴	5,8x10 ³	3,9x10 ³		
5	TPP- <i>p</i> -CF ₃ 2.3 ⁱ⁾	418	512	546	589	645
		3,3x10 ⁵	1,7x10 ⁴	5,8x10 ³	5,1x10 ³	2,5x10 ³
6	Mn(III)-TPP- <i>p</i> -CF ₃ 2.4 ⁱ⁾	477	584	619		--
		9,8x10 ⁴	7,8x10 ³	7,7x10 ³		
7	DiIMIDiCF ₃ P 2.5a ⁱ⁾	420	513	548	587	647
		1,2x10 ⁵	9,6x10 ³	4,3x10 ³	3,7x10 ³	1,7x10 ³
8	Mn(III)-DiIMIDiCF ₃ P 2.6 ⁱ⁾	478	583	612		--
		5,0x10 ⁴	6,0x10 ³	4,4x10 ³		
9	Mn(III)-DiIMIDiCF ₃ PCat 2.7 ⁱⁱ⁾	456	559	602		--
		6,4x10 ⁴	7,1x10 ³	3,1x10 ³		
10	TPyP-CF ₃ 2.8 ⁱ⁾	420	514	546	587	644
		3,6x10 ⁵	1,9x10 ⁴	6,5x10 ³	5,4x10 ³	2,4x10 ³
11	Mn(III)-TPyP-CF ₃ 2.9 ⁱ⁾	478	583	618		--
		8,4x10 ⁴	7,6x10 ³	5,2x10 ³		

a) Ref. 38

i) Tolueno; ii) DMSO

Pela análise da Tabela 2.4, começando por comparar apenas as porfirinas de base livre entre si, é possível observar que os valores obtidos se encontram na ordem dos 10⁵

$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda *Soret*, sendo assim concordantes com os valores descritos na literatura para a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) de base livre.³⁸

Fazendo uma análise comparativa entre as porfirinas de base livre e os respectivos complexos metálicos, é possível observar um desvio de todas as bandas para comprimento de onda mais longos. É importante notar que os valores obtidos para os coeficientes de absorvidade molar são inferiores nas porfirinas complexadas face às de base livre uma vez que a absorção também é afetada pelas transições resultantes da transferência de carga entre o metal e a porfirina.³⁹

2.4.2 Espectroscopia de fluorescência

Uma molécula no estado fundamental S_0 tem a capacidade de absorver radiação e transitar para estados eletrônicos de maior energia S_n . Contudo, estes estados são instáveis para a molécula e esta perde o excesso de energia, decaindo para o estado fundamental. Este processo pode acontecer através de diversos processos, entre os quais destacamos a fluorescência.

De acordo com a regra de *Kasha*,⁴⁰ a emissão de fótons ocorre apenas a partir do estado vibracional fundamental do primeiro estado eletrônico excitado (S_1). Deste modo, os espectros de fluorescência de porfirinas, onde esta regra é aplicável, apresentam apenas bandas de emissão do tipo Q e não tipo B uma vez que não existe emissão a partir de estados eletrônicos superiores ao estado S_1 .

Assim, os espectros de emissão de porfirinas apresentam uma banda de maior energia Q (0,0), resultante da transição entre o nível vibracional mais baixo do estado excitado S_1 e o nível vibracional mais baixo do estado fundamental S_0 . Por outro lado, podem ser observadas bandas adicionais que resultam de transições para níveis vibracionais superiores aos do estado fundamental dando origem a uma banda do tipo Q (0,n), onde n representa o estado vibracional do estado fundamental para o qual se dá a transição (n=0,1,2,...).⁴¹

Tendo como objetivo a obtenção dos espectros de emissão e excitação das porfirinas em estudo, bem como os seus rendimentos quânticos de fluorescência, preparam-se soluções das porfirinas em tolueno de modo a apresentarem no espectro de absorção UV-Visível uma absorvância de aproximadamente 0,2 para a banda *Soret*. De seguida, procedeu-se ao desarejamento de todas as amostras e registaram-se os respetivos

espectros de emissão, excitando no comprimento de onda adequado a cada composto (Figura 2.20). É importante notar que para o cálculo dos rendimentos quânticos de fluorescência é necessário escolher uma referência adequada e já amplamente estudada,⁴² sendo neste caso, usada a *meso*-tetrafenilporfirina (TPP).

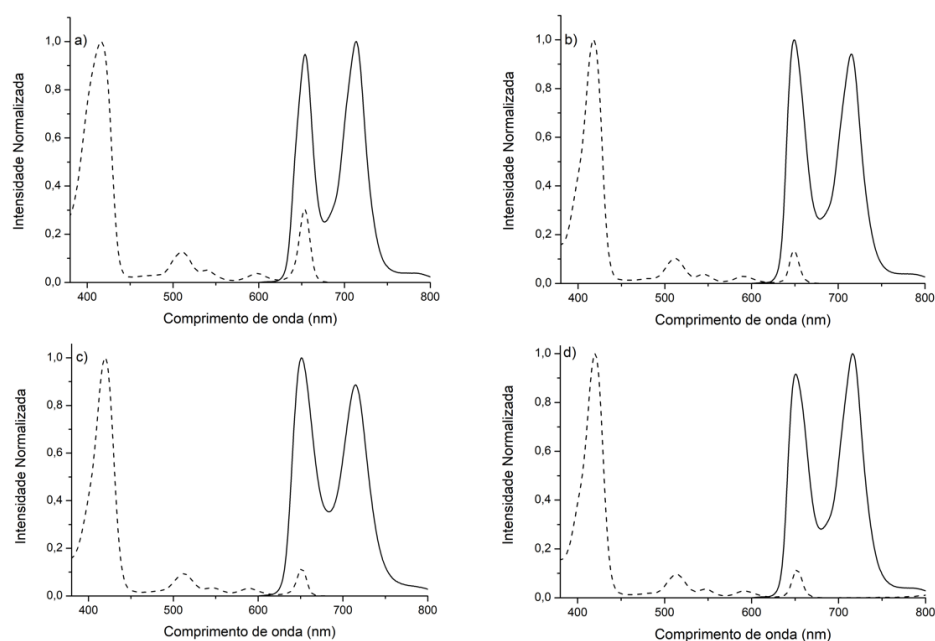


Figura 2.20: Espectros de emissão de fluorescência (cheio) e excitação (tracejado) de: a) TPP-*o*-F **2.1** ($\lambda_{\text{exc}}=417$ nm, $\lambda_{\text{emi}}=654$ nm); b) TPP-*p*-CF₃ **2.3** ($\lambda_{\text{exc}}=418$ nm, $\lambda_{\text{emi}}=649$ nm); c) DiIMiDiCF₃P **2.5a** ($\lambda_{\text{exc}}=419$ nm, $\lambda_{\text{emi}}=651$ nm); d) TPyP-CF₃ **2.8** ($\lambda_{\text{exc}}=420$ nm, $\lambda_{\text{emi}}=651$ nm) adquiridos a partir de soluções de tolueno (T=25 °C);

Tal como previsto, os espectros de emissão de fluorescência apresentam dois máximos de emissão, na zona entre 649 e 719 nm. De referir que os espectros de excitação são similares aos espectros de absorção, demonstrando que a emissão de fluorescência observada é apenas devida às porfirinas em estudo.

Após a obtenção dos espectros de emissão e fluorescência, efetuou-se o cálculo dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos sintetizados. O rendimento quântico de fluorescência é dado pela razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos. Deste modo, tendo obtido os espectros de emissão, e recorrendo ao método proposto por *Parker*, foi possível calcular os rendimentos quânticos de fluorescência.⁴³ Como referido anteriormente, é necessário recorrer a uma referência com um rendimento quântico previamente calculado e validado, neste caso, a TPP.⁴¹

Assim, o rendimento quântico de fluorescência pode ser obtido através da seguinte expressão:

$$\frac{\Phi_F(\text{composto})}{\Phi_F(\text{referência})} = \frac{\text{área}(\text{composto})}{\text{área}(\text{referência})} \times \frac{\text{Abs}(\text{referência})}{\text{Abs}(\text{composto})} \times \frac{n^2(\text{composto})}{n^2(\text{referência})}$$

Onde área se refere à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e *n* ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidas. Se o solvente utilizado na amostra e referência for o mesmo, este termo é anulado.³⁸

Na Tabela 2.5 apresenta-se o comprimento de onda máximo de cada uma das bandas de emissão de fluorescência e o rendimento quântico de fluorescência de todas as porfirinas em estudo.

Tabela 2.5: Comprimento de onda da banda de emissão, desvios de Stokes e respectivos rendimentos quânticos de fluorescência das porfirinas sintetizadas.

Entrada	Composto	Fluorescência λ_{max} (nm)			Φ_F
		$Q_x(0,0)$	$Q_x(0,1)$	Desvio Stokes (nm)	
1	TPP ^{a)}	652	719	2	0,11
2	TPP- <i>o</i> -F 2.1	654	714	1	0,06
3	TPP- <i>p</i> -CF ₃ 2.3	649	715	3	0,07
4	DiIMIDiCF ₃ P 2.5a	651	715	6	0,08
5	TPyP-CF ₃ 2.8	651	717	5	0,07

^a Ref 38

Como seria de esperar, os valores obtidos para os rendimentos quânticos de fluorescência, apresentados na Tabela 2.5, são relativamente baixos, uma vez que todos os compostos sintetizados apresentam átomos de flúor na sua constituição, o que poderá levar a um aumento da conversão intersistemas.⁴⁴ Observou-se também que as porfirinas DiIMIDiCF₃P **2.5a** e TPyP-CF₃ **2.8** apresentam um desvio de Stokes ligeiramente superior relativamente às restantes porfirinas em estudo, podendo esta alteração ser devido a uma maior diferença entre a geometria do estado fundamental e do estado excitado da porfirina.⁴⁵

2.5 Conclusões

Ao longo deste capítulo foi descrita a síntese e caracterização de um conjunto de *meso*-arilporfirinas, com diferentes substituintes fluorados. Para a síntese das porfirinas recorreu-se ao método do nitrobenzeno, mas utilizando irradiação MW como fonte de aquecimento uma vez que esta é uma fonte de aquecimento mais sustentável. As porfirinas em estudo foram obtidas com rendimentos entre 7-30%, sem contaminação com as respetivas clorinas. De todas as porfirinas sintetizadas, é de destacar as porfirinas **2.5a** e **2.8**, uma vez que estes compostos ainda não foram reportados na literatura.

A complexação das porfirinas sintetizadas com manganês, permitiu verificar que a utilização do aquecimento por irradiação MW permite reduzir significativamente o tempo de reação, de 3h para 30 minutos, com rendimentos semelhantes aos obtidos através do aquecimento convencional.

Para avaliação da potencialidade das porfirinas sintetizadas como agentes de contraste para ^{19}F MRI, adquiriram-se os espetros de ^{19}F RMN de todas as porfirinas sintetizadas, tendo-se verificado que o espetro da TPP-*o*-F **2.1** se apresentava sobre a forma de um multipletto. Quando adquirido o espetro para o respetivo complexo metálico **2.2**, observou-se apenas um sinal alargado, de menor intensidade. Por sua vez, as porfirinas TPP-*p*-CF₃ **2.3**, DiIMIDiCF₃P **2.5a** e TPyP-CF₃ **2.8**, e os respetivos complexos de manganês **2.4**, **2.7** e **2.9** evidenciaram um sinal bem definido. Deste modo, relativamente às porfirinas de base livre, pode-se concluir que o sinal de ^{19}F é intensificado quando as moléculas em estudo apresentam grupos com átomos de flúor quimicamente equivalentes. Relativamente aos complexos de manganês, a elevada supressão do sinal para a Mn(III)-TPP-*o*-F **2.2**, em comparação com os restantes complexos sintetizados, realça a importância da distância entre o metal paramagnético e os átomos de flúor no sinal de ^{19}F . Deste modo, foram realizados cálculos teóricos DFT de modo a determinar a distância entre o átomo de manganês e os átomos de flúor. Estes cálculos permitiram concluir que quando a distância entre o íão manganês e os átomos de flúor é inferior a 5,7 Å, como se observa para a porfirina **2.2**, o sinal de ^{19}F obtido é um sinal largo, resultado da rápida velocidade de relaxação, impedindo a obtenção dos valores do tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Por sua vez, para as restantes porfirinas, a distância entre os átomos de flúor e o íão manganês

é de $\sim 9,8$ Å. A esta distância, o efeito exercido pelo átomo paramagnético não é tão intenso, permitindo assim o cálculo de ambos os tempos de relaxação. Os complexos de manganês permitiram uma redução significativa do tempo de relaxação longitudinal (T_1) da zona dos 1000 ms para os 10 ms e do tempo de relaxação transversal (T_2) da zona dos 300-500 ms para os 3 ms, quando comparado com as respectivas porfirinas de base livre. Estes resultados evidenciaram que a aplicação destas porfirinas complexadas com manganês como agentes de contraste ^{19}F MRI não só é possível, como também é vantajosa.

Uma vez que, de todas as porfirinas descritas neste capítulo, apenas a porfirina **2.7** apresenta solubilidade em meios biológicos, esta foi selecionada para estudos mais detalhados. Foi calculado o coeficiente de partição octanol-água para a mesma, tendo-se obtido um valor de $\log P_{ow}=1,82$. Este valor demonstra a lipofilicidade da porfirina em estudo, evidenciando a sua potencial capacidade para penetrar a bicamada lipídica.

Em conclusão, foi possível sintetizar um conjunto de porfirinas fluoradas que permite abrir perspectivas futuras para a sua potencial aplicação em ^{19}F MRI.

2.6 Referências

- [1] Unzner, T. A., Magauer, T. (2015). Carbon–fluorine bond activation for the synthesis of functionalized molecules. *Tetrahedron Letters*, *56*, 8-77-883.
- [2] Goslinski, T., Piskorz, J. (2011). Fluorinated porphyrinoids and their biomedical applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *12*, 304-321.
- [3] Tirota, I., Dichiarante, V., Pigliacelli, C., Cavallo, G., Terraneo, G., Bombelli, F. B., Resnati, G. (2015). ¹⁹F magnetic resonance imaging (MRI): from design of materials to clinical applications. *Chemical reviews*, *115*, 1106-1129.
- [4] Henriques, C. A., Gonçalves, N. P., Abreu, A. R., Calvete, M. J., Pereira, M. M. (2012). Unsymmetrical porphyrins: the role of *meso*-substituents on their physical properties. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, *16*, 290-296.
- [5] Biron, E., Voyer, N. (2005). Synthesis of cationic porphyrin modified amino acids. *Chemical communications*, *37*, 4652-4654.
- [6] Zhao, P., Xu, L. C., Huang, J. W., Zheng, K. C., Fu, B., Yu, H. C., Ji, L. N. (2008). Tricationic pyridium porphyrins appending different peripheral substituents: experimental and DFT studies on their interactions with DNA. *Biophysical Chemistry*, *135*, 102-109.
- [7] Kumar, A., Kuang, Y., Liang, Z., Sun, X. (2020). Microwave chemistry, recent advancements, and eco-friendly microwave-assisted synthesis of nanoarchitectures and their applications: a review. *Materials Today Nano*, *11*, 100076-100126.
- [8] Pinto, S. M., Henriques, C. A., Tomé, V. A., Vinagreiro, C. S., Calvete, M. J., Dąbrowski, J. M., Pereira, M. M. (2016). Synthesis of *meso*-substituted porphyrins using sustainable chemical processes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, *20*, 45-60.
- [9] Henriques, C. A., Pinto, S. M., Pineiro, M., Canotilho, J., Eusébio, M. E. S., Pereira, M. M., Calvete, M. J. (2015). Solventless metallation of low melting porphyrins synthesized by the water/microwave method. *RSC Advances*, *5*, 64902-64910.

- [10] Henriques, C. A., Pinto, S. M., Aquino, G. L., Pineiro, M., Calvete, M. J., Pereira, M. M. (2014). Ecofriendly porphyrin synthesis by using water under microwave irradiation. *ChemSusChem*, 7, 2821-2824.
- [11] Gonzalez, A. C., Damas, L., Aroso, R. T., Tome, V. A., Dias, L. D., Pina, J., Pereira, M. M. (2020). Monoterpene-based metallophthalocyanines: Sustainable synthetic approaches and photophysical studies. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 24, 947-958.
- [12] Gao, Y., Pan, J. G., Huang, Y. J., Ding, S. Y., Wang, M. L. (2015). Microwave-assisted synthesis of fluorine substituted porphyrins and kinetics of formation of zinc porphyrin complexes in acetic acid. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 19, 1251-1255.
- [13] Harvey, P., Kuprov, I., Parker, D. (2012). Lanthanide complexes as paramagnetic probes for ^{19}F magnetic resonance. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 2015-2022.
- [14] Peterson, K. L., Srivastava, K., Pierre, V. C. (2018). Fluorinated paramagnetic complexes: sensitive and responsive probes for magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Frontiers in chemistry*, 6, 160-181.
- [15] Senanayake, P. K., Kenwright, A. M., Parker, D., van der Hoorn, S. K. (2007). Responsive fluorinated lanthanide probes for ^{19}F magnetic resonance spectroscopy. *Chemical communications*, 28, 2923-2925.
- [16] Tirota, I., Dichiarante, V., Pigliacelli, C., Cavallo, G., Terraneo, G., Bombelli, F. B., Resnati, G. (2015). ^{19}F magnetic resonance imaging (MRI): from design of materials to clinical applications. *Chemical reviews*, 115, 1106-1129.
- [17] Baláž, Š. (2000). Lipophilicity in trans-bilayer transport and subcellular pharmacokinetics. *Perspectives in drug discovery and design*, 19, 157-177.
- [18] Biagi, G. L., Recanatini, M., Barbaro, A. M., Borea, P. A. (1997). Lipophilicity estimation of drugs. *Process Control and Quality*, 10, 129-149.

- [19] Pehourcq, F., Thomas, J., Jarry, C. (2000). A microscale HPLC method for the evaluation of octanol-water partition coefficients in a series of new 2-amino-2-oxazolines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 443-453.
- [20] Collander, R. U. N. A. R., Lindholm, M., Haug, C. M. (1951). The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta Chemica Scandinavica*, 5, 774-780.
- [21] Fujita, T., Iwasa, J., Hansch, C. (1964). A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 5175-5180.
- [22] van de Waterbeemd, H., Smith, D. A., Jones, B. C. (2001). Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *Journal of computer-aided molecular design*, 15, 273-286.
- [23] Vinagreiro, C. D. S. (2020). *Desenvolvimento de entidades químicas inovadoras para superar o desafio da resistência antimicrobiana* (Dissertação de Doutorado, Universidade de Coimbra).
- [24] Banks, R. E., Smart, B. E., Tatlow, J. C. (2013). Organofluorine chemistry: principles and commercial applications. *Springer Science & Business Media*.
- [25] Giovannetti, R. (2012). The use of spectrophotometry UV-Vis for the study of porphyrins. *Macro to nano spectroscopy*, 6, 87-108.
- [26] Bhuyan, J. (2015). Metalloisoporphyrins: from synthesis to applications. *Dalton Transactions*, 44, 15742-15756.
- [27] Gouterman, M. (1961). Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 6, 138-163.
- [28] Gouterman, M. (1959). Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphin. *The Journal of Chemical Physics*, 30, 1139-1161.
- [29] Uttamlal, M., Holmes-Smith, A. S. (2008). The excitation wavelength dependent fluorescence of porphyrins. *Chemical Physics Letters*, 454, 223-228.
- [30] Wijesekera, T. P., Dolphin, D. (1994). Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*, 7, 193-239.

- [31] Arnaut, L. G. (2011). Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy. In *Advances in Inorganic Chemistry*, 63, 187-233.
- [32] Zheng, W., Shan, N., Yu, L., Wang, X. (2008). UV-visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. *Dyes and Pigments*, 77, 153-157.
- [33] Imran, M., Mitra, P., Srivastava, J. (2016). Enabling rapid classification of social media communications during crises. *International Journal of Information Systems for Crisis Response and Management*, 8, 1-17.
- [34] Huang, X., Nakanishi, K., Berova, N. (2000). Porphyrins and metalloporphyrins: versatile circular dichroic reporter groups for structural studies. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*, 12, 237-255.
- [35] Lan, M., Zhao, H., Yuan, H., Jiang, C., Zuo, S., Jiang, Y. (2007). Absorption and EPR spectra of some porphyrins and metalloporphyrins. *Dyes and pigments*, 74, 357-362.
- [36] Kim, B.F., Bohandy, J. (1981). Spectroscopy of Porphyrins. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 2, 153-163.
- [37] Longuet-Higgins, H. C., Rector, C. W., Platt, J. R. (1950). Molecular orbital calculations on porphine and tetrahydroporphine. *The Journal of Chemical Physics*, 18, 1174-1181.
- [38] Pineiro, M., Carvalho, A. L., Pereira, M. M., Gonsalves, A. D. A. R., Arnaut, L. G., Formosinho, S. J. (1998). Photoacoustic measurements of porphyrin triplet-state quantum yields and singlet-oxygen efficiencies. *Chemistry—A European Journal*, 4, 2299-2307.
- [39] Jeoung, S. C., Kim, D., Cho, D. W. (2000). Transient resonance Raman spectroscopic studies of some paramagnetic metalloporphyrins: effects of axial ligand on charge-transfer and photoreduction processes. *Journal of Raman Spectroscopy*, 31, 319-330.
- [40] Kasha, M. (1950). Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday society*, 9, 14-19.

- [41] Quimby, D. J., Longo, F. R. (1975). Luminescence studies on several tetraarylporphins and their zinc derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 5111-5117.
- [42] Murov, S. L., Carmichael, I., Hug, G. L. (1993). Handbook of photochemistry. *CRC Press*, 2, 49-78.
- [43] Parker, C. A., Rees, W. T. (1960). Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst*, 85, 587-600.
- [44] Pinto, S. M. A. (2012). *Estruturas tripodais e poliméricas porfirínicas supramoleculares* (Dissertação de Doutoramento, Universidade de Coimbra).
- [45] Zakavi, S., Hoseini, S. (2015). The absorption and fluorescence emission spectra of meso-tetra(aryl)porphyrin dications with weak and strong carboxylic acids: a comparative study. *RSC advances*, 5, 106774-106786.

Capítulo 3

Desenvolvimento de potenciais agentes de contraste para Tomografia por Emissão de Positrões (PET)

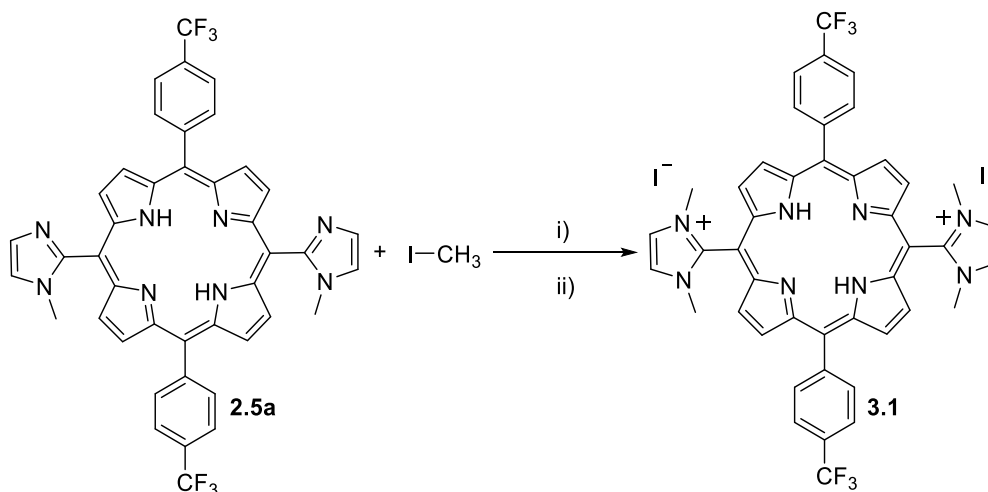
O sucesso da Tomografia por Emissão de Positrões é dependente dos agentes de contraste utilizados. Deste modo, o desenvolvimento dos mesmos tem ganho cada vez mais relevância, sendo de extrema importância, numa fase inicial, realizar a síntese dos padrões a frio, bem como otimizar as condições de separação dos mesmos através de HPLC de modo a obter uma eficiente separação. Para a elaboração de AC para PET, um fator muito importante a considerar é a ausência de toxicidade em células saudáveis, nas concentrações adequadas para a imagem *in vivo*. Outro fator a considerar consiste na determinação do coeficiente de partição, uma vez que este indica a capacidade do AC em atravessar as diferentes membranas celulares. Desta forma, seguidamente descreve-se a síntese de uma porfirina radiomarcada com carbono-11 bem como todo o processo sintético efetuado a frio, realizado previamente, de forma a selecionar as condições ótimas de reação de modo a transpor para a radiomarcagem. Para além disso, descreve-se o estudo de otimização da separação dos padrões realizado por HPLC. Adicionalmente, são também descritos estudos de citotoxicidade do padrão (porfirina **3.1** descrita seguidamente) em células MCF-12A bem como foi determinado o seu coeficiente de partição.

3.1 Síntese de padrões para HPLC derivados de imidazolil-porfirinas catiónicas

3.1.1 Otimização do processo de cationização a frio

Tendo como objetivo promover uma eficiente e rápida alquilação da DiIMIDiCF₃P **2.5a** com carbono-11, efetuou-se a cationização dos grupos imidazole com iodeto de

metilo, simulando assim a radiomarcagem da porfirina com carbono-11 a frio (Esquema 3.1).



Esquema 3.1: Processo de cationização da porfirina DiIMIDiCF₃P **2.5a** utilizando DMF. Método de aquecimento: i) Convencional; ii) MW.

Uma vez que o carbono-11 é um radioisótopo que apresenta um tempo de semi-vida muito reduzido de apenas de 20,4 minutos e sabendo que durante o tempo de decaimento é necessário fazer não só a reação de radiomarcagem da molécula bem como o exame PET, o processo de radiomarcagem deve demorar o menor tempo possível. Assim, os estudos iniciaram-se com a otimização das condições de reação de cationização de modo a simular a radiomarcagem em ambiente laboratorial, em geral designado a frio. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.1. É importante referir que normalmente a cationização de porfirinas é realizada através de métodos convencionais, usando um largo excesso de iodeto de metilo, à temperatura ambiente, durante 24 h. Sendo o objetivo simular a radiomarcagem a frio, foram usados apenas 4 equivalentes de iodeto de metilo uma vez que a radiomarcagem também recorre a pequenas quantidades de agente alquilante radiomarcado.

Tabela 3.1: Condições de reação de cationização da porfirina **2.5a** e respectivos rendimentos.

Entrada	Método de aquecimento	T (°C)	P _{máx} (W)	t (min)	η (%)
1	Conv.	100	---	7	82,7
2	MW	100	200	5	83,2
3	MW	130	200	1	84,2

Assim, e usando 4 equivalentes de iodeto de metilo, começou por se realizar a cationização através de aquecimento convencional, a 100 °C (Tabela 3.1, Entrada 1). O controlo da reação foi realizado através de TLC (usando diclorometano com 1% de metanol, como eluente) e ao fim de 7 minutos foi possível observar a cationização completa do composto. No final da reação, foi efetuada a purificação por precipitação do crude obtido com diclorometano/pentano. O rendimento da reação após purificação e isolamento foi de 82,7%. Para comparação, e com o objetivo de recorrer a uma fonte de aquecimento mais sustentável, repetiu-se o processo descrito anteriormente, mas usando irradiação MW como fonte de aquecimento (Tabela 3.1, Entrada 2). Neste caso, observou-se a formação do produto desejado **3.1** ao fim de 5 minutos, com um rendimento de 83,2%. Apesar deste resultado ser promissor, tal como referido anteriormente, o tempo de semi-vida do carbono-11 é muito reduzido e, por isso, a radiomarcagem deve ser feita no menor tempo possível. Deste modo, a temperatura foi aumentada para 130 °C, o que permitiu obter o produto de interesse ao fim de 1 minuto, com um rendimento de produto isolado de 84,2% (Tabela 3.1, Entrada 3). Para a transposição para a radiomarcagem, e tendo em consideração o que foi referido anteriormente, selecionaram-se como condições de reação as últimas descritas (T=130 °C, t=1 min).

A porfirina **3.1** foi totalmente caracterizada por espectroscopia de ^1H RMN e por espectrometria de massa. Na Figura 3.1, apresenta-se o espectro de ^1H RMN onde é possível observar que a cationização tornou simétrica a porfirina inicial. Isto ocorre devido ao facto de as estruturas de ressonância possíveis no imidazole tornarem os dois

azotos idênticos, deixando assim de se observar a presença de atropisômeros (Figura 3.2).

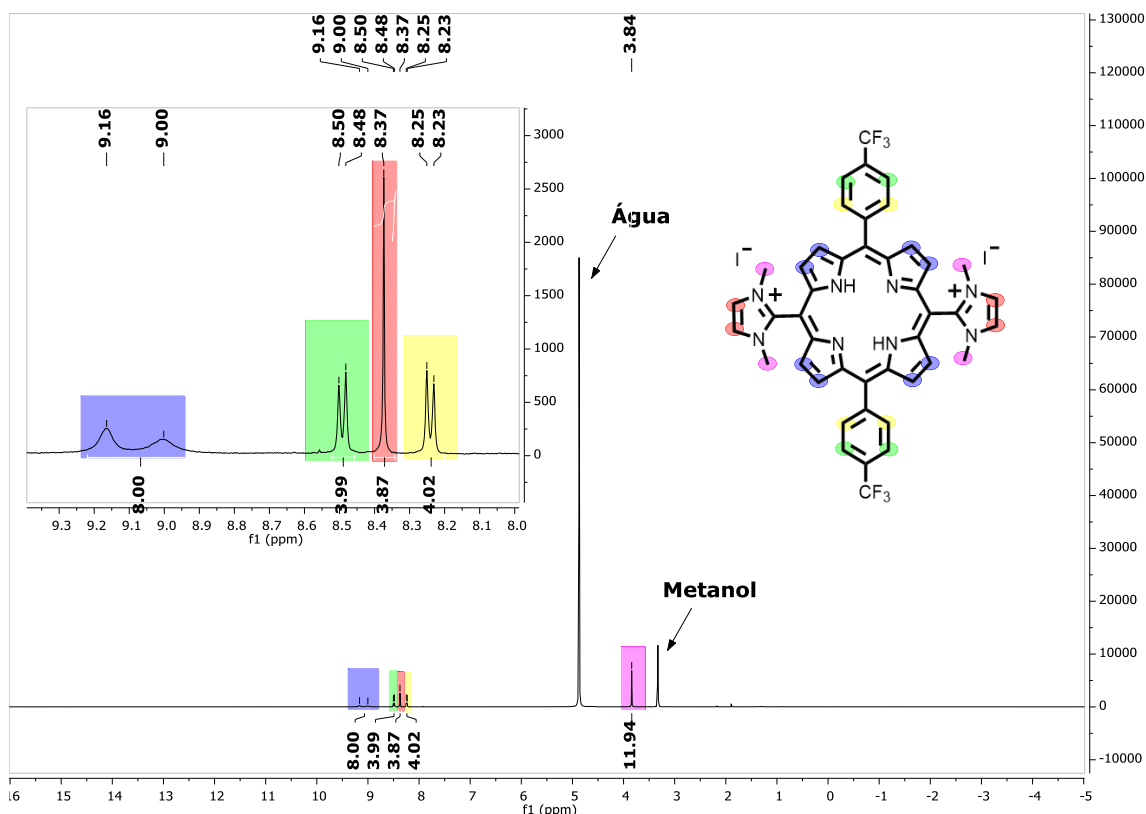


Figura 3.1: Espetro de ^1H RMN da porfirina **3.1**, em MeOD e respectiva ampliação.

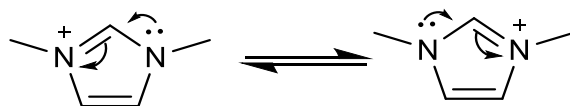
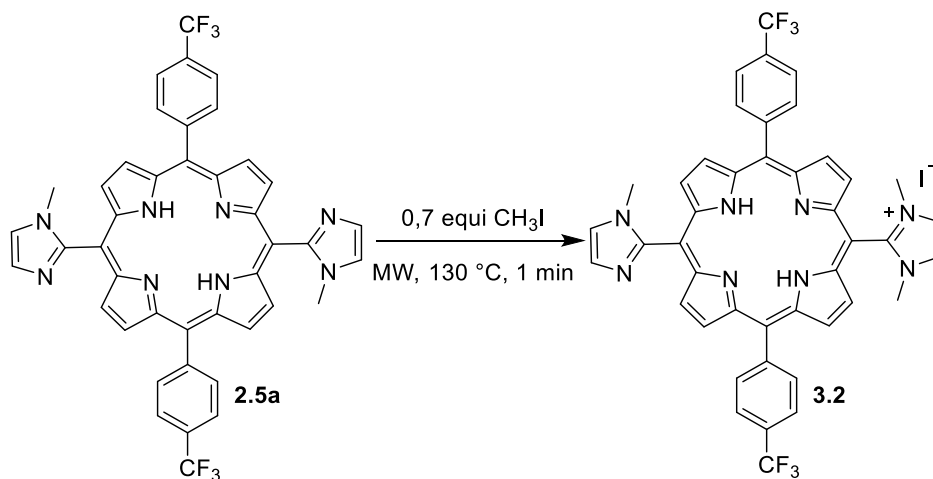


Figura 3.2: Estruturas de ressonância principais do grupo imidazole.

Pela análise do espectro é possível observar a presença de cinco sinais distintos: entre 9,16-9,00 ppm observam-se dois singletos largos atribuídos aos oito prótons β -pirrólicos, sendo feita esta atribuição uma vez que estes prótons se encontram mais desprotegidos devido aos fortes desvios de corrente do anel causados pelos elétrons π . Entre 8,30-8,38 ppm encontra-se um duplete, sendo este sinal atribuído aos quatro prótons *meta* dos grupos fenilo, os quatro prótons mais próximos do grupo CF_3 . O singlete a 8,37 ppm foi atribuído aos quatro prótons do grupo imidazole. Por sua vez, o duplete a 8,25-8,23 ppm é atribuído aos quatro prótons *orto* dos grupos fenilo, que se encontram mais próximos do macrociclo. A 3,84 ppm encontra-se um singlete atribuído aos doze prótons metilo dos grupos imidazole.

Tendo em consideração que a porfirina **2.5a** possui dois locais de possível marcação, e sabendo que uma quantidade reduzida de $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ é produzida no ciclotrão, existe a probabilidade de obter o produto mono-radiomarcado. Deste modo as condições de reação foram adaptadas tendo como objetivo obter o respetivo composto mono-alquilado (Esquema 3.2).



Esquema 3.2: Processo de mono-cationização da porfirina DiIMIDI CF_3P **2.5a** utilizando DMF, através de irradiação MW.

Deste modo, as condições de reação foram semelhantes às otimizadas anteriormente, sendo apenas alterada a quantidade de equivalentes de CH_3I de 4 para 0,7 equivalentes, tendo-se obtido o produto de interesse **3.2** ao fim de 1 minuto de reação, a $130\text{ }^\circ\text{C}$. Após este tempo, verificou-se por TLC a presença do produto mono-alquilado **3.2** e também da porfirina **2.5a**. Seguidamente, e de forma a obter uma amostra pura da porfirina **3.2** efetuou-se a purificação recorrendo a cromatografia *flash* usando um gradiente iniciando com 20% acetonitrilo: 80% solução tampão de acetato de amónia e terminando com 100% acetonitrilo com um fluxo de 1 mL/min . É importante notar que para a aplicação na coluna se recorreu ao método *dry load*. É possível observar, na Figura 3.3, que a separação da mistura de compostos foi eficiente, onde o pico a 49 minutos foi atribuído ao produto **3.2** (Figura 3.3, **a**), sendo este confirmado através do detetor UV-Visível ($\lambda = 416\text{ nm}$). O pico a 65 minutos foi atribuído à porfirina de partida **2.5a** (Figura 3.3, **b**). Contudo, uma vez que a quantidade obtida de porfirina **3.2** foi reduzida e devido a questões temporais não foi possível caracterizar por ^1H RMN e espetrometria de massa.

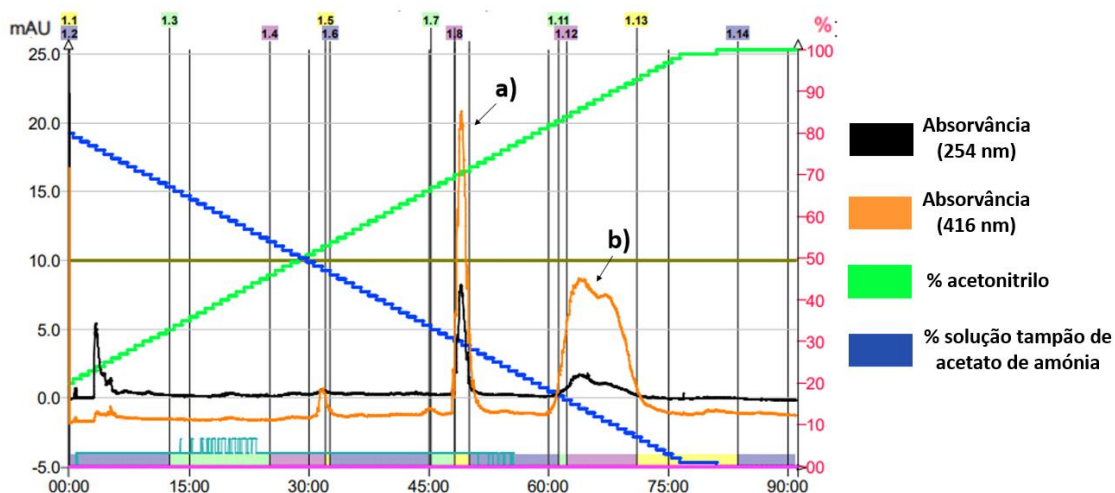


Figura 3.3: Cromatograma obtido por cromatografia *flash* utilizando um gradiente 20% acetonitrilo: 80% solução tampão de acetato de amônia e terminando com 100% acetonitrilo com um fluxo de 1 mL/min. a) porfirina **3.2**, $t_R = 49$ minutos, b) porfirina **2.5a**, $t_R = 65$ minutos.

3.2 Estudos preliminares de avaliação do padrão Di-iodeto de [5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina] (**3.1**)

3.2.1 Coeficiente de partição

Uma vez que a porfirina descrita anteriormente será posteriormente estudada como potencial AC para PET, é importante determinar o coeficiente de partição da porfirina obtida a frio, de modo a avaliar a sua capacidade de internalização em células. Assim, efetuou-se o cálculo do coeficiente de partição para porfirina **3.1** recorrendo à metodologia descrita no Capítulo 2 e em maior detalhe no Capítulo 5. Deste modo, foi obtido um valor de $\log P_{ow} = 2,10$ demonstrando a lipofilicidade deste composto. Comparando o valor obtido para Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat ($\log P_{ow} = 1,82$) e para a porfirina DiIMIDiCF₃PCat ($\log P_{ow} = 2,10$), é possível observar que a introdução do átomo de manganês se traduz num ligeiro aumento da hidrofiliicidade.

De acordo com a literatura, para a passagem ideal de um radiofármaco através de bicamadas lipídicas é necessário um valor de $\log P_{ow} > 1,5 - 2$.¹ Assim, tendo-se obtido um valor de $\log P_{ow} = 2,10$ para a porfirina **3.1**, é possível concluir que esta apresenta um coeficiente de partição adequado para a sua aplicação.

3.2.2 Estudos de citotoxicidade

Após determinação do coeficiente de partição e uma vez que no desenvolvimento de uma nova molécula para passível aplicação na área medicinal é crucial avaliar a sua citotoxicidade, efetuaram-se os estudos *in vitro* utilizando a linha celular MCF-12A, uma linha de células epiteliais de mama saudáveis. Para tal, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de DiIMDiCF₃PCat **3.1** na cultura de células através do ensaio do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este ensaio colorimétrico baseia-se na clivagem do sal de tetrazólio amarelo de MTT para produzir cristais violeta de *formazan*, em células metabolicamente ativas (Figura 3.4).

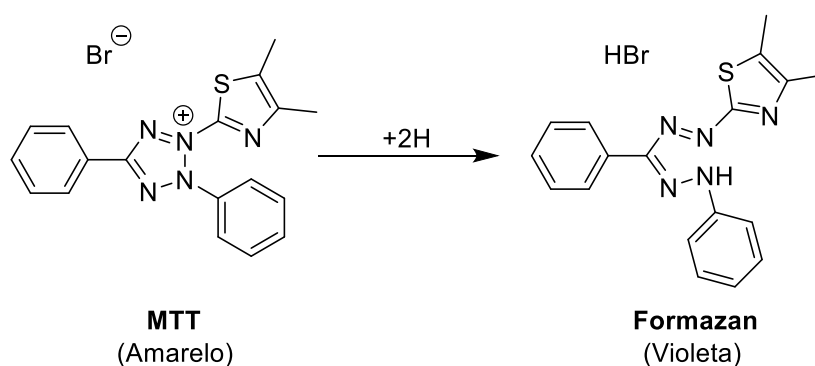


Figura 3.4: Redução do brometo de MTT aos seus cristais de *formazan* através de redutases celulares.

A redução do MTT a *formazan* é catalisada através de redutases que envolvem os cofatores do nucleótido de piridina, NADH e NADPH. Como a succinato desidrogenase é um complexo celular muito importante, ela participa quer no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, quer no transporte da cadeia de eletrões. Deste modo, o ensaio MTT depende da respiração mitocondrial, estando diretamente relacionado com a viabilidade celular.^{2,3}

Os cristais de *formazan* formados são insolúveis em água, mas solúveis em DMSO, originando uma solução violeta, quantificada por espectrofotometria, medindo valores de absorvância a 570 nm. De acordo com a lei de Beer-Lambert, é possível quantificar a quantidade de cristais de *formazan* formados após a adição do MTT à suspensão celular, uma vez que a 570 nm, o MTT não metabolizado não tem absorvância. Assim, este ensaio permite estimar a atividade das células vivas sendo que a absorvância da

suspensão celular após a reação com o MTT é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Assim, a experiência iniciou-se com o cultivo das células em frascos apropriados ventilados de 75 cm², sob condições estéreis, a 37 °C e sob atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂, em meio DMEM/F12 (do inglês: “*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*”), com suplementos. As células foram cultivadas com um fator de diluição de 1:2 e as culturas foram subcultivadas uma ou duas vezes por semana.

Para a contagem das células, foi usado o método de exclusão do *trypan blue*, uma vez que este é um ensaio rápido e simples para determinar o número de células morfológicamente intactas na suspensão celular. Como as células vivas apresentam membrana celular, o corante *trypan blue* não consegue atravessar a membrana e entrar na célula. Por outro lado, as células mortas apresentam uma membrana com roturas, permitindo a entrada do corante. Deste modo, as células mortas apresentam um citoplasma com coloração (azul) escura, permitindo a sua fácil identificação através da observação ao microscópio. Contudo, uma das principais limitações deste método reside no facto de este não ser capaz de diferenciar entre células viáveis e não viáveis, uma vez que uma célula pode ser inviável e mesmo assim apresentar uma membrana intacta.³

Para a contagem celular recorreu-se a um hemocitómetro no qual se preencheram as duas grelhas com suspensão celular e *trypan blue*. Após observação ao microscópio ótico, as células foram contadas. De modo a obter o número de células por mL na suspensão celular, foi usada a seguinte equação:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = x \times \frac{\text{fator de diluição}}{1 \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

onde x representa a média das células contabilizadas nos quatro quadrados do hemocitómetro para cada contagem (oito no total) e 1×10^{-4} corresponde ao volume de cada quadrado do hemocitómetro.

Após contagem das células, estas foram subcultivadas a $1,5 \times 10^4$ células/cm² em placas de 96 poços. Após estabelecimento da cultura de células nas placas de 96 poços, as células foram tratadas com 12 µM, 6 µM e 3 µM da porfirina **3.1**. A viabilidade celular foi medida às 2 h, 4 h e 24 h após adição do composto em estudo. Após estes períodos de incubação, foram adicionados 20 µL de uma solução de 0,5 mg/mL de MTT em cada

poço e incubadas a 37 °C durante 3 h. Após incubação, a solução foi removida com cuidado de modo a não destruir os cristais de *formazam* formados e foram adicionados 100 μL de DMSO a cada poço de modo a dissolver completamente os cristais, resultando numa solução violeta. Por fim, a leitura da absorvância das amostras foi feita a 570 nm (A_{570}) num espectrofotómetro com leitor de placas multipoços. Os valores de viabilidade celular foram determinados de acordo com a equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco}}} \times 100$$

onde A_{amostra} se refere à absorção das amostras expostas ao composto em estudo e A_{controlo} e A_{branco} se referem à absorção do meio e do DMSO, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controlo, considerado 100%.

Foram realizados três ensaios independentes, cada poço em sextuplicado. Os resultados experimentais obtidos encontram-se representados graficamente na Figura 3.5.

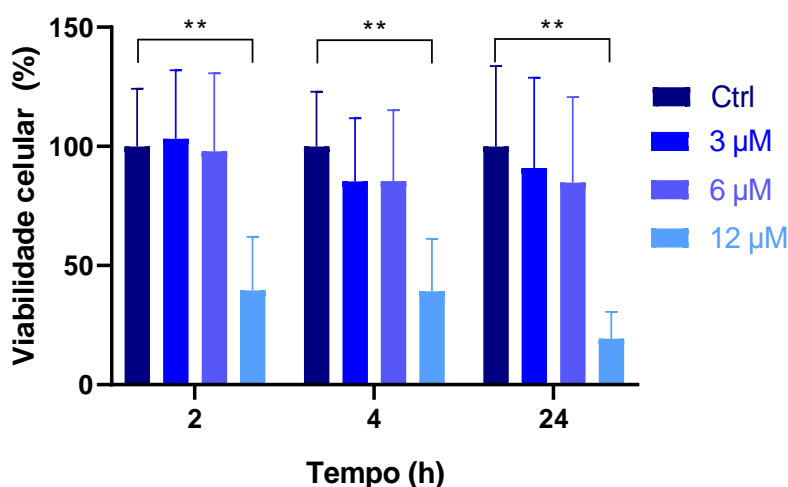


Figura 3.5: Efeito do composto DiIMiDiCF₃PCat em células MCF-12A avaliado através do ensaio de MTT. Os resultados encontram-se expressos como a média \pm desvio quadrado de três experiências independentes ($n=3$), realizado em sextuplicado para cada condição experimental. Os dados foram analisados com o software *GraphPad prism* 8.0.2, utilizando o método *one-way* ANOVA: $p^{**}<0,01$, sendo considerados estatisticamente significativos. Se $p>0,05$ não foram consideradas diferenças estatisticamente significativas.

A partir da análise dos dados, de um modo geral, é possível observar que foram obtidas percentagens de viabilidade celulares próximas a 100% para as concentrações

mais baixas em estudo (3 μM e 6 μM), independentemente do tempo de incubação das células com a porfirina **3.1**. Relativamente à viabilidade celular referente à concentração superior (12 μM), é possível observar que a viabilidade celular diminui significativamente, sendo esta de apenas 40% para os ensaios realizados às 2 h e 4 h de incubação e 20% para os ensaios de 24 h de incubação.

3.3 Metodologia da marcação

Um dos métodos mais usados para a radiomarkação de moléculas com carbono-11 recorre ao uso de $[^{11}\text{C}]$ iodeto de metilo ($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) como agente alquilante. Sendo o $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ um intermediário muito volátil e visto que são esperadas elevadas quantidades de atividade radioquímica, a produção de radiofármacos é tipicamente realizada em sistemas semiautomáticos ou sistemas totalmente automáticos, dentro de *hot-cells* (Figura 3.6).⁴

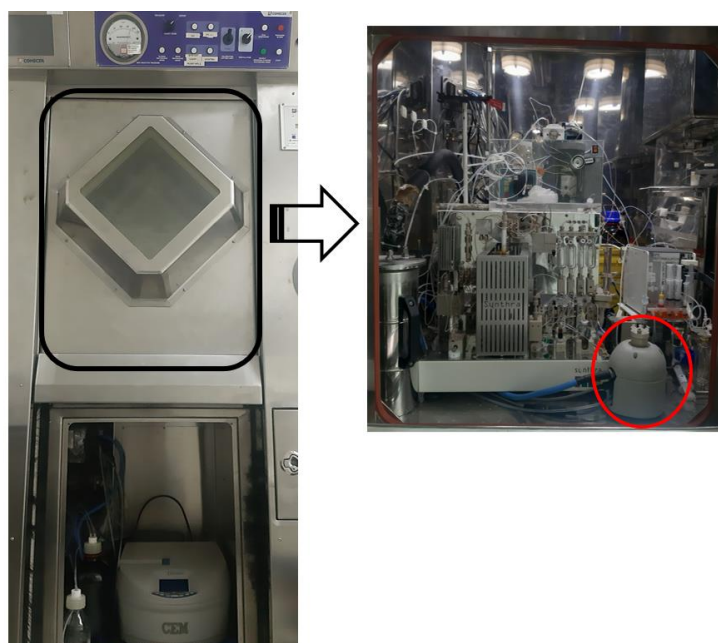


Figura 3.6: Módulo de radiossíntese de carbono-11, com destaque do reator MW (círculo vermelho), dentro da *hot-cell*.

Estes sistemas consistem em unidades controladas remotamente por computadores com programas adequados, que permitem realizar sequencialmente as diferentes etapas de produção de carbono-11 bem como a reação de radiomarkação, permitindo um controlo do fluxo, pressão, temperatura e atividade. O método mais comum para a introdução de ^{11}C em moléculas orgânicas alvo é a incorporação de um grupo

^{11}C metilo, usando ^{11}C iodeto de metilo (^{11}C CH₃I). De um modo geral, este método de síntese consiste no bombardeamento de um alvo gasoso de nitrogénio com protões de alta energia que segue a reação nuclear $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$. Esta reação utiliza gás nitrogénio com 0,5% de oxigénio e é irradiado com um feixe de protões de 16,5 MeV, produzindo ^{11}C dióxido de carbono (^{11}C CO₂). Neste trabalho, recorreu-se ao método de “fase gasosa” para a síntese do precursor radioativo.⁵⁻⁸

Neste caso, o ^{11}C CO₂ é produzido e armazenado numa coluna de CO₂ previamente arrefecida até -180°C. Posteriormente, ao aquecer a coluna até 50°C e sob fluxo de H₂, o ^{11}C CO₂ é libertado e convertido em ^{11}C metano (^{11}C CH₄) através da redução de hidrogénio na presença de um catalisador de níquel a 425°C. De seguida, o ^{11}C CH₄ reage com vapor de iodo, a ~720-740°C, de modo a produzir ^{11}C CH₃I, sendo importante notar que esta reação é conduzida num circuito fechado, onde a reação de iodação é repetida várias vezes de modo a maximizar o rendimento da mesma. Sendo este um intermediário muito volátil, à medida que é formado é aprisionado numa coluna *Porapak*[®] que, posteriormente, ao ser aquecida até 200°C liberta o ^{11}C CH₃I, que por sua vez é transferido, através de uma corrente de hélio para o sistema de ^{11}C -alquilação.⁹ As reações que ocorrem durante a produção de ^{11}C CH₃I encontram-se sumariadas na Figura 3.7, A.

Como exposto ao longo dos capítulos anteriores, o uso de irradiação MW tem evidenciado inúmeras vantagens em síntese química. Assim, as reações de marcação de ^{11}C -alquilação foram realizadas recorrendo a esta fonte de irradiação. Assim, o ^{11}C CH₃I produzido é conduzido até ao vaso com a solução precursora e fica eficientemente aprisionado, ocorrendo a reação de radiomarkação, originando o produto radiomarcado de interesse (Figura 3.7, B).

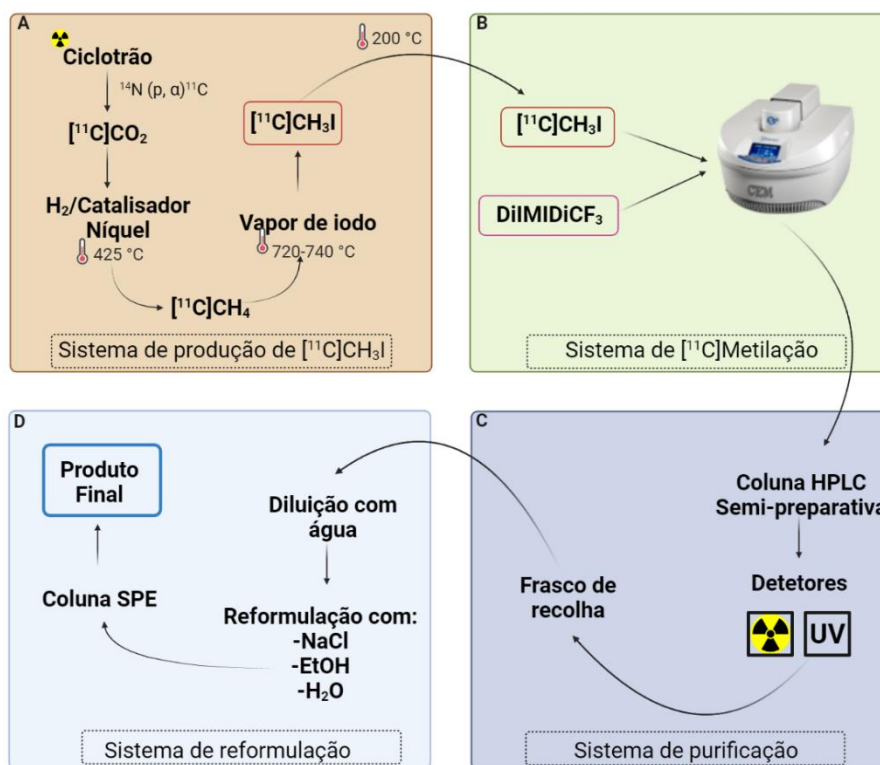


Figura 3.7: Diagrama esquemático do processo de radiomarcagem com carbono-11. Adaptado de 4.

O produto obtido, é injetado numa coluna de HPLC semi-preparativa de modo a proceder à separação dos diferentes produtos químicos e radioquímicos, sendo esta separação conseguida através de detetores de UV-Visível e radioatividade (Figura 3.7, C). Após recolha do produto desejado, este é diluído em água e aprisionado num cartucho de extração de fase reversa C18 (cartucho SPE C18). Este é lavado com água em abundância de modo a remover solventes orgânicos da fase móvel do HPLC ainda presentes. De seguida, o produto é eluído do cartucho SPE C18 para o frasco do produto final com um pequeno volume de etanol sendo de seguida diluído com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) (Figura 3.6,D).

3.4 Otimização das condições de HPLC para separação dos padrões

Como já discutido anteriormente, o tempo total de produção de compostos radiomarcados com carbono-11 deve ser o mais curto possível, não ultrapassando 2 a 3 vezes o tempo de semi-vida do radionuclídeo, de 20,4 minutos. Deste modo, é

necessário garantir a seleção do melhor sistema cromatográfico, visto que longos tempos de separação dos produtos obtidos condicionam a atividade total do produto final radiomarcado com ^{11}C . Deste modo, procedeu-se à otimização das condições de HPLC equipado com uma coluna C18 analítica, para verificação da pureza e confirmação da presença dos compostos radiomarcados.

Sabendo *à priori* que a polaridade do precursor **2.5a** e dos produtos alquilados, **3.1** e **3.2** é distinta, iniciou-se o estudo utilizando como fase móvel eluentes com diferentes polaridades. Este estudo permitiu otimizar as condições de separação que posteriormente foram transpostas para o desenvolvimento de um gradiente que permitiu a eficiente separação dos produtos radiomarcados. Assim, os compostos **2.5a**, **3.1** e **3.2** foram dissolvidos em acetonitrilo e metanol, respetivamente. Como fase móvel, foram usadas misturas de solução tampão de formato de amónia (0,1 M, pH= 7,2) e acetonitrilo, estando os resultados obtidos apresentados na Tabela 3.2.

Os estudos iniciaram-se com a otimização do tempo de retenção da porfirina **2.5a**, o composto mais apolar em estudo. Inicialmente, escolheu-se uma mistura de fase móvel constituída por 80% acetonitrilo e 20% de solução tampão de formato de amónia. Nestas condições, e para 1 mL/minuto (Tabela 3.2, Entrada 1), obteve-se um tempo de retenção de 6,18 minutos, sendo este considerado um tempo longo para marcação com carbono-11. Seguidamente, mantendo a fase móvel testaram-se dois novos fluxos, de 2 e 3 mL/min (Tabela 3.2, Entradas 2 e 3), tendo-se obtido tempos de retenção de 3,14 e 2,06 minutos. Com o objetivo de reduzir ainda mais os tempos de retenção, alterou-se a fase móvel para 90 % acetonitrilo e 10% solução tampão de formato de amónia, alterando os fluxos (Tabela 3.2, Entradas 4-6), obtendo-se tempos de retenção de 3,22, 1,43 e 1,09 minutos para fluxos de 1, 2 e 3 mL/min, respetivamente. Estes tempos, para uma passível radiomarcação com carbono-11 são considerados apropriados.

Tabela 3.2: Otimização das condições de separação em coluna de HPLC analítica de cada composto em estudo.

Entrada	Produto	Fase móvel (v/v)	Fluxo (mL/min)	t _R (min)
1	2.5a^a	80% acetonitrilo 20% tampão	1	6,18
2			2	3,14
3			3	2,06
4		90% acetonitrilo 10% tampão	1	3,22
5			2	1,43
6			3	1,09
7	3.1^a	40% acetonitrilo 60% tampão	1	12,44
8			2	6,53
9			3	4,44
10		50% acetonitrilo 50% tampão	1	3,59
11			2	2,00
12			3	1,25
13	3.2^a	40% acetonitrilo 60% tampão	1	25,20
14			2	13,01
15			3	9,03
16		50% acetonitrilo 50% tampão	1	12,24
17			2	4,52
18			3	3,34
19	CH₃l^b	40% acetonitrilo 60% tampão 50% acetonitrilo 50% tampão	3	1,49
20			3	1,20
21			3	0,58

^a Detetor: 416 nm

^b Detetor: 254 nm

Como referido, a polaridade entre as porfirinas catiónicas e a respetiva porfirina precursora é significativamente diferente, contudo, para ambas as porfirinas catiónicas

(**3.1** e **3.2**), a polaridade é semelhante. Deste modo, para estas porfirinas catiónicas **3.1** e **3.2**, começou por se utilizar como fase móvel uma mistura constituída por 40% acetonitrilo e 60% de solução tampão de formato de amónia (Tabela 3.2, Entradas 7-9 e 13-15), com um fluxo de 1 mL/minuto. Nestas condições, as porfirinas eluíram com um tempo de retenção de 12,44 minutos (**3.1**, Tabela 3.2, Entrada 7), e 25,20 minutos (**3.2**, Tabela 3.2, Entrada 13). Nestas condições, para ambos os compostos, os tempos de retenção obtidos são demasiado longos. Deste modo, aumentou-se o fluxo de 1 mL/minuto para 2 e 3 mL/minuto, o que conduziu a uma redução nos tempos de retenção (Tabela 3.2, Entradas 8,9 e 14,15). Contudo, estes tempos de retenção são ainda longos para a radiomarkação com carbono-11. Assim, tendo como objetivo aumentar a afinidade de ambos os compostos para a fase móvel, esta foi alterada para uma mistura de 50% acetonitrilo e 50% solução tampão de formato de amónia. A alteração da fase móvel evidenciou uma redução significativa dos tempos de retenção de ambos os compostos (Tabela 3.2, Entradas 10-12 e 16-18), para todos os fluxos, sendo de destacar que a 3 mL/minuto, a porfirina **3.1** apresentou um tempo de retenção de 1,25 minutos (Tabela 3.2, Entrada 12), e a porfirina **3.2** de 3,34 minutos (Tabela 3.2, Entrada 18), sendo estes tempos promissores.

Deste modo, e tendo em consideração a eficiente separação de todos os compostos, com tempos de retenção apropriados para a finalidade pretendida, foi selecionada para avaliar a marcação com carbono-11 da porfirina **2.5a** a fase móvel constituída por uma mistura de 90 % acetonitrilo e 10 % solução tampão de formato de amónia, com um fluxo de 3mL/minuto ($t_R = 1,09$ minutos). Para os compostos catiónicos, **3.1** e **3.2**, as melhores condições cromatográficas foram obtidas usando um fluxo de 3mL/minuto com uma fase móvel constituída por uma mistura de 50 % acetonitrilo e 50 % solução tampão de formato de amónia ($t_R = 1,25$ minutos para **3.1** e $t_R = 3,34$ minutos para **3.2**).

Tendo definido a melhor separação cromatográfica para as porfirinas em estudo, foram otimizadas as condições de separação para o CH_3I , uma vez que este poderá ser um componente da mistura radiomarcada. Tendo definido que com um fluxo de 3 mL/minuto a separação seria mais eficiente, apenas foi testado este fluxo para o CH_3I . Assim, com uma fase móvel com mistura de 40% acetonitrilo e 60% solução tampão de formato de amónia, foi obtido um tempo de retenção de 1,49 minutos (Tabela 3.2, Entrada 19). Para uma fase móvel com mistura de 50% acetonitrilo e 50% solução

tampão de formato de amónia, obteve-se um tempo de retenção de 1,20 minutos (Tabela 3.2, Entrada 20), e finalmente para uma fase móvel com mistura de 60% acetonitrilo e 40% solução tampão de formato de amónia, foi obtido um tempo de retenção de 0,58 minutos (Tabela 3.2, Entrada 21). Este estudo permitiu concluir que o CH₃I apresenta tempos e retenção inferiores relativamente às porfirinas e por isso não deverá interferir na separação cromatográfica.

Como referido, de um modo geral, as polaridades dos compostos em estudo são distintas, não sendo possível usar um método isocrático para obter uma separação eficiente. Deste modo, procedeu-se à elaboração de diferentes gradientes (Tabela 3.3), tendo como referência os tempos de retenção obtidos para cada composto isoladamente.

O primeiro gradiente avaliado consistiu em começar com um eluente constituído por uma mistura de 10% acetonitrilo e 90% de solução tampão de formato de amónia, diminuindo gradualmente a polaridade da fase móvel. Para este gradiente (Tabela 3.3, Entrada 1), foram obtidos os seguintes tempos de retenção: CH₃I, t_R : 3,08 minutos, porfirina **3.1**, t_R : 4,55 minutos, porfirina **3.2**, t_R : 5,43 minutos e porfirina **2.5a**, t_R : 6,45 minutos. Apesar de se obter a separação de todos os compostos em estudo, foi estudado um novo gradiente (Tabela 3.3, Entrada 2), que evitasse a alteração drástica da fase móvel sem alterar a eficiência da separação.

Tabela 3.3: Otimização das condições de separação em coluna de HPLC analítica dos compostos em estudo, utilizando diferentes gradientes.

Entrada	Tempo (min)	Fase móvel (v/v)	Produto	t _R (min)
1	0	10% acetonitrilo	CH ₃ I	3,08
		90% formato de amónia		
	7	99% acetonitrilo	3.1	4,55
		1% formato de amónia		
	9	100% acetonitrilo	3.2	5,43
10	10% acetonitrilo	2.5a	7,03	
	90% formato de amónia			
2	0	20% acetonitrilo	CH₃I	2,49
		80% formato de amónia		
	8	99% acetonitrilo	3.1	4,19
		1% formato de amónia		
	9	100% acetonitrilo	3.2	6,12
10	20% acetonitrilo	2.5a	7,44	
	80% formato de amónia			

Nesta segunda experiência, o gradiente começou com uma mistura de 20% acetonitrilo e 80% de solução tampão de formato de amónia como fase móvel (Tabela 3.3, entrada 2). Para este gradiente, foram obtidos os seguintes tempos de retenção: CH₃I, t_R: 2,49 minutos, porfirina **3.1**, t_R: 4,19 minutos, porfirina **3.2**, t_R: 6,12 minutos e porfirina **2.5a**, t_R: 7,44 minutos. Este gradiente foi considerado como a melhor condição cromatográfica para a separação de todos os compostos em estudo, estando representado na Figura 3.8 o cromatograma resultante da co-injeção de todos os produtos em estudo.

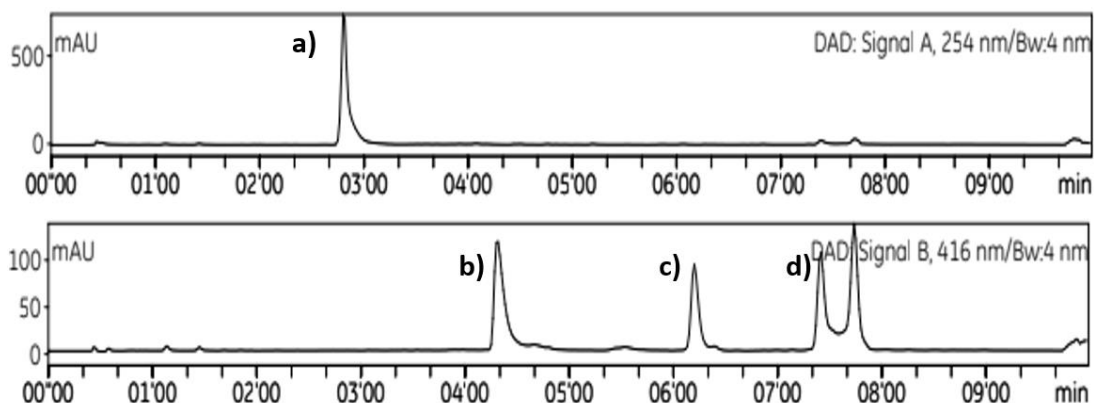
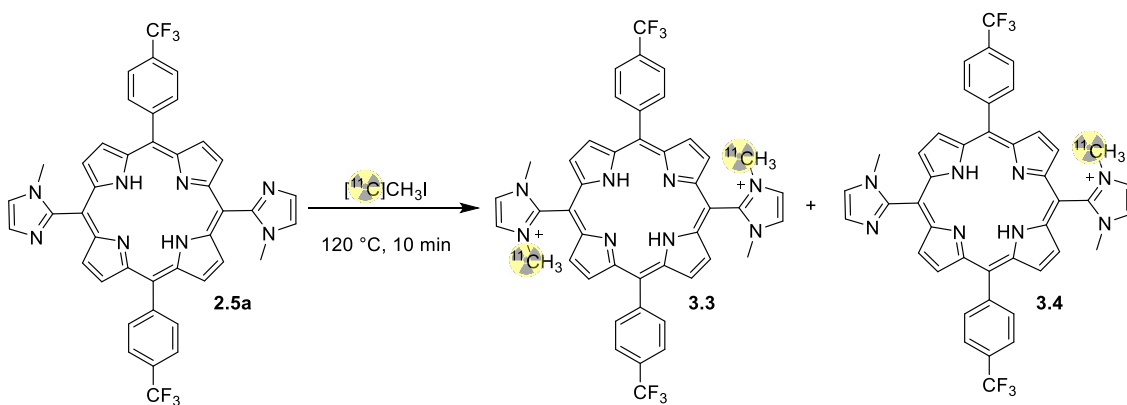


Figura 3.8: Cromatograma de HPLC analítico da co-injeção dos compostos em estudo usando as melhores condições cromatográficas com um fluxo de 3 mL/ min. a) CH₃I, t_R= 2,49 minutos, (Detetor UV-Vis = 254 nm); b) porfirina **3.1**, t_R= 4,19 minutos, (Detetor UV-Vis = 416 nm); c) porfirina **3.2**, t_R= 6,12 minutos (Detetor UV-Vis = 416 nm) e d) porfirina **2.5a**, t_R= 7,44 minutos (Detetor UV-Vis = 416 nm).

3.5 Estudos de radiomarcção com carbono-11

Após otimizadas as condições de separação por HPLC, procedeu-se à radiomarcção do composto de interesse **2.5a**. Começou por se dissolver a porfirina a radiomarcar **2.5a** em DMF, sendo esta colocada no reator. Tal como referido anteriormente, o processo de radiomarcção começa com a produção de carbono-11 no ciclotrão, inicialmente como [¹¹C]CO₂, sendo este convertido em [¹¹C]CH₄ e posteriormente em [¹¹C]CH₃I. Após produção do [¹¹C]CH₃I, este foi conduzido até ao reator onde se encontrava a solução de porfirina **2.5a**, sendo deixado a reagir durante 10 minutos a uma temperatura de 120 °C (Esquema 3.3).



Esquema 3.3: Processo de radiomarcção com carbono-11 da porfirina **2.5a** e produtos obtidos (**3.3** e **3.4**).

Para estas condições (Figura 3.9), e tal como esperado obtiveram-se as porfirinas radiomarcadas **3.3** (Figura 3.9 iii), pico b)) e **3.4** (Figura 3.9 iii), pico c)), com tempos de retenção de 4,07 e 6,13 minutos, respetivamente, estando estes t_R concordantes com as condições otimizadas anteriormente para os padrões **3.1** e **3.2**. É importante notar que cada porfirina foi obtida com 20% de conversão. O pico com tempo de retenção de 2,54 minutos foi atribuído ao CH_3I .

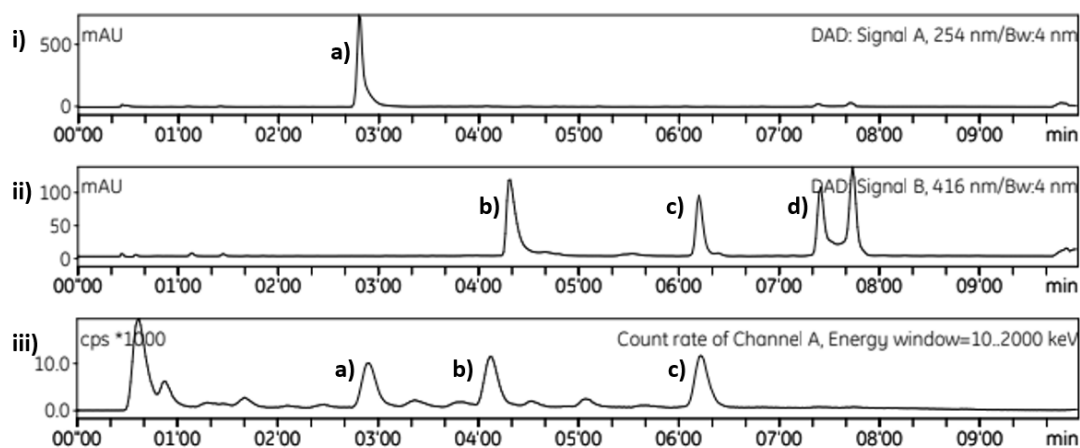


Figura 3.9: Radiocromatograma dos produtos **3.3** e **3.4**, marcados com carbono-11 usando as melhores condições cromatográficas com um fluxo de 3 mL/ min. **i)** Detetor UV-Vis (254 nm), a) CH_3I , $t_R = 2,49$ minutos, **ii)** Detetor UV-Vis (416 nm), b) porfirina **3.1**, $t_R = 4,19$ minutos, c) porfirina **3.2**, $t_R = 6,12$ minutos (Detetor UV-Vis = 416 nm) e d) porfirina **2.5a**, $t_R = 7,44$ minutos, **iii)** Detetor- γ , a) $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$, $t_R = 2,54$ minutos, b) porfirina **3.3**, $t_R = 4,07$ minutos, c) porfirina **3.4**, $t_R = 6,13$ minutos.

Sendo 10 minutos de reação considerado um tempo longo para marcação com carbono-11, e como otimizado anteriormente a frio, repetiram-se as condições de reação, o composto a marcar **2.5a** reagiu com o agente alquilante apenas durante 1 minuto. Na Figura 3.10 encontra-se o cromatograma obtido. É possível observar que esta reação favoreceu significativamente a obtenção do produto **3.4** ($t_R = 6,13$ minutos), tendo-se obtido uma conversão de 33% para este produto. Também é possível observar a obtenção do produto **3.3**, contudo a conversão de **2.5a** neste produto é reduzida não sendo possível calcular a sua conversão.

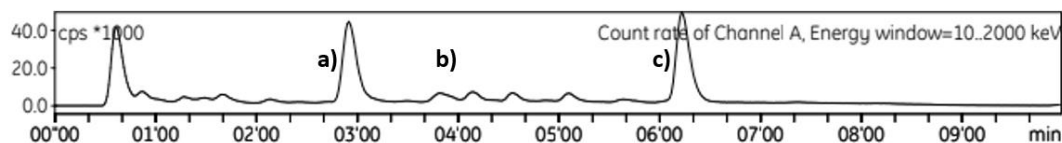


Figura 3.10: Radiocromatograma dos produtos **3.3** e **3.4**, marcados com carbono-11 ($t_R = 4,09$ minutos e $t_R = 6,13$ minutos, respetivamente).

Como referido, devido a questões temporais e disponibilidade de equipamento não foi possível a conclusão de todos os estudos de radiomarcção, contudo os estudos realizados permitiram confirmar a potencialidade da porfirina **2.5a** em ser radiomarcada, ainda assim, futuramente será necessário continuar a otimização das condições de marcação. Posteriormente, pretende-se realizar todas as otimizações das condições de separação no sistema de HPLC semi-preparativo, bem como determinar a concentração final da solução contendo o produto radiomarcado com carbono-11 para posterior aplicação *in vivo*, através da obtenção das curvas de calibração. Tendo as melhores condições de separação (sistema analítico e semi-preparativo), as condições de reação otimizadas e a concentração final de produto radiomarcado em solução, poderá então se proceder à radiomarcção da porfirina **2.5a** e realizar a posterior purificação, reformulação e análise do controlo de qualidade, para futuros estudos de biodistribuição *in vivo*.

3.6 Conclusões

Neste capítulo, foi descrito o processo de radiomarcção com carbono-11 de um potencial agente de contraste, sendo numa fase inicial descrita a reação de cationização da porfirina **2.5a**, simulando o processo de radiomarcção em laboratório, denominada de experiência a frio. Foram obtidas como melhores condições de reação $T=130\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, sendo posteriormente transpostas para a reação de radiomarcção.

Sendo o objetivo destes compostos sintetizados a aplicação como agentes de contraste PET *in vivo*, foi calculado o coeficiente de partição octanol-água para a porfirina **3.1**, tendo-se obtido um valor de $\log P_{ow}=2,10$, demonstrando assim a sua lipofilicidade. Posteriormente foram realizados estudos de citotoxicidade *in vitro*, sendo utilizada a linha celular MCF-12A. Observou-se que a porfirina **3.1** não apresenta toxicidade em concentrações inferiores a $6\text{ }\mu\text{M}$, independentemente do tempo de incubação.

Antes da realização das reações de radiomarcção otimizaram-se as condições de separação dos padrões por HPLC o que permitiu confirmar, posteriormente, a identidade dos produtos radiomarcados. Assim, foi definido um gradiente para a separação de todos os compostos em estudo, começando com uma mistura de 20% acetonitrilo e 80% de solução tampão de formato de amónia como fase móvel, aumentando gradualmente a percentagem de acetonitrilo até obter apenas 100% de acetonitrilo como fase móvel, retornando de seguida às condições iniciais. Com estas condições, obtiveram-se os seguintes tempos de retenção (t_R): CH_3I , t_R : 2,49 minutos, porfirina **3.1**, t_R : 4,19 minutos, porfirina **3.2**, t_R : 6,12 minutos e porfirina **2.5a**, t_R : 7,44 minutos, sendo estes tempos de retenção considerados como a melhor condição cromatográfica.

As reações de marcação foram realizadas através de aquecimento por irradiação MW, a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 1 e 10 minutos, tendo-se obtido em ambos os casos uma mistura de produtos di-marcado **3.3** e mono-marcado **3.4**. No primeiro caso, obteve-se maioritariamente o produto **3.4**, com uma conversão de 33%. Observou-se que com o aumento do tempo de reação, foi possível favorecer a formação do produto di-marcado **3.3** (20% de conversão). Os resultados obtidos ao longo deste capítulo são bastante promissores, sendo necessário posteriormente, realizar estudos adicionais e de

biodistribuição *in vivo*, de modo a confirmar a potencialidade deste composto para PET de carbono-11.

3.7 Referências

- [1] Elsinga, P. H. (2002). Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. *Methods*, 27, 208-217.
- [2] Grela, E., Kozłowska, J., Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta histochemica*, 120, 303-311.
- [3] Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro*, 18, 703-710.
- [4] Dahl, K., Halldin, C., Schou, M. (2017). New methodologies for the preparation of carbon-11 labeled radiopharmaceuticals. *Clinical and Translational Imaging*, 5, 275-289.
- [5] Qaim, S. M., Clark, J. C., Crouzel, C., Guillaume, M., Helmeke, H. J., Nebeling, B., Stöcklin, G. (1993). PET Radionuclide Production. *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*, 24, 1-43.
- [6] Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R., Gee, A. D. (2008). Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N radiolabels for positron emission tomography. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 8998-9033.
- [7] Antoni, G. (2015). Development of carbon-11 labelled PET tracers—radiochemical and technological challenges in a historic perspective. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 58, 65-72.
- [8] Wuest F., Berndt Mm, Kniess T. (2007). Carbon-11 labeling chemistry based upon ^{11}C methyl iodide. *Ernst Schering Research Foundation workshop*, 62, 183-213.
- [9] Larsen, P., Ulin, J., Dahlstrøm, K., Jensen, M. (1997). Synthesis of ^{11}C iodomethane by iodination of ^{11}C methane. *Applied Radiation and Isotopes*, 48, 153-157.

Capítulo 4

Conclusões finais e perspectivas futuras

As técnicas de imagiologia médica não invasivas, nomeadamente a Imagiologia de ressonância magnética (MRI) e a Tomografia por Emissão de Positrões (PET) têm ganho cada vez mais destaque ao longo dos anos uma vez que permitem um diagnóstico precoce de diversas patologias. O sucesso destas técnicas é dependente dos agentes de contraste utilizados, sendo de extrema importância o desenvolvimento dos mesmos. Deste modo, o objetivo central desta dissertação consistiu na síntese e caracterização de agentes de contraste, do tipo porfirinas fluoradas para aplicação em ^{19}F MRI e ^{11}C PET e a avaliação da sua potencialidade.

Numa primeira fase foi sintetizado um conjunto de porfirinas substituídas com diferentes grupos fluorados através do método do nitrobenzeno, mas recorrendo ao aquecimento através de irradiação MW. Tendo como finalidade a potencial aplicação como agentes de contraste de ^{19}F MRI, e sabendo que a principal problemática associada a esta técnica reside no facto de os átomos de flúor apresentarem uma velocidade de relaxação longa, diversos estudos têm evidenciado que a conjugação dos agentes de contraste com átomos paramagnéticos permite o aumento da velocidade de relaxação, permitindo uma maior aquisição por unidade de tempo. Deste modo, todas as porfirinas sintetizadas foram complexadas com um átomo paramagnético, o átomo de manganês.

Tendo as porfirinas e os respetivos complexos metálicos sintetizados e caracterizados, procedeu-se à sua avaliação através de ^{19}F RMN. De todas as porfirinas avaliadas, as porfirinas TPP-*p*-CF₃ **2.3**, DiIMIDiCF₃P **2.5a** e TPyP-CF₃ **2.8**, constituídas por grupos CF₃ homotópicos, apresentaram sinais de ^{19}F bem definidos. Os respetivos complexos metálicos, para os quais os átomos de flúor e o átomo de manganês se encontram a aproximadamente 9,8 Å de distância, evidenciaram espetros semelhantes aos obtidos para as porfirinas de base livre. Posto isto, foram calculados os tempos de relaxação (T_1 e T_2) para estas porfirinas e complexos metálicos **2.3-2.5a** e **2.7-2.9**, tendo-se observado que a introdução do átomo de manganês provoca a redução do tempo de

relaxação longitudinal (T_1) na zona dos 1000 ms para 10 ms e a redução do tempo de relaxação transversal (T_2) na zona dos 300-500 ms para os 3 ms.

De todas as porfirinas sintetizadas, é de destacar a porfirina **2.5a** e o respetivo complexo de manganês **2.7**, uma vez que estas apresentam uma ressonância de ^{19}F dominante, solubilidade de meios biológicos após cationização, e a distância entre o átomo paramagnético e os átomos de flúor é de 9,8 Å, destacando assim, não só a potencialidade deste composto em ser utilizado como agente de contraste para ^{19}F MRI, mas também a vantagem da complexação com o átomo paramagnético.

Futuramente, é necessário ainda realizar os estudos de citotoxicidade e *uptake in vitro*, bem como todos os estudos *in vivo* necessários. Adicionalmente, este agente de contraste poderá ser simultaneamente aplicado como AC ^{19}F RMN, sensível a alterações do ambiente *redox* celular, devido à capacidade do átomo de manganês sofrer reações reversíveis de redução/oxidação (Mn(II)/Mn(III)).

Numa segunda fase, e tendo como finalidade a aplicação em PET, foram realizadas reações de radiomarcção com carbono-11, a 120 °C, tendo-se obtido em todas as reações uma mistura de produtos (**3.3** e **3.4**). Com 10 minutos de reação, obteve-se uma conversão de 20% para cada produto. Por sua vez, quando a reação foi realizada durante apenas 1 minuto, obteve-se maioritariamente o produto radiomarcado **3.4**, com 33% de conversão. Estes estudos demonstraram que as porfirinas **3.3** e **3.4** apresentam as características necessárias para serem, futuramente, utilizadas como agentes de contraste para PET de carbono-11. Devido a limitações temporais não foi possível realizar as otimizações das condições de separação no sistema de HPLC semi-preparativo e determinar a concentração final da solução contendo o produto radiomarcado com carbono-11. Assim sendo, será necessária a realização destes estudos, antes da realização dos ensaios de biodistribuição *in vivo*.

De uma forma geral, com os resultados obtidos ao longo dos capítulos 2 e 3 é possível concluir que a porfirina **2.5a** após a sua devida funcionalização poderá atuar eficientemente como agente de contraste para ^{19}F MRI ou PET de carbono-11.

Como conclusões finais, e relativamente à aplicação em MRI, foi desenvolvido um possível agente de contraste do tipo porfirina que apresenta na sua constituição átomos de F permitindo a sua aplicação em ^{19}F MRI, que vem colmatar as falhas apresentadas pela ^1H MRI. Além disso, sendo o manganês um metal biogénico, não é expectável que

a sua eventual libertação resultante de processos metabólicos conduza a fenómenos de toxicidade. É de salientar que, atualmente, não existem agentes de contraste fluorados e complexados com Mn em uso em clínica. Deste modo, as porfirinas sintetizadas ao longo desta dissertação, poderão abrir perspectivas futuras nesse sentido.

Relativamente à aplicação em PET, foram obtidos resultados bastantes promissores no desenvolvido um novo de agente de contraste radiomarcado, sendo fundamental, futuramente, a realização de estudos *in vivo* de modo a avaliar a sua eficácia.

Em suma, o trabalho apresentado nesta dissertação utilizou com sucesso moléculas do tipo porfirina em duas frentes de desenvolvimento de agentes de contraste, para métodos de diagnóstico (PET e MRI), estando enquadrado nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS 3: saúde de qualidade), adotados pelas Nações Unidas. Espera-se que os resultados promissores obtidos poderão abrir portas a estudos subsequentes que consigam contribuir ativamente para o desenvolvimento de novas gerações de agentes de contraste, com uma melhor capacidade de responder às crescentes necessidades dos sistemas de saúde. De facto, a deteção de patologias de forma mais precoce e precisa contribuirá indubitavelmente para uma melhoria dos tratamentos oferecidos à população e para um melhoramento da qualidade de vida.

Capítulo 5

Experimental

Este capítulo encontra-se dividido em três secções, a 5.1 descreve os solventes e os reagentes, a 5.2 descreve a instrumentação utilizada e, por fim, a secção 5.3 descreve a síntese e caracterização de todos os compostos sintetizados ao longo do trabalho descrito nesta dissertação.

5.1 Solventes e reagentes

Os reagentes e os solventes utilizados foram adquiridos na *Sigma-Aldrich*, e *Fluorochem*. Todos os reagentes foram utilizados diretamente com a pureza descrita pelo fornecedor. Os solventes usados nas reações de síntese foram, sempre que necessário, purificados ou secos de acordo com os métodos descritos na literatura.^{1,2}

5.2 Instrumentação e metodologia

I. Cromatografia de camada fina

As reações de síntese foram controladas por cromatografia em camada fina (TLC, do inglês “*Thin Layer Chromatography*”). Foram utilizadas placas ALUGRAM® Xtra SIL G da Machery-Nagel com revelação UV₂₅₄. O eluente utilizado variou em função da polaridade dos compostos em análise.

II. Cromatografia em coluna

Alguns dos compostos sintetizados foram purificados e separados por cromatografia de adsorção em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (*Sigma-Aldrich*) e eluente variável de acordo com a polaridade dos compostos pretendidos.

III. Cromatografia *flash*

Foi utilizado um equipamento PuriFlash XS 420® Interchim, equipado com coluna PuriFlash C18 HP (15µm) e um detetor DAD (do inglês “*Diode-array detector*”). Como eluente foi usado um gradiente de acetonitrilo: solução tampão de acetato de amónia

com um fluxo de 1 mL/min, iniciando-se com 80% solução tampão de acetato de amónia: 20% acetonitrilo, alterando-se, gradualmente o gradiente até atingir 100% acetonitrilo.

IV. Ultrassons

Tendo como objetivo facilitar a dissolução dos compostos estudados, utilizou-se como sistema de ultrassons o aparelho *Bandelin Sonorex TK52*.

V. Centrifugadora

Para a determinação dos coeficientes de partição para a separação das duas fases recorreu-se à *IEC Centra-3C centrifuge*.

VI. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Todos os espectros de ressonância magnética nuclear protão (^1H RMN) e de RMN flúor (^{19}F RMN) foram obtidos no espectrómetro *BrukerAvance 400* (400 e 377 MHz, respetivamente) do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra. No primeiro utilizou-se como padrão interno o sinal do solvente residual e no segundo TFA ($\delta = -76,55$ ppm). Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) expressas em Hertz (Hz). Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: Núcleo (frequência do aparelho, solvente): desvio químico (δ , ppm), multiplicidade do sinal (s- singleto, sl- singleto largo, d- dupletto, t- tripleto, q- quarteto, m- multipletto), constante de acoplamento (J , Hertz), intensidade relativa (nH, como número de protões). O solvente deuterado utilizado em cada experiência depende da solubilidade dos compostos.

VII. Espetrometria de massa

Os espectros de massa exata de alta resolução foram realizados num aparelho Bruker Microtof pela Unidade de Massas e Proteómica – Universidade de Santiago de Compostela, e como técnica de ionização utilizou-se ESI-TOF.

VIII. Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível

Os espectros de UV-Vis foram obtidos num espectrofotômetro Hitachi U-2001 utilizando uma célula de quartzo Hellma Analytics com um comprimento ótico de 1 cm. A determinação dos coeficientes de absorvidade molar foi realizada recorrendo à lei de Beer-Lambert que estabelece uma proporcionalidade direta entre a absorvância de uma amostra (A) e a sua concentração (c), absorvidade molar (ε) e comprimento ótico (l) através da seguinte expressão:

$$A = \varepsilon c l$$

Para cada determinação, foram preparadas duas soluções mãe com ~1 mg e ~2mg de amostra, tendo sido preparadas entre 5-6 soluções-filha por diluição, com concentrações na ordem dos 10⁻⁷ a 10⁻⁵ (A=0,1 a 1). O ajuste linear dos pontos obtidos experimentalmente foi feito com recurso ao *OriginPro 2018*.

IX. Espectroscopia de fluorescência

Todos os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no espectrofluorímetro Horiba Fluoromax-4, utilizando células de quartzo Hellma Analytics de quatro faces, com percurso ótico de 1 cm.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos através da metodologia descrita na literatura,³ tendo-se usado como referência a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em tolueno cujo rendimento quântico de fluorescência é $\phi_F=0,11$.⁴

Prepararam-se soluções da referência e dos compostos cujo rendimento se pretende determinar em tolueno de modo a apresentarem no espectro de absorção UV-Visível uma absorvância de aproximadamente 0,2 para a banda *Soret*. Procedeu-se ao desarejamento das amostras e de seguida, registaram-se os espectros de emissão, excitando no comprimento de onda adequado para cada amostra.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram então calculados com recurso à seguinte equação:

$$\frac{\phi_F(\text{composto})}{\phi_F(\text{referência})} = \frac{\text{área}(\text{composto})}{\text{área}(\text{referência})} \times \frac{\text{Abs}(\text{referência})}{\text{Abs}(\text{composto})} \times \frac{n^2(\text{composto})}{n^2(\text{referência})}$$

Onde área se refere à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e n ao índice de refração do

solvente no qual a amostra e referência se encontram dissolvidos. Se o solvente utilizado na amostra e referência for o mesmo, este termo é anulado.

X. Coeficiente de partição

a) Coeficientes de absorvidade molar

Para o cálculo do coeficiente de partição, começou por se calcular o valor dos coeficientes de absorvidade molar do composto em estudo, em PBS e 1-octanol. O cálculo de ϵ foi obtido de acordo com o descrito no ponto VIII desta secção.

b) Coeficiente de partição

Para o cálculo dos coeficientes de partição recorreu-se ao “*shake-flash method*”,^{5,6} onde volumes iguais (75 mL) de 1-octanol e PBS foram misturados e deixados a repousar. No dia seguinte, dissolveu-se o composto em estudo em 3 mL de 1-octano saturado com PBS e, de seguida, foram adicionados 3 mL de PBS saturado com 1-octanol. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 3700 rpm, durante 5 minutos.

Após obter uma boa separação das duas fases, foi retirado 1 mL de cada fase e foram realizadas sucessivas diluições até obter, através de espectros UV-Visível, um valor de absorção correspondente à banda *Soret* inferior a 1. O cálculo do coeficiente de partição foi obtido através da seguinte equação:

$$\log P_{ow} = \log \left(\frac{Abs_{1-octanol}}{\epsilon_{1-octanol}} \right) / \left(\frac{Abs_{PBS}}{\epsilon_{PBS}} \right)$$

XI. ¹⁹F RMN Relaxação

O tempo de relaxação ¹⁹F longitudinal e transversal das amostras em estudo foram medidos num espectrómetro de RMN 400 MHz Bruker Avance. Uma recuperação de inversão sequência de pulso foi usada para determinação de T₁ e uma sequência de spin-eco CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) para determinar T₂. Para a determinação dos tempos de relaxação, duas soluções dos compostos em estudo foram preparadas (porfirinas de base livre e respetivos complexos de manganês) com concentrações na ordem dos 10⁻⁶ M, em DMSO-d₆ ou MeOD, de acordo com a sua solubilidade, sendo todos os estudos realizados a 25 °C.

XII. Micro-ondas

As reações assistidas por aquecimento por irradiação micro-ondas foram realizadas num equipamento micro-ondas CEM Discover® SP, do Departamento de Química da FCTUC. Foram usados tubos de vidros apropriados para o efeito com capacidade de 10 mL e 50 mL.

XIII. Ensaios *in vitro*

a) Procedimento de cultura da linha celular

As células MCF-12A (linha celular epitelial saudável da mama) foram cultivadas em frascos de tampa ventilada de 75 cm², sob condições estéreis, a 37 °C sob atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂ em meio DMEM/F12 suplementado com fator de crescimento epidérmico humano (hEGF), insulina, soro fetal de cavalo (FHS), hidrocortisona, Cholera e penicilina estreptomicina (*PenStrep*). As células foram subcultivadas duas vezes por semana com um fator de diluição de 1:2 a fim de se obter uma confluência de aproximadamente 80%.

Para o processo de subcultura, o meio de cultura foi descartado e a monocamada de células foi lavada uma vez com 5 mL de PBS. De seguida, foram adicionados 2 mL de uma solução de 0,05% tripsina-EDTA e colocou-se na incubadora durante 10 minutos de modo que a enzima exercesse a sua atividade proteolítica sob as proteínas intracelulares. Ao fim de 10 minutos, recorrendo ao microscópio foi possível observar que as células estavam destacadas do fundo do frasco (observam-se células menores, redondas e brilhantes). Assim, adicionaram-se 8 mL de meio DMEM para inibir a tripsina. Finalmente, 2 mL de suspensão foram transferidos para um novo frasco de tampa ventilada e foi adicionado meio de cultura celular.

b) Método de exclusão do *Trypan Blue*

Para o processo de contagem das células, foi usado o método de exclusão do *trypan blue* sendo o procedimento seguido semelhante ao descrito em a), até à etapa da tripsinização. Após esta fase, 8 mL de meio DMEM foram adicionados à suspensão de células e esta foi centrifugada a 1100 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso com 10 mL de meio DMEM. Num *ependorf* foram

colocados 500 µL de suspensão celular e 500 µL de meio DMEM/F12. Para a contagem celular, foram misturados 20 µL desta segunda suspensão com 20 µL de *trypan blue* de 0,4% (w/v), homogeneizado e colocado no hemocitómetro. Com recurso ao microscópio, as células foram contadas e foi calculada a média. Tendo em consideração o volume de cada quadrado do hemocitómetro (1×10^{-4} mL) e o fator de diluição, o número total de células em suspensão celular foi calculado através da equação:

$$Células/mL = x \times \frac{\text{fator de diluição}}{1 \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

onde x representa a média das células contabilizadas nos quatro quadrados do hemocitómetro para cada contagem (oito no total).

c) Ensaio de redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram subcultivadas a $1,5 \times 10^4$ células/cm² em placas de 96 poços. É importante referir que os ensaios foram realizados em três experiências independentes, sendo que todos os resultados obtidos foram comparados com as culturas controlo, isto é, células não expostas aos agentes testados que foram realizados em paralelo.

Após estabelecimento da cultura de células nas placas de 96 poços, as células foram tratadas com 12 µM, 6 µM e 3 µM de DiIMIDiCF₃PCat para um volume final de 100 µL em cada poço. A viabilidade celular foi medida às 2 h, 4 h e 24 h após adição do composto em estudo. Após estes períodos de incubação, foram adicionados 20 µL de uma solução de 0,5 mg/mL de MTT em cada poço e incubadas a 37 °C durante 3 h. Após incubação, a solução foi removida com cuidado de modo a não destruir os cristais de formazam formados e foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço de modo a dissolver completamente os cristais, resultando numa solução violeta. Por fim, a leitura das absorvâncias das amostras foi feita a 570 nm (A_{570}) num espectrofotómetro com leitor de placas multipoços *BiotekGen5*. Os valores de viabilidade celular foram determinados de acordo com a equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco}}} \times 100$$

onde $A_{amostra}$ se refere à absorção das amostras expostas ao composto em estudo e $A_{controle}$ e A_{branco} se referem à absorção do meio e do DMSO, respetivamente. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao controle, considerado 100%.

XIV. Radioquímica

a) Considerações gerais

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Radioquímica e Ciclotrão do ICNAS- Produção Unipessoal, Lda (ICNAS-P), de acordo com as regras de proteção radiológica. A manipulação de soluções radioativas foi feita através de uma barreira de proteção de chumbo com uma viseira de proteção de chumbo com vidro. Os frascos com soluções radioativas foram colocados em recipientes de chumbo adequados.

b) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A análise analítica de HPLC foi realizada usando o sistema LC Agilent 1260 Infinity II com uma Bomba Quaternária G7111B acoplada a um detetor UV-Vis (detetor de comprimento de onda variável G7114A) e de radioatividade (Raytest, modelo Gabi Star T1, 0A) e uma válvula injetora de amostra Rheodyne (IDEX H&S, Wertheim-Mondfeld, Alemanha) com uma loop de 20 μL . No HPLC foi usada uma mistura de solução tampão de formato de amónia (0,1 M, pH= 7,2) e acetonitrilo como eluente com o fluxo selecionado através da análise da coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 de fase reversa (5 μm , 4,5x150 mm, Tecnologias Agilent, USA).

c) Medida da radioatividade

A radioatividade das soluções foi medida através de um calibrador de dose (Ned Isomed 2010, versão 5.4.66, Dresden, Alemanha).

d) Módulo de radiosíntese automatizada de carbono-11

^{11}C CO₂ foi gerado num ciclotrão IBA Cyclone 18/9 (IBA, Louvain-la-Neuve, Bélgica) através da reação nuclear de $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. O gás alvo [N_2 com 0,5% O_2] foi irradiado com prótons de 16,5 MeV e a corrente do feixe foi mantida em 21 μAh (pressão da faixa de

18-19 bar) durante o bombardeio para produzir $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. O $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ foi produzido através do método de “fase gasosa” num Synthra C-11 Choline (Synthra GmbH, Hamburgo, Alemanha) a partir de $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. As reações de alquilação com ^{11}C foram realizadas através de aquecimento por irradiação de micro-ondas (PETWAVE CEM Discover® SP).

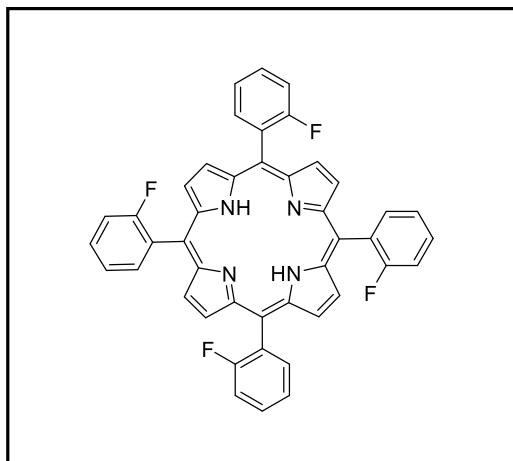
5.3 Síntese e caracterização estrutural dos compostos

5.3.1 Síntese de *meso*-arilporfirinas

Procedimento geral: Num tudo de micro-ondas (MW), colocou-se 3,08 mmol de aldeído (ou mistura de aldeídos), 0,22 mL de pirrole (3,08 mmol), 10 mL de ácido acético e 5,4 mL de nitrobenzeno. A reação foi conduzida usando irradiação MW com uma potência máxima de 125 W, utilizando a seguinte rampa de aquecimento: 80 °C durante 5 minutos, 120 °C durante 4 minutos, 140 °C durante 4 minutos e 160 °C durante 4 minutos. De seguida, a reação foi conduzida a 175 °C durante 40 minutos. No caso de porfirinas simétricas, após terminar a reação, precipitou-se os compostos por adição de um solvente, e deixou-se a 4 °C durante a noite. De seguida, o precipitado foi filtrado. No caso de porfirinas não simétricas, evaporaram-se os solventes a pressão reduzida e purificou-se o composto por coluna cromatográfica de gel de sílica.

5,10,15,20-tetra(2-fluorofenil) porfirina (TPP-*o*-F) (2.1)

Utilizando o procedimento geral do método do nitrobenzeno,^{7,8} juntou-se 2-fluorobenzaldeído (0,32 mL/ 3,08 mmol). Precipitou-se com metanol e colocou-se no frigorífico. Após 24h, filtrou-se o precipitado e secou-se sob vácuo. O produto final foi obtido com um rendimento de 13% (0,07 g).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,84 (s, 8H); 8,15-8,09 (m, 4H); 7,78-7,76 (m, 4H); 7,58-7,49 (m, 8H); -2,20 (s, 2H).

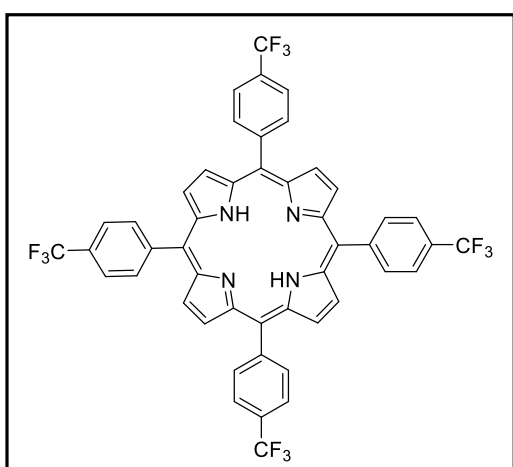
RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm)= (-112,51)- (-112,68) (td, $J=28,2, 10,5$ Hz, 4F).

MS (EI): m/z obtido 686,2086 $[\text{M}^+]$; calculado para $[\text{C}_{44}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{F}_4]$: 686,2088.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 417 ($3,4 \times 10^5$); 511 ($1,4 \times 10^4$); 543 ($3,9 \times 10^3$); 586 ($4,6 \times 10^3$); 649 ($1,5 \times 10^3$).

5,10,15,20-tetra(4-trifluorometilfenil)-porfirina (TPP-*p*-CF₃) (2.3)

Utilizando o procedimento geral do método do nitrobenzeno, juntou-se 4-(trifluorometil) benzaldeído (0,32 mL, 3,08 mmol). Precipitou-se com metanol e colocou-se no frigorífico. Após 24 h, filtrou-se o precipitado e secou-se sob vácuo. O produto final foi obtido com um rendimento de 30% (0,21 g).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 8,81 (s, 8H); 8,34 (d, $J=7,9$ Hz, 8H); 8,05 (d, $J=8,0$ Hz, 8H); -2,83 (s, 2H).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO): δ (ppm): -60,55 (s, 12F).

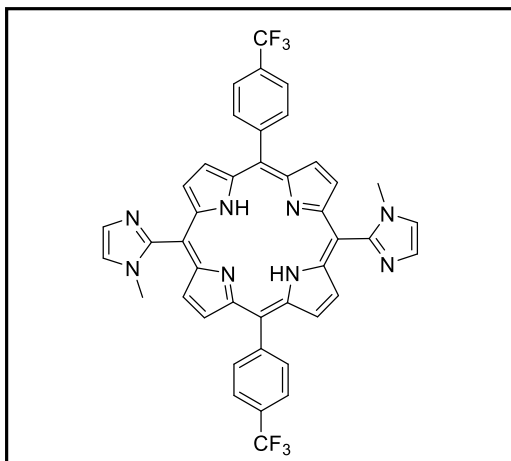
MS (ESI-TOF): m/z obtido 887,2033 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $[\text{C}_{48}\text{H}_{27}\text{F}_{12}\text{N}_4]$: 887,2044.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 418 ($3,3 \times 10^5$); 512 ($1,7 \times 10^4$); 546 ($5,8 \times 10^3$); 589 ($5,1 \times 10^3$); 645 ($2,5 \times 10^3$).

5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (DiIMIDiCF₃P) (2.5 a)

Utilizando o procedimento geral do método do nitrobenzeno, juntou-se 1-metilimidazole-2-carboxaldeído (0,227 g, 2,06 mmol) e 4-(trifluorometil) benzaldeído (0,14 mL, 1,03 mmol). Após o término da reação, evaporou-se o solvente recorrendo à evaporação a pressão reduzida. A purificação do crude foi realizada por cromatografia em coluna de gel de sílica. Inicialmente usou-se diclorometano e n-hexano (2:1) como eluente de modo a remover o nitrobenzeno ainda presente, de seguida aumentou-se a polaridade do eluente, começando inicialmente com diclorometano e aumentando gradualmente a quantidade de metanol. No final, o solvente foi evaporado.

De salientar que esta reação deu origem a três compostos diferentes, separados através da cromatografia em coluna descrita acima. Para a porfirina de interesse **2.5a**, foram realizadas sucessivas lavagens com éter dietílico e água, sendo no final precipitado pela adição de pentano. Após filtração, foi obtido o produto de interesse com um rendimento de 7% (0,04 g).



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): mistura de atropisômeros= 8,86-8,84 (m, 8H); 8,41-8,29 (m, 4H); 8,06 (d, *J*=8,1 Hz, 4H); 7,70 (d, *J*=1,2 Hz, 1H); 7,68 (d, *J*=1,2 Hz, 1H); 7,51 (d, *J*=1,2 Hz, 1H); 7,50 (d, *J*=1,2 Hz, 1H); 3,49 (s, 3H); 3,42 (s, 3H); -2,87 (s, 2H).

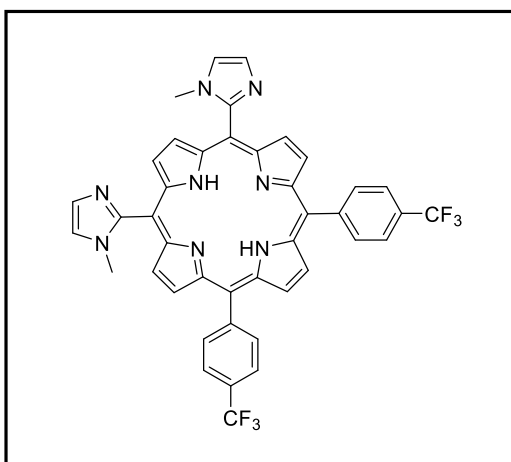
RMN ¹⁹F (377 MHz, MeOD): δ (ppm): -61,21 (s, 6F).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 759,2418 [M+H]⁺, calculado para [C₄₂H₂₉F₆N₈]: 759,2414.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs}, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹): 420 (1,2x10⁵); 513 (9,6x10³); 548 (4,3x10³); 587 (3,7x10³); 647 (1,7x10³).

5,10-bis(4-(trifluorometil)fenil)-15,20-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (DiIMIDiCF₃P) (2.5 b)

O produto de interesse foi obtido com um rendimento de 12% (0,07 g).

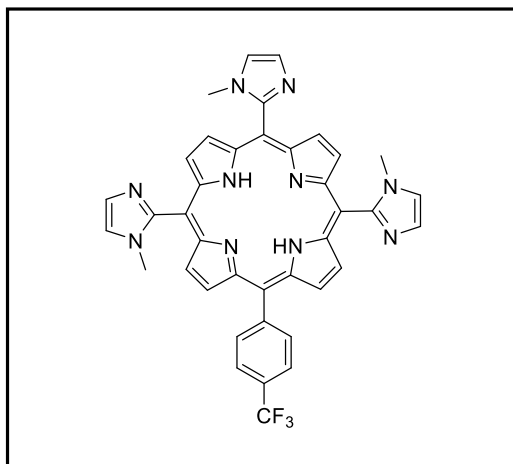


RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm): mistura de atropisômeros= 8,86-8,84 (m, 8H); 8,40-8,27 (m, 4H); 8,08-8,03 (m, 4H); 7,68 (s, 2H); 7,50 (s, 2H); 3,52 (s, 3H); 3,44 (s, 3H); -2,82 (s, 2H).

RMN ¹⁹F (377 MHz, CDCl₃): δ (ppm): -62,11 (s, 6F).

5- (4-(trifluorometil)fenil) -10,15,20-tris (1-metilimidazole-2-il) porfirina (TriIMIMCF₃P) (2.5 c)

O produto de interesse foi obtido com um rendimento de 8% (0,05 g).

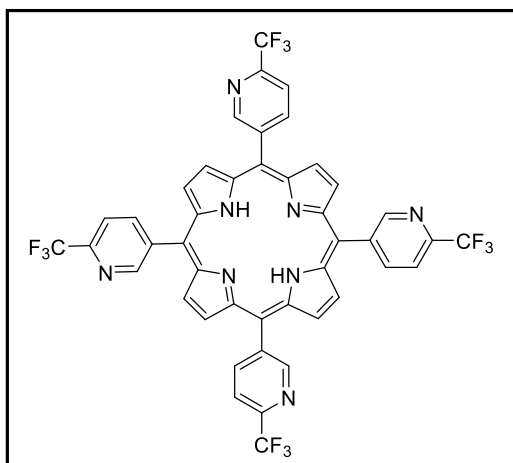


RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm): mistura de atropisômeros= 8,88-8,84 (m, 8H); 8,43-8,25 (m, 2H); 8,08-8,04 (m, 2H); 7,70-7,68 (m, 3H); 7,50-7,48 (m, 3H); 3,64 (s, 12H); -2,17 (s, 2H).

RMN ^{19}F (377 MHz, CDCl_3): δ (ppm): -62,15 (s, 3F).

5,10,15,20-tetra(6-(trifluorometil)piridin-3-il) porfirina (TPyP-CF₃) (2.8)

Utilizando o procedimento geral do método do nitrobenzeno, juntou-se 6-(trifluorometil)piridina-3-carboxaldeído (0,540 g, 3,08 mmol). A purificação do crude foi realizada através da precipitação com éter dietílico e reservou-se no frio. Filtrou-se e secou-se sob vácuo obtendo-se a porfirina pretendida com um rendimento de 21% (0,15 g).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 9,58 (s, 4H); 8,86 (s, 8H); 8,74-8,72 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H); 8,22-8,20 (d, $J = 7,9$ Hz, 4H); -2,82 (s, 2H).

RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO): δ (ppm)= -65,82 (s, 12F).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 891,1864 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $[\text{C}_{44}\text{H}_{23}\text{F}_{12}\text{N}_8]$: 891,1854.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 420 ($3,6 \times 10^5$); 514 ($1,9 \times 10^4$); 546 ($6,5 \times 10^3$); 587 ($5,4 \times 10^3$); 644 ($2,4 \times 10^3$).

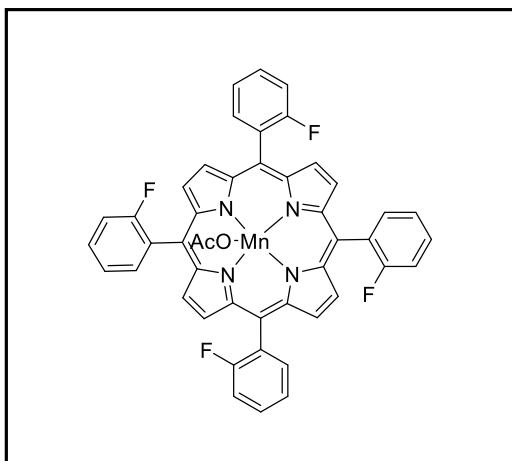
5.3.2 Complexação de *meso*-arilporfirinas com manganês

Procedimento geral convencional: Para a complexação das porfirinas através de aquecimento convencional, começou por se adicionar num balão de 50 mL a porfirina de interesse com 6 equivalentes de acetato de manganês (II) ($\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) e 4 equivalentes de acetato de sódio (CH_3COONa), usando 3 mL de ácido acético como solvente. As reações foram conduzidas a 100 °C durante 3 h. O controlo das reações foi realizado através de espectroscopia de UV-Vis, observando-se o desvio da banda *Soret* para comprimentos de onda superiores e a transformação das 4 bandas Q em apenas 2 bandas Q. Após as reações estarem completas, a mistura reacional foi arrefecida e a mistura foi extraída quatro vezes com diclorometano e água, tendo como objetivo remover o excesso de sal que não reagiu durante a reação. No final foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica de modo a remover resíduos de água ainda presentes e o solvente foi evaporado.

Procedimento geral micro-ondas: Para a complexação das porfirinas através de irradiação micro-ondas, começou por se adicionar num tubo de MW a porfirina de interesse com 6 equivalentes de acetato de manganês (II) ($\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) e 4 equivalentes de acetato de sódio (CH_3COONa), usando 0,2 mL de ácido acético como solvente. As reações foram conduzidas com uma potência máxima de 120 W, a 100 °C durante 30 minutos. O controlo das reações e o processo de *work-up* no final da reação foi semelhante ao realizado para as reações conduzidas por aquecimento convencional.

Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirinato de manganês (III) (Mn(III)-TPP-*o*-F) (2.2)

Seguindo os procedimentos gerais descritos acima, para a reação conduzida em aquecimento convencional, utilizou-se 0,100 g (0,145 mmol) da porfirina **2.1**. A síntese assistida por irradiação micro-ondas foi conduzida em menor escala, utilizando-se apenas 0,010 g (0,015 mmol) de porfirina **2.1**. Após o *work-up* descrito anteriormente, foi obtido 0,076 g de produto de interesse ($\eta = 76\%$, aquecimento convencional); 0,008 g ($\eta = 81\%$, MW).



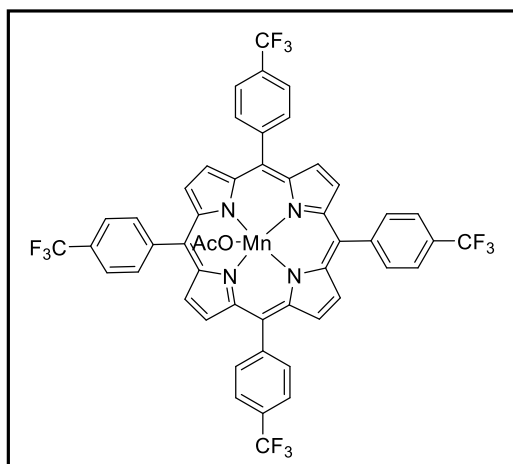
RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO): δ (ppm) = -112,54 (s, 4F).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 739,1314 [M-CH₃COO]⁺, calculado para [C₄₄H₂₄F₄MnN₄]: 739,1318.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 471 (5,9x10⁴); 577 (5,8x10³); 608 (3,9x10³).

Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(4-trifluorometilfenil)porfirinato de manganês (III) (Mn(III)-TPP-*p*-CF₃) (2.4)

Seguindo os procedimentos gerais descritos acima, para a reação conduzida em aquecimento convencional, utilizou-se 0,100 g (0,113 mmol) da porfirina **2.3**. A síntese assistida por irradiação micro-ondas foi conduzida em menor escala, utilizando-se apenas 0,010 g (0,011 mmol) de porfirina **2.3**. Após o *work-up* descrito anteriormente, foi obtido 0,076 g de produto de interesse (η = 76%, aquecimento convencional); 0,0085 g (η = 85%, MW).



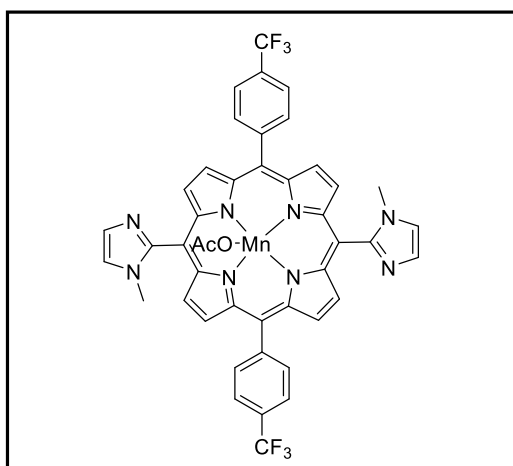
RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO): δ (ppm) = -61,11 (s, 12F)

MS (ESI-TOF): m/z obtido 939,1189 [M-CH₃COO]⁺, calculado para [C₄₈H₂₄F₁₂MnN₄]: 939,1190.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 477 (9,8x10⁴); 584 (7,8x10³); 619 (7,7x10³).

Acetato de 5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1-metilimidazol-2-il)porfirinato de manganês (III) (Mn(III)-DiIMIDiCF₃P) (2.6)

Seguindo os procedimentos gerais descritos acima, para a reação conduzida em aquecimento convencional, utilizou-se 0,100 g (0,132 mmol) da porfirina **2.5a**. A síntese assistida por irradiação micro-ondas foi conduzida em menor escala, utilizando-se apenas 0,010 g (0,013 mmol) de porfirina **2.5a**. Após o *work-up* descrito anteriormente, foi obtido 0,077 g de produto de interesse ($\eta = 77\%$, aquecimento convencional); 0,008 g ($\eta = 80\%$, MW).

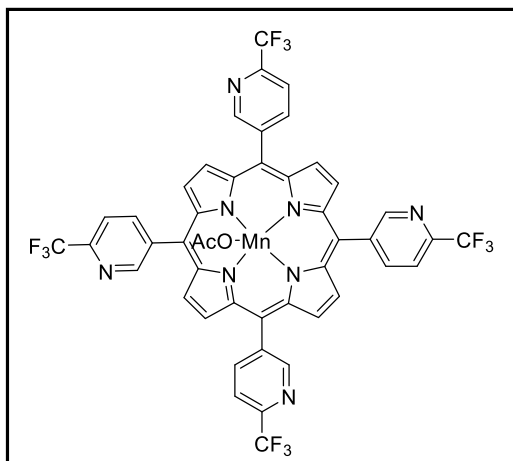


RMN ¹⁹F (377 MHz, DMSO): δ (ppm) = -62,70
(s, 6F)

UV-Vis (Tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 478
(5,0x10⁴); 583 (6,0x10³); 612 (4,4x10³).

Acetato de 5,10,15,20-tetraquis(6-(trifluorometil)piridin-3-il)porfirinato de manganês (III) (Mn(III)-TPyP-CF₃) (2.9)

Seguindo os procedimentos gerais descritos acima, para a reação conduzida em aquecimento convencional, utilizou-se 0,050 g (0,056 mmol) da porfirina **2.8**. A síntese assistida por irradiação micro-ondas foi conduzida em menor escala, utilizando-se apenas 0,010 g (0,011 mmol) de porfirina **2.8**. Após o *work-up* descrito anteriormente, foi obtido 0,031 g de produto de interesse ($\eta = 62\%$, aquecimento convencional); 0,008 g ($\eta = 80\%$, MW).



RMN ^{19}F (377 MHz, DMSO): δ (ppm) = -66,32 (s, 12F).

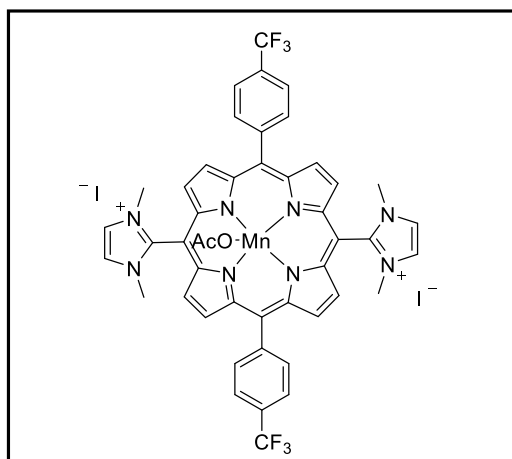
MS (ESI-TOF): m/z obtido 943,1000 [M-CH₃COO]⁺, calculado para [C₄₄H₂₀F₁₂MnN₈]: 943,0994.

UV-Vis (tolueno): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 478 (8,4x10⁴); 583 (7,6x10³); 618 (5,2x10³).

5.3.3 Alquilação de *meso*-arilporfirinas

Di-iodeto de [acetato de 5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de manganês (III)] (Mn(III)-DiIMIDiCF₃PCat) (2.7)

Num balão de 50mL colocou-se a porfirina 2.6 (0,05 g, 0,006 mmol) dissolvida em 0,2 mL de DMF e adicionou-se faseadamente 100 equivalentes de iodeto de metilo (0,38 mL, 6,15 mmol). A mistura reacional foi mantida em agitação, a 25 °C, durante 12 horas. No final da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e lavado sucessivas vezes com éter dietílico. O composto de interesse foi obtido com um rendimento de 89% (0,04 g).



RMN ^{19}F (377 MHz, MeOD): δ (ppm) = (-64,44) – (-64,56) (m, 6F).

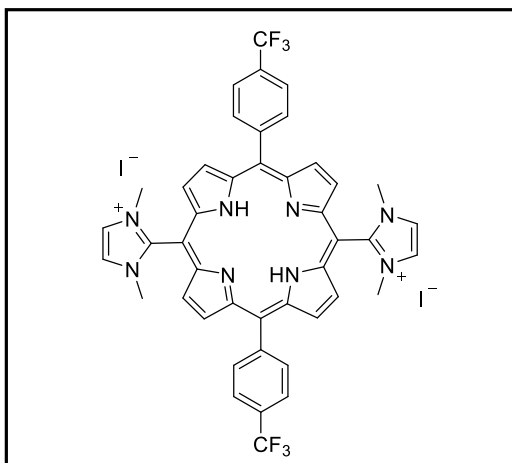
MS (ESI-TOF): m/z obtido 968,1085 [M-CH₃COO - I]⁺, calculado para [C₄₄H₃₂F₆MnN₈]: 968,1079.

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 456 (6,4x10⁴); 559 (7,1x10³); 602 (3,1x10³).

Di-iodeto de [5,15-bis(4-(trifluorometil)fenil)-10,20-bis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirina] (DiIMIDiCF₃PCat) (3.1)

Num tudo de MW colocou-se a porfirina 2.5a (0,04 g, 0,055 mmol) dissolvida em 0,2 mL de DMF e adicionou-se iodeto de metilo (0,0114 mL, 0,184 mmol). A mistura

reacional foi colocada no MW e utilizou-se como condições reacionais $P_{\text{máx}}=125$ W, $T=130$ °C, durante 1 minuto. No final da reação, adicionou-se éter dietílico, colocou-se no frigorífico durante a noite e filtrou-se o precipitado obtido. Foi obtido o composto de interesse com um rendimento de 89% (0,04 mg).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 9,16 (sl, 4H); 9,00 (sl, 4H); 8,49 (d, $J=7,9$ Hz, 4H); 8,25 (s, 4H); 8,24 (d, $J=7,9$ Hz, 4H); 3,84 (s, 12H).

RMN ^{19}F (377 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= -63,76 (s, 6F).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 394,1401 [$\text{M}-2\text{I}$] $^{2+}/2$, calculado para $[\text{C}_{44}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_8]^{2+}/2$: 394,1401.

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 415 ($1,3 \times 10^5$); 511 ($7,5 \times 10^3$); 546 ($3,5 \times 10^3$); 584 ($2,9 \times 10^3$); 638 ($2,7 \times 10^3$).

5.4 Radiomarcagem com carbono-11

As experiências de marcação com ^{11}C foram realizadas no Laboratório de Radioquímica e Ciclotrão do ICNAS-P. A produção do radioisótopo de ^{11}C foi realizada pela Ângela Neves do ICNAS-P.

5.4.1 Protocolo geral de radiomarcagem com ^{11}C

Num frasco de amostra, 0,002 g (0,002 mmol) do composto **2.5a** dissolvido em DMF seco (0,2 mL). O ^{11}C produzido no módulo de radiosíntese Synthra foi conduzido até ao reator que contém a solução a radiomarcar. De modo a confirmar a obtenção do produto marcado, recorreu-se a um HPLC analítico HPLC *Agilent Technologies 1200 series* equipado com uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4.6 x 150 mm). Como eluente foi usado uma mistura de solução tampão de formato de amónia e acetonitrilo, com fluxo adequado, sendo a deteção do produto controlada por detetores UV-Vis (254 nm e 416 nm) e detetores de radioatividade.

5.5 Referências

- [1] Armarego, W. L. (2012). *Purification of laboratory chemicals*. 7th edition, Butterworth-Heinemann.
- [2] Burrows, H. D., Pereira, M. M. (2006). *Química: síntese e estrutura: uma abordagem prática*, Escolar Editora, Volume 1.
- [3] Parker, C. A., Rees, W. T. (1960). Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst*, 85, 587-600.
- [4] Pineiro, M., Carvalho, A. L., Pereira, M. M., Gonsalves, A. D. A. R., Arnaut, L. G., Formosinho, S. J. (1998). Photoacoustic measurements of porphyrin triplet-state quantum yields and singlet-oxygen efficiencies. *Chemistry—A European Journal*, 4, 2299-2307.
- [5] Collander, R. U. N. A. R., Lindholm, M., Haug, C. M. (1951). The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta Chemica Scandinavica*, 5, 774-780.
- [6] Fujita, T., Iwasa, J., Hansch, C. (1964). A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *Journal of the American Chemical Society*, 86, 5175-5180.
- [7] Pereira, M. M. (1991). Estudos de activação de peróxido de hidrogénio como oxidante – catálise por metaloporfirinas e preparação de ácidos peroxocarboxílicos, Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- [8] Gonsalves, A. D. A. R., Varejão, J. M., Pereira, M. M. (1991). Some new aspects related to the synthesis of *meso*-substituted porphyrins. *Journal of heterocyclic chemistry*, 28, 635-640.