

Ana Vanessa Cordeiro Simões

# SÍNTESE DE MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS FLUORADOS. DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS MARCADORES PARA TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRÕES

Tese de Doutoramento em Química, ramo de especialização em Química Médica, orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, co-orientada pelo Professor Doutor Antero Abrunhosa, e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA







Universidade de Coimbra  
Departamento de Química – Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Síntese de macrociclos tetrapirrólicos fluorados.  
Desenvolvimento de potenciais marcadores  
para Tomografia por Emissão de Positrões**

Ana Vanessa Cordeiro Simões

Tese de Doutoramento em Química, ramo de especialização em Química Médica, orientada pela Professora Doutora Maria Miguéns Pereira, co-orientada pelo Professor Doutor Antero Abrunhosa, e apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

**Coimbra, 2014**



*"Jamais considere os seus estudos como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável para aprender, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencerá."*

Albert Einstein





# Agradecimentos

Chegou o momento de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de forma directa ou indirecta para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal ao longo desta jornada. A caminhada não foi curta, e em alguns momentos pareceu uma travessia sem fim e com vários obstáculos a serem superados, mas posso afirmar com toda a convicção que esses obstáculos só serviram para continuar com mais garra e obstinação. O desafio foi grande mas as motivações foram grandiosas. Por todo este trajecto dedico algumas palavras às pessoas que foram fundamentais nesta caminhada, pessoas que sempre estiveram comigo e/ou que simplesmente passaram pela minha vida, mas que deixaram impressas suas marcas.

Em primeiro lugar o meu sincero agradecimento à Doutora Mariette Pereira, minha orientadora, por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo do meu percurso académico, desde a licenciatura até ao fim do Doutoramento, pelas portas que me abriu e pelo facto de ter possibilitado a entrada numa área com tão grandes potencialidades. Agradeço, o apoio científico, convivência pessoal e inestimável ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Doutor Antero Abrunhosa, agradeço o facto de me ter dado a conhecer e ajudado nos primeiros passos pelo fascinante mundo da Radioquímica. Aos colegas Vítor Alves, Sérgio Carmo, João Oterelo e Ângela Neves, por todo o apoio técnico, disponibilidade e auxílio nas experiências de marcação radioactiva dos compostos.

O meu obrigado ao Doutor Jordi Llop, por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, por ter disponibilizado todos os recursos humanos e materiais para a síntese dos compostos radioactivos em módulo automático, no CIC-biomaGUNE, Unidade de Imagiologia Molecular – Radioquímica, em San Sebastian, Espanha. Um agradecimento especial aos colegas e novos amigos Maria Puigvila, Mikel González, Aitor Lekuona, Mikel Errasti, Larraitz Gil Iceta e Carlos Pérez Campaña por terem permitido que me sentisse integrada no grupo.

Ao Doutor Rui Brito e ao Pedro Cruz pelas medidas de Ressonância Magnética Nuclear de todos os compostos desenvolvidos ao longo deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Catálise e Química Fina, pela amizade, companheirismo e momentos de boa disposição não só durante estes quatro anos de Doutoramento e sim desde a minha chegada ao grupo em 2006. À Ana, Ângela, Rui, César, Nuno, Gonçalo, Álvaro, Roberto, Artur, Andreia, Carlos, Mário e Sara, aos colegas “do 2º andar”, Ana Borba, Telma, Pina, Fábio e Elsa, o meu sincero obrigado pela convivência e amizade.

Agradeço à minha família, ao meu irmão e aos meus pais, esses como ninguém me passaram e passam as lições mais valiosas, conduzindo-me com amor e firmeza pela vida, infundindo a confiança necessária para que eu persiga e torne realidade todos os meus objectivos, sempre com alegria, determinação, honestidade e coragem.

À São, à Lena pela forte amizade, por estarem ao meu lado e me apoiar sem restrições, à Dora e à Carla, pela amizade, pela alegre e tranquila convivência, pela energia positiva e pelo carinho. Ao “grupo das sextas-feiras”, Francisco, Sónia, João e Joana, pelas gargalhadas, boa disposição e por me proporcionarem momentos de tão preciosa descontração!

A todos aqueles que me brindaram com o seu apoio, fica o meu reconhecimento e carinho. Muito abrigado!





# Índice

|              |     |
|--------------|-----|
| Resumo       | i   |
| Abstract     | iii |
| Abreviaturas | v   |
| Nomenclatura | vii |

## Capítulo 1 – Introdução 1

|   |    |
|---|----|
| <b>1.1 Macro ciclos tetrapirrólicos</b>                           | 3  |
| 1.1.1 Métodos de síntese de <i>meso</i> -arilporfirinas fluoradas | 5  |
| <b>1.2 Terapia Fotodinâmica</b>                                   | 9  |
| <b>1.3 Imagem Molecular</b>                                       | 13 |
| 1.3.1 Tomografia por Emissão de Positrões (PET)                   | 17 |
| <b>Bibliografia</b>   | 26 |

## Capítulo 2 – Síntese de macrociclos tetrapirrólicos fluorados anfílicos e derivados conjugados 35

|   |    |
|---|----|
| <b>2.1 Síntese de <i>meso</i>-tetraquisarilporfirinas fluoradas</b>                   | 37 |
| <b>2.2. Síntese de <i>meso</i>-tetraquisarilbacterioclorinas e clorinas fluoradas</b> | 49 |
| <b>2.3. Síntese de conjugados contendo macrociclos tetrapirrólicos</b>                | 54 |
| - Conjugados de Paracetamol   | 55 |
| - Conjugados de Aminoácidos   | 59 |
| <b>2.4. Conclusão</b>   | 63 |
| <b>Bibliografia</b>   | 66 |

## Capítulo 3 – Síntese de porfirinas marcadas com flúor-18 para desenvolvimento de potenciais marcadores para Tomografia por Emissão de Positrões 71

|  |    |
|--|----|
| <b>3.1 Síntese de porfirinas precursoras da reacção de fluoração (reacção “<i>fria</i>”)</b> | 73 |
|--|----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>3.2 Marcação de porfirinas com flúor-18 (reacção “quente”)</b>                               | 82  |
| <b>3.3 Marcação de porfirinas com flúor-18 em módulo automático</b>                             | 87  |
| <b>3.4 Síntese porfirinas anfifílicas precursoras da reacção de fluoração (reacção “fria”)</b>  | 92  |
| <b>3.5 Marcação de porfirinas anfifílicas com flúor-18 (reacção “quente”)</b>                   | 99  |
| <b>3.6 Estudos preliminares de síntese de complexos de cobre (II) de porfirinas anfifílicas</b> | 103 |
| <b>3.7 Conclusão</b>  | 105 |
| <b>Bibliografia</b>   | 107 |

## **Capítulo 4 – Parte Experimental** 109

|   |     |
|---|-----|
| <b>4.1 Instrumentação</b>   | 111 |
| I. Pontos de fusão  | 111 |
| II. Análise Elementar   | 111 |
| III. Espectrometria de Massa  | 111 |
| IV. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear   | 112 |
| V. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível  | 112 |
| VI. Fluorescência   | 112 |
| VII. Cromatografia em camada fina   | 112 |
| VIII. Cromatografia em coluna   | 113 |
| IX. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)   | 113 |
| X. Ultrassons   | 113 |
| XI. Módulo automático de síntese com flúor-18   | 113 |
| <b>4.2 Secção Experimental referente ao Capítulo 2. Síntese e caracterização estrutural</b> | 114 |
| 4.2.1 Síntese de <i>meso-tetraquisporfirinas</i> fluoradas                                  | 114 |
| (A) Procedimento geral de síntese <i>via</i> método do nitrobenzeno                         | 114 |
| 4.2.2. Derivatização de <i>meso-tetraquisarilporfirinas</i> fluoradas                       | 115 |
| (B) Procedimento geral de síntese de sulfonamidas   | 116 |
| (C) Procedimento geral de síntese de ésteres sulfónicos                                     | 117 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.3. Síntese de <i>meso-tetraquisarilbacterioclorinas</i> e clorinas fluoradas   | 123 |
| (D) Procedimento geral de síntese de bacterioclorinas pelo método sem solvente   | 123 |
| (E) Procedimento geral de síntese de clorinas  | 125 |
| 4.2.4. Síntese de conjugados contendo macrociclos tetrapirrólicos  | 127 |
| (F) Procedimento geral para a hidrólise dos grupos éster metílico de aminoácidos   | 133 |
| <br>   |     |
| <b>4.3 Secção Experimental referente ao Capítulo 3. Síntese e funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos para potencial aplicação em PET</b> | 135 |
| 4.3.1 Síntese e derivatização de porfirinas hidroxiladas   | 135 |
| (A) Derivatização via reacção com epóxido  | 135 |
| (B) Derivatização via clorossulfonação e reacção com aminas  | 136 |
| 4.3.2. Síntese dos precursores contendo um grupo tosilo  | 138 |
| (C) Procedimento geral de síntese de tosil-porfirinas  | 139 |
| 4.3.3. Síntese de porfirinas fluoradas <i>via</i> reacção de substituição nucleofílica   | 141 |
| (D) Procedimento geral   | 141 |
| 4.3.4. Síntese de complexos de cobre (II)  | 142 |
| (E) Procedimento geral   | 142 |
| <b>Bibliografia</b>  | 145 |





## Resumo

No trabalho apresentado nesta tese foram desenvolvidos estudos de síntese, optimização e *design* molecular da estrutura de macrociclos tetrapirrólicos com átomos de flúor na sua estrutura, no sentido de obter potenciais novos fotossensibilizadores e /ou marcadores para diagnóstico por imagiologia médica, usando a técnica de tomografia por emissão de positrões (PET).

Tendo estudos recentes revelado que compostos do tipo macrociclo tetrapirrólico, nomeadamente porfirinas e hidroporfirinas, apresentam uma elevada selectividade para células tumorais, a sua marcação com radionuclídeos assume particular interesse pois pode, não só, fornecer um novo biomarcador de imagem para o diagnóstico tumoral mas também uma importante ferramenta para a avaliação *in vivo* da farmacocinética e da eficácia de novos fotossensibilizadores.

Do ponto de vista estrutural, os estudos foram iniciados seleccionando uma série de compostos cujo *template* molecular eram *meso-tetraquisarilporfirinas* com átomos de flúor na sua estrutura. De entre os vários métodos de síntese existentes na literatura, seleccionou-se o método do nitrobenzeno, por partir apenas do pirrol e dos aldeídos fluorados desejados, permite obter a *meso-tetraquis*(2-fluoro-5-clorossulfonyl)fenilporfirina, a *meso-tetraquis*(2,6-difluoro-3-clorossulfonyl)fenilporfirina e a *meso-tetraquis*(2-trifluoro metil)fenilporfirina, directamente a partir do meio de reacção. Considerando a elevada importância de aumentar a especificidade e selectividade das porfirinas para órgãos-alvo, as suas propriedades anfífilas foram modeladas recorrendo à reacção de clorossulfonação e posterior derivatização com álcoois e aminas para obtenção de uma nova família de dez novas porfirinas contendo grupos éster sulfónico e sulfonamida, com rendimentos superiores a 70%. O carácter lipofílico destes compostos foi estudado através da medição dos respectivos coeficientes de partição octanol/água, usando como técnica a espectroscopia de emissão de fluorescência, obtendo-se valores de  $\log P_{\text{octanol/água}}$  entre 0,5 e 2,33. Para que esta nova família de compostos pudesse contribuir para o desenvolvimento de novos potenciais fotossensibilizadores, foi necessário conferir-lhes características estruturais que permitissem absorver luz preferencialmente na região do infravermelho. Assim, foram sintetizadas *meso-tetraquisarilbacterioclorinas* e *meso-tetraquisarilclorinas* fluoradas anfífilas, usando um método de síntese ambientalmente sustentável por redução com diimida das porfirinas precursoras, sem recurso à utilização de solventes ou de bases adicionais. Na síntese das *meso-tetraquisarilclorinas* foi também usada uma nova aproximação sintética que, após redução das porfirinas *via* diimida, envolveu a

oxidação selectiva da bacterioclorina, formada como subproduto, à respectiva clorina, com recurso a  $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Ainda com o intuito de melhorar a especificidade dos potenciais sensibilizadores desenvolvidos ao longo deste trabalho, para células tumorais, foram preparados derivados conjugados de porfirinas e hidroporfirinas, funcionalizadas com grupos paracetamol e aminoácido. Todos os novos compostos foram completamente caracterizados por espectroscopia de UV-visível, de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

Com vista à preparação de potenciais marcadores com flúor-18, para aplicação em diagnóstico usando Tomografia por Emissão de Positrões, foram primeiramente efectuados estudos de optimização de síntese laboratorial, a “frio”, de porfirinas não-simétricas contendo um bom grupo abandonante (tosilato), precursoras da reacção de fluoração com um agente fluorante não radioactivo (fluoreto de *tetra*-butilamónio). Foi então sintetizada uma *meso*-arilporfirina não simétrica, incorporando um grupo hidroxilo na sua estrutura, usando o método do nitrobenzeno. Esta porfirina foi derivatizada com um grupo tosilo para servir como precursor da reacção de fluoração, que serviu de referência para os estudos da marcação radioactiva com flúor-18. Foram ainda optimizadas condições de purificação/separação, por HPLC analítico e semi-preparativo, da tosil-porfirina e correspondente porfirina fluorada. Após todas as condições de síntese e purificação optimizadas, a metodologia foi transposta para processos de marcação com flúor radioactivo, desenvolvidos no laboratório do Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde (ICNAS), obtendo-se porfirinas marcadas com flúor-18 com rendimentos aceitáveis e grau de pureza química superior a 95%.

Foram também iniciados, laboratorialmente, estudos preliminares relativos à síntese de complexos metálicos de cobre II de porfirinas anfifílicas com o objectivo de serem posteriormente testadas na marcação com cobre-64 para potencial utilização em tomografia por emissão de positrões.

**Palavras-chave:** Macrociclos Tetrapirrólicos, Terapia Fotodinâmica, Lipofilia, Tomografia por Emissão de Positrões, Flúor-18.

## Abstract

The work presented in this thesis describes the studies of synthesis, structural optimization and molecular design of tetrapyrrolic macrocycles with fluorine atoms in its structure, which have been developed in order to obtain new potential photosensitizers and/or markers for positron emission tomography.

Since various studies have recently revealed that tetrapyrrolic macrocycles, including porphyrins and hydroporphyrins, have a high affinity for tumour cells, several have been labelled with radionuclides, as the radiolabelling of such molecules can provide useful probes for the localization of small tumours and also information about biodistribution of new photosensitizers.

From a structural point of view, the studies were initiated by selecting a series of compounds whose molecular template were *meso-tetrakis*arylporphyrins containing fluorine atoms in their structure. Among the various available synthetic methods of the literature, the nitrobenzene method was selected, by starting with pyrrole and the desired fluorinated aldehydes, allowing the obtention of *meso-tetrakis*(2-fluoro-5-chlorosulfonyl)phenylporphyrin, a *meso-tetrakis*(2,6-difluoro-3-chlorosulfonyl)phenylporphyrin e a *meso-tetrakis*(2-trifluoromethyl)phenylporphyrin, directly pure from the reaction medium. Considering the high importance of increasing the specificity and selectivity of porphyrins for the target organs, their amphiphilic properties were modelled by chlorosulfonation reaction and subsequent derivatization with alcohols and amines to obtain ten new compounds with sulfonic ester and sulphonamide groups, with yields above 70%. The lipophilic nature of these compounds was studied by measuring the respective octanol/water partition coefficients using fluorescence emission spectroscopy, obtaining logP values between 0.5 and 2.33. In order to develop a family of compounds as new photosensitizers, it has been necessary to supply them structural characteristics that could promote an optimal absorption in the red region of the electromagnetic spectrum. Thus, new amphiphilic fluorinated *meso-tetrakis*aryl bacteriochlorins and *meso-tetrakis*aryl chlorins were synthesized using a novel method of synthesis, by reduction of the previously synthesized porphyrin precursors with diimide, without requiring the use of additional solvents or bases. In the synthesis of the *meso-tetrakis* aryl chlorins, a new synthetic approach was also developed, which after the porphyrins reduction with diimide, involved the selective oxidation of bacteriochlorin, formed as a by-product to the corresponding chlorin, using Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. With the aim of improving the specificity of the developed potential photosensitizers for the desired tumour cell/organ, the conjugate derivatives of porphyrins and hydroporphyrins were prepared,

starting from the previously chlorosulfonated porphyrin precursor, functionalized with paracetamol and amino acid groups. All new compounds were fully characterized by UV-visible spectroscopy, nuclear magnetic resonance and mass spectrometry.

In order to prepare potential markers with fluorine-18 for diagnosis using Positron Emission Tomography, optimization studies were first carried out on laboratory "*in cold*" synthesis of non-symmetric porphyrins containing a good leaving group (tosylate), the precursors for the fluorination reaction with a non-radioactive fluorinating agent. Therefore a non-symmetric *meso*-arylporphyrin was then synthesized containing a hydroxyl group in its structure, by the nitrobenzene method. This porphyrin was derivatized with a tosyl group and used as model precursor for the fluorination reaction, acting later as reference for the studies of radiolabeling porphyrins with fluorine-18. The purification/separation conditions of the tosylated and the corresponding fluorinated porphyrins have been optimized by analytical and semi-preparative HPLC. After optimization of all synthetic and purification conditions, this methodology was implemented for labelling processes with radioactive fluorine (fluorine-18), developed at the Institute of Nuclear Sciences Applied to Health (ICNAS), obtaining porphyrins labelled with fluorine-18 with acceptable yields and high degree of chemical purity.

Finally, preliminary laboratory studies were performed on the synthesis of copper II complexes with amphiphilic porphyrins containing sulfonamide and sulfonic ester groups in its structure, in order to be subsequently labelled with copper-64, as potential markers for positron emission tomography.

**Keywords:** Tetrapyrrolic Macrocycles, Photodynamic Therapy, Lipophilicity, Positron Emission Tomography, Fluorine-18.

## Abreviaturas e Simbologias

|            |   |
|------------|---|
| $\alpha$   | Partícula $\alpha$  |
| $\beta^+$  | Partícula $\beta$ com carga positiva  |
| $\beta^-$  | Partícula $\beta$ com carga negativa  |
| $\epsilon$ | Coefficiente de absorção molar  |
| $\delta$   | Desvio químico  |
| $\nu$      | Frequência  |
| A          | Massa atômica   |
| BSA        | Albumina de soro bovino (do inglês, “ <i>bovine serum albumine</i> ”)   |
| CNC        | Centro de neurociências e biologia celular  |
| d          | Dupleto   |
| DDQ        | 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona   |
| DMSO       | Dimetilsulfóxido  |
| DMF        | Dimetilformamida  |
| E. Massa   | Espectrometria de massa   |
| ESI        | Ionização por electrospray (do inglês, <i>electrospray ionization</i> )   |
| FDA        | do inglês “ <i>food and drug administration</i> ”   |
| HPLC       | Cromatografia líquida de alta pressão (do inglês, “ <i>high-performance liquid chromatography</i> ”)                                      |
| <i>J</i>   | Constante de acoplamento  |
| logP       | Logaritmo do coeficiente de partição  |
| m          | Multiplete  |
| MALDI-TOF  | Ionização de matriz assistida por laser – tempo de vôo, do inglês “ <i>matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight</i> ” |
| MN         | Medicina nuclear  |
| MRI        | Imagiologia de ressonância magnética (do inglês, “ <i>magnetic resonance imaging</i> ”)   |
| n          | Neutrão   |
| OAc        | Grupo acetato   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| OMS                            | Organização mundial de saúde  |
| OTf                            | Grupo triflato  |
| OTHP                           | Éter tetrahidropiranyl  |
| OTs                            | Grupo tosilo  |
| p                              | Protão  |
| <i>p</i> -OTs.OCH <sub>3</sub> | <i>para</i> -toluenossulfonato de metilo  |
| P                              | Coeficiente de partição   |
| PDT                            | Terapia fotodinâmica (do inglês, “ <i>photodynamic therapy</i> ”)   |
| PET                            | Tomografia por emissão de positrões (do inglês, “ <i>positron emission tomography</i> ”)                                    |
| PMDA                           | Agência de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos,( do inglês “ <i>pharmaceuticals and medical devices agency</i> ”) |
| ppm                            | Partes por milhão   |
| RMN <sup>1</sup> H             | Ressonância magnética nuclear de protão   |
| RMN <sup>19</sup> F            | Ressonância magnética nuclear de flúor  |
| SPECT                          | Tomografia por emissão de fotão único (do inglês, “ <i>single photon emission computed tomography</i> ”)                    |
| s                              | Singuleto   |
| s l                            | Singuleto largo   |
| TBAF                           | Fluoreto de <i>tetra</i> -butilamônio   |
| TFA                            | Ácido trifluoracético   |
| THF                            | Tetrahidrofurano  |
| t                              | triplete  |
| tlc                            | Cromatografia de camada fina (do inglês, “ <i>thin layer chromatography</i> ”)  |
| TMS                            | Tetrametilsilano  |
| TOF                            | Tempo de vôo (do inglês, <i>time of flight</i> )  |
| uv-visível                     | Ultravioleta-visível  |
| z                              | Número atômico  |

# Nomenclatura

O primeiro sistema de nomenclatura desenvolvido para macrociclos tetrapirrólicos, designa-se por nomenclatura de Fisher<sup>1</sup> e baseia-se principalmente na utilização de nomes triviais combinado com um sistema de numeração. A figura 1 (a), representa a numeração de Fisher para porfirinas. Segundo este autor, o macrociclo tetrapirrólico conjugado toma o nome de porfirina, designando os anéis pirrólicos por A, B, C e D, e os carbonos periféricos dos anéis pirrólicos por posições  $\beta$  e as pontes metínicas interpirrólicas por posições *meso*. As posições  $\beta$  pirrólicas são numeradas de 1 a 8 e as posições *meso* são designadas pelas letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . Os carbonos pirrólicos adjacentes aos azotos são designados por posições  $\alpha$ -pirrólicas. Este sistema rapidamente se tornou insuficiente devido ao grande crescimento da química de porfirinas levando ao aparecimento de um novo sistema de nomenclatura sistemática. As recomendações IUPAC<sup>2,3</sup> propuseram um sistema de numeração, para macrociclos tetrapirrólicos, onde os carbonos são numerados de 1 a 20, os azotos pirrólicos de 21 a 24, Figura 1 (b).

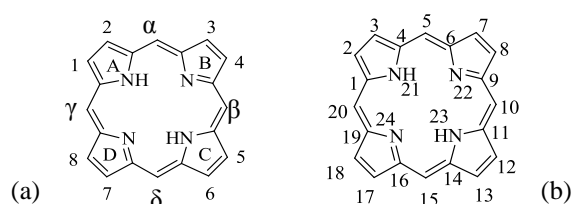


Figura 1. Numeração de macrociclos tetrapirrólicos segundo Fisher (a) e a IUPAC (b).

As porfirinas substituídas serão numeradas segundo as recomendações da IUPAC, apresentando-se um exemplo ilustrativo na Figura 2.

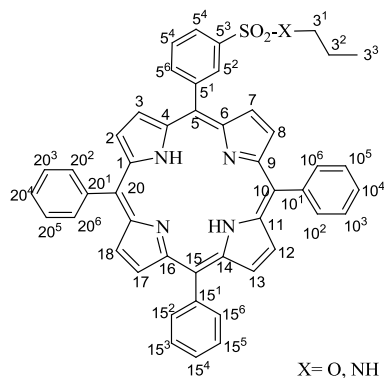


Figura 2. Recomendações da IUPAC para a numeração de porfirinas substituídas.

As porfirinas reduzidas mais comuns são designadas por 2,3-di-hidroporfirinas e 7,8,17,18-tetra-hidroporfirinas. As 2,3-di-hidroporfirinas apresentam os carbonos saturados num dos anéis pirrólicos, sendo muitas vezes utilizado o nome trivial de clorina (Figura 3a). As 7,8,17,18-tetra-hidroporfirinas possuem mais uma saturação, em que os carbonos saturados se encontram em duas unidades pirrólicas diametralmente opostas, sendo normalmente designadas pelo nome trivial de bacterioclorinas (Figura 3b).

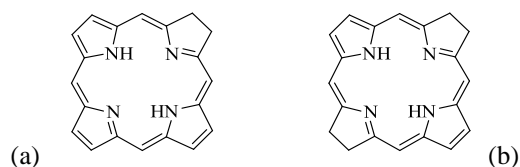


Figura 3. Estruturas de macrociclos tetrapirrólicos reduzidos: a) clorina e b) bacterioclorina.

Nesta Tese, foi também utilizada a nomenclatura de Fisher, onde, os átomos do macrociclo tetrapirrólico podem ser referenciados segundo a posição onde se encontram, nomeadamente  $\beta$ -pirrólica ou posição *meso*.

1. Fischer H, Orth H, *Die Chemie des Pyrrols*, Vol. 1, Akad. Verlags, Leipzig, **1934**.
2. IUPAC, *Pure & Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779.
3. Tomé A., *Introdução à nomenclatura dos compostos orgânicos*, Escolar Editora, **2010**.



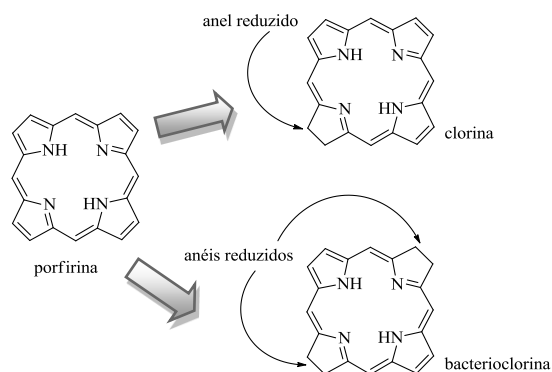
# **Capítulo 1**

## **Introdução**



## 1.1. Macrociclos tetrapirrólicos

Os macrociclos tetrapirrólicos são uma classe de compostos aromáticos cuja estrutura pode ser facilmente modelada através de introdução de grupos funcionais tanto nas posições  $\beta$ -pirrólicas como nas posições *meso* do macrociclo. Para além destas transformações é também possível reduzir uma ou duas ligações duplas dos anéis pirrólicos das porfirinas obtendo duas novas famílias de compostos designados por clorinas e bacterioclorinas, respectivamente (Esquema 1.1). O desenvolvimento de métodos de síntese de macrociclos tetrapirrólicos tem aumentado significativamente nas últimas décadas devido à procura crescente destes compostos para múltiplas aplicações,<sup>1-8</sup> nomeadamente no domínio da medicina, para desenvolvimento de fotossensibilizadores para problemas do foro da oftalmologia,<sup>9,10</sup> na foto-inativação de vírus e bactérias<sup>11, 12,13</sup> e, sobretudo, em oncologia tanto ao nível da terapêutica, utilizando técnicas como a terapia fotodinâmica (PDT),<sup>14-24</sup> como também no diagnóstico através da preparação de biomarcadores para imagiologia médica.<sup>25-29</sup>



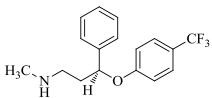
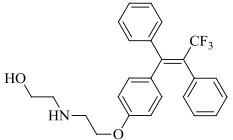
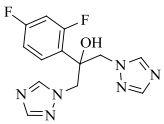
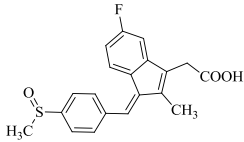
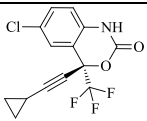
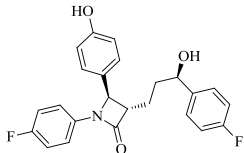
Esquema 1.1. Núcleo central de uma porfirina e dos seus derivados reduzidos: clorina e bacterioclorina.

O flagelo do cancro a nível mundial tem contribuído para que, nas últimas décadas, a investigação científica centrada na procura de agentes anti-tumorais se tenha tornado um dos principais temas de interesse nos domínios da medicina, da química medicinal e farmacêutica. Desta forma, têm sido realizados muitos esforços no sentido de desenvolver novas terapias mais eficientes e específicas para a destruição de células

tumorais e com menos efeitos secundários para os pacientes.<sup>30-32</sup>

A presença de átomos de flúor em compostos orgânicos com potencial aplicação em farmacologia tem sido progressivamente explorada nos últimos anos.<sup>33,34</sup> As alterações estereoquímicas de uma molécula associadas à substituição de um átomo de hidrogénio por um átomo de flúor são pequenas devido aos seus raios atômicos serem semelhantes, no entanto a diferença de electronegatividade pode afectar significativamente os efeitos farmacológicos de um potencial fármaco, assim como o local e a extensão da substituição podem afectar a sua estabilidade, selectividade e propriedades físicas, como o pKa e o coeficiente de partição (logP).<sup>33-39</sup> Deste modo, o desenvolvimento e optimização de novas moléculas orgânicas com átomos de flúor na sua constituição é uma área com crescente interesse no foro da química medicinal. Apresentam-se na Tabela 1.1. alguns exemplos de estruturas de APIs (Princípios activos farmacêuticos, do inglês, “*Active Pharmaceutical Ingredient*”) com átomos de flúor na sua constituição.

Tabela 1.1. Estruturas de alguns APIs fluorados e sua aplicação.<sup>40-44</sup>

|   | APIs fluorados  | Aplicação   |
|---|---|---|
| 1 | Fluoxetina<br> | Antidepressivo  |
| 2 | Tamoxifeno<br> | Tratamento do cancro de mama                                  |
| 3 | Fluconazol<br> | Tratamento de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos |
| 4 | Sulindaco<br>  | Anti-inflamatório   |
| 5 | Efavirenz<br>  | Combate ao VIH  |
| 6 | Ezetimibe<br>  | Redutor de colesterol   |

Aliando as vantagens da presença de átomos de flúor em moléculas orgânicas às potencialidades dos macrociclos tetrapirrólicos em medicina,<sup>14-29</sup> o objectivo fulcral deste trabalho centra-se na síntese de derivados porfirínicos fluorados como possíveis candidatos à utilização destes como fotossensibilizadores, nomeadamente em PDT e/ou a sua marcação com flúor-18 para utilização como potenciais agentes de diagnóstico em tomografia de emissão de positrões (PET).

### 1.1.1. Métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas fluoradas

Podemos considerar que existem essencialmente duas estratégias para promover a síntese de *meso*-arilporfirinas. A primeira envolve a reacção de condensação de pirrol com aldeídos, seguida de ciclização e oxidação *in situ* do porfirinogénio para a correspondente porfirina (método designado por um só passo). Utilizando esta estratégia evidencia-se o trabalho pioneiro de Rothmund<sup>45</sup> que descreveu a síntese de porfirinas simétricas baseada na reacção de condensação de pirrol com aldeído, usando piridina como solvente. Várias modificações a este método foram descritas, salientando-se o trabalho de Adler,<sup>46,47</sup> que substituiu a piridina por ácido acético ou propanóico; e ainda o método do nitrobenzeno, desenvolvido mais tarde por Gonsalves e Pereira,<sup>48</sup> que utiliza como solvente uma mistura de ácido acético com nitrobenzeno, permitindo não só efectuar oxidação do porfirinogénio à respectiva porfirina, *in situ*, de forma eficiente e sem contaminação com clorina, mas também obter *meso*-arilporfirinas *orto*-halogenadas por cristalização directa no meio reaccional. Na tabela 1.2 e 1.3 encontram-se descritos os métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas fluoradas usando estas estratégias de síntese num só passo.

Tabela 1.2. Síntese de *meso*-arilporfirinas fluoradas pelo método de Adler-Longo.

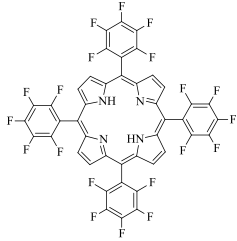
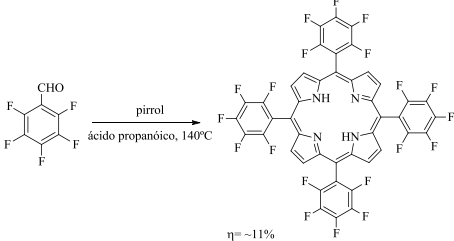
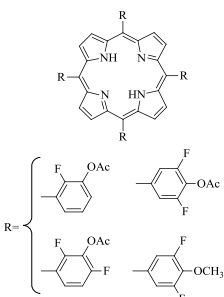
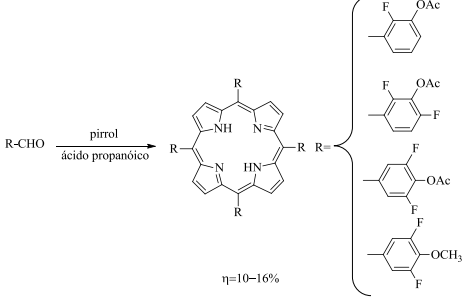
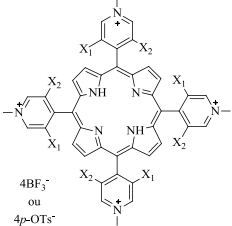
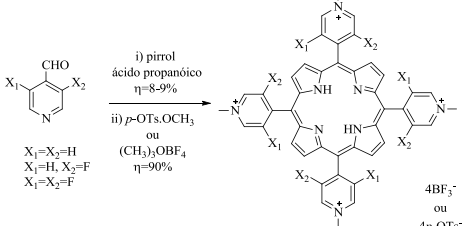
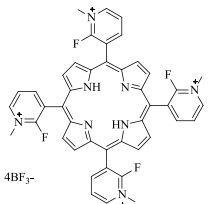
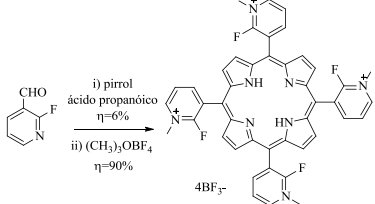
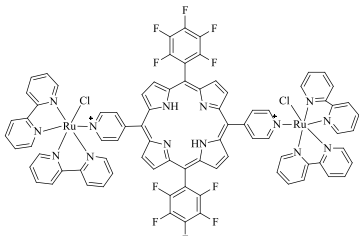
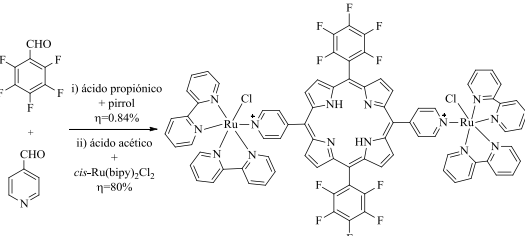
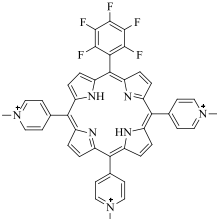
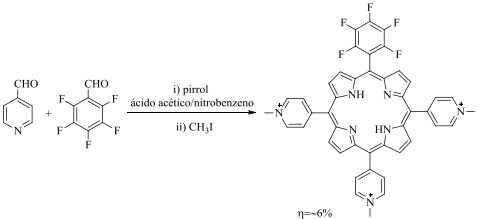
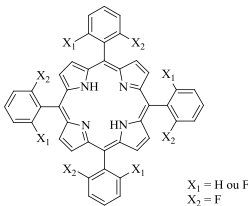
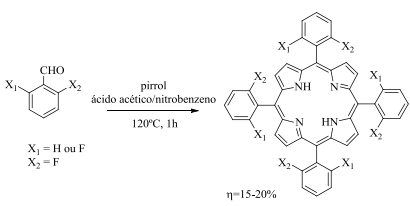
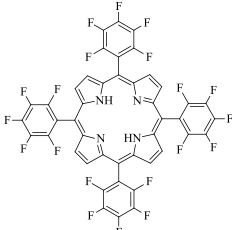
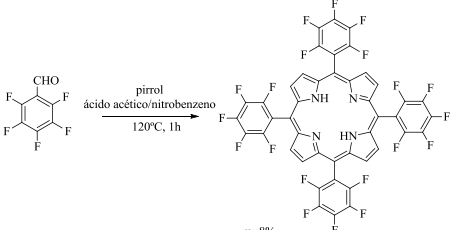
| <b>Meso-arilporfirinas fluoradas</b>  | <b>Método de Adler-Longo</b>   | <b>Bibliografia</b> |
|---|--|---------------------|
| <p><b>1</b></p>    |  <p><math>\eta \approx 11\%</math></p>                             | <p>49,50,51</p>     |
| <p><b>2</b></p>    |  <p><math>\eta = 10-16\%</math></p>                                | <p>49,52,53</p>     |
| <p><b>3</b></p>   |  <p><math>\eta = 8-9\%</math><br/> <math>\eta = 90\%</math></p>   | <p>49,54,55</p>     |
| <p><b>4</b></p>  |  <p><math>\eta = 6\%</math><br/> <math>\eta = 90\%</math></p>    | <p>49,55</p>        |
| <p><b>5</b></p>  |  <p><math>\eta = 0.84\%</math><br/> <math>\eta = 80\%</math></p> | <p>49,56</p>        |

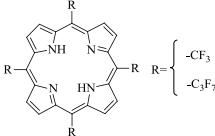
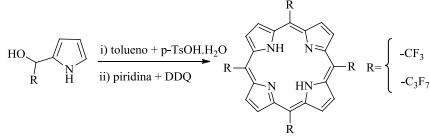
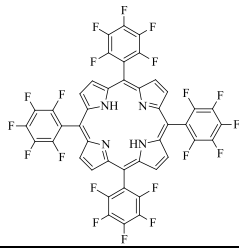
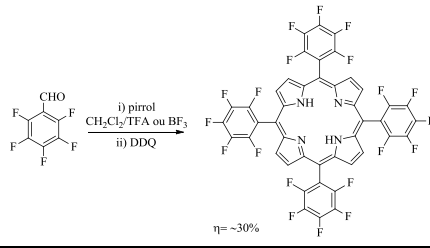
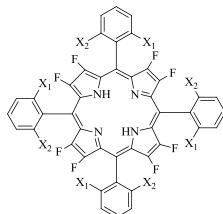
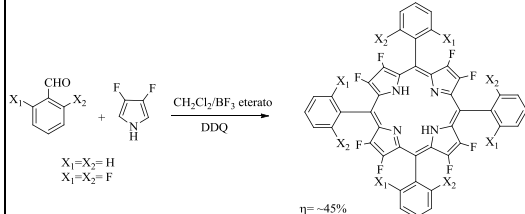
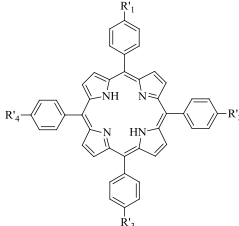
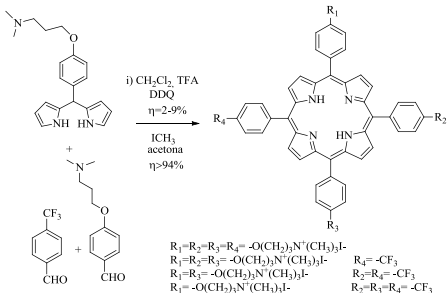
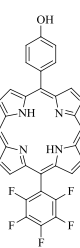
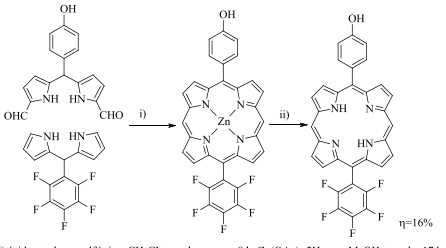
Tabela 1.3. Síntese de *meso*-arilporfirinas fluoradas pelo método do nitrobenzeno

|   | <i>Meso</i> -arilporfirinas fluoradas  | Método do nitrobenzeno  | Bibliografia |
|---|--|---|--------------|
| 1 |   |   | 57,58        |
| 2 |   |   | 25,59,60     |
| 3 |  |  | 25,59        |

A segunda estratégia consiste num método sintético que envolve dois passos: num primeiro passo ocorre condensação/ciclização de pirrol e aldeído, em atmosfera inerte, e no segundo passo, promove-se a oxidação subsequente do porfirinogénio para a correspondente porfirina. Seguindo esta estratégia salienta-se o trabalho pioneiro de Gonsalves e Pereira<sup>61</sup>, onde se descreveu a síntese de *meso*-tetraalquilporfirinas resultantes da condensação de pirrol com acetais alquílicos, catalisada por ácido trifluoroacético, em solvente clorado e atmosfera inerte, seguidos da reacção de oxidação do porfirinogénio com quinonas de alto potencial (como a *tetracloro-p*-benzoquinona (cloranil) e a dicloro-diciano-benzoquinona (DDQ)), ou fotoquimicamente. Posteriormente destaca-se também o importante trabalho de Lindsey,<sup>62,63</sup> que estendeu a metodologia em dois passos à síntese de *meso*-tetraarilporfirinas. É de realçar que este método permite obter *meso*-arilporfirinas de estruturas variadas, mesmo contendo grupos volumosos nas posições *orto* dos grupos fenilo, no entanto, como usa quinonas de elevado custo, torna o método pouco viável do ponto de vista ambiental e da transposição da síntese para larga escala. Uma outra estratégia para a síntese de *meso*-arilporfirinas é a estratégia 2+2 inicialmente descrita

por MacDonald,<sup>64</sup> que consiste na síntese de dipirrometanos com posterior condensação/ciclização, em meio ácido, com arilaldeídos, seguida de oxidação com oxigénio e/ou quinonas. Na Tabela 1.4 encontram-se descritos métodos de síntese de porfirinas fluoradas *meso*-substituídas, usando a estratégia em dois passos.

Tabela 1.4. Síntese de porfirinas fluoradas *meso*-substituídas usando métodos de dois passos.

| <i>meso</i> -arilporfirinas fluoradas   | Pereira <i>et al.</i>  | Bibliografia        |
|---|--|---------------------|
| <p><b>1</b></p>    |    | 25,49               |
|   | <b>Método de Lindsey</b>   | <b>Bibliografia</b> |
| <p><b>2</b></p>   |   | 62,65               |
| <p><b>3</b></p>    |    | 49,66               |
|   | <b>Método de MacDonald 2+2</b>   | <b>Bibliografia</b> |
| <p><b>4</b></p>  <p> <math>R_1=R_2=R_3=R_4=-O(CH_2)_3N^+(CH_3)_3I^-</math><br/> <math>R_1=R_2=R_3=-O(CH_2)_3N^+(CH_3)_3I^-</math><br/> <math>R_1=R_3=-O(CH_2)_3N^+(CH_3)_3I^-</math><br/> <math>R_1=-O(CH_2)_3N^+(CH_3)_3I^-</math><br/> <math>R_4=-CF_3</math><br/> <math>R_2=R_4=-CF_3</math><br/> <math>R_2=R_3=R_4=-CF_3</math> </p> |    | 67,68               |
| <p><b>5</b></p>    |  <p>             i) ácido p-toluenosulfônico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t. amb., escuro, 8 h; Zn(OAc)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O em MeOH, t. amb., 17 h<br/>             ii) ácido trifluoroacético, CHCl<sub>3</sub>, t. amb., 10 min         </p> | 69,70               |



Pelos motivos anteriormente referidos e porque tínhamos como objectivo preparar macrociclos tetrapirrólicos cuja síntese fosse transponível para larga escala, decidimos recorrer ao método do nitrobenzeno para sintetizar as *meso-tetraarilporfirinas* desenvolvidas neste trabalho. Com o intuito de preparar moléculas que, não só melhorassem o diagnóstico precoce do cancro, como também potencializassem a aplicação destes compostos em tratamentos terapêuticos, esta Tese foca na optimização de derivados porfirínicos fluorados e na modelação das propriedades que lhes permitam ser aplicados tanto em terapia, nomeadamente em terapia fotodinâmica do cancro, como também como agentes de diagnóstico para imagiologia molecular de tumores, utilizando técnicas de imagiologia médica, nomeadamente a PET (tomografia por emissão de positrões). Nas próximas secções deste capítulo apresenta-se uma revisão da literatura que descreve tanto os fundamentos destas duas técnicas, como a aplicabilidade dos macrociclos tetrapirrólico nas mesmas.

## 1.2. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica do cancro é um tipo de terapia que requer a presença de luz, um sensibilizador e oxigénio molecular. O princípio de funcionamento da PDT baseia-se na administração intravenosa ou oral de um sensibilizador, que após um determinado tempo de espera, se acumula nos tecidos-alvo (preferencialmente células tumorais), sendo posteriormente irradiado com luz de comprimento de onda apropriado, levando à formação de espécies reactivas de oxigénio, tóxicas para as células cancerígenas, que levam à consequente destruição do tumor.<sup>71,72</sup> Na Figura 1.1 está representado o perfil de tratamento da PDT.

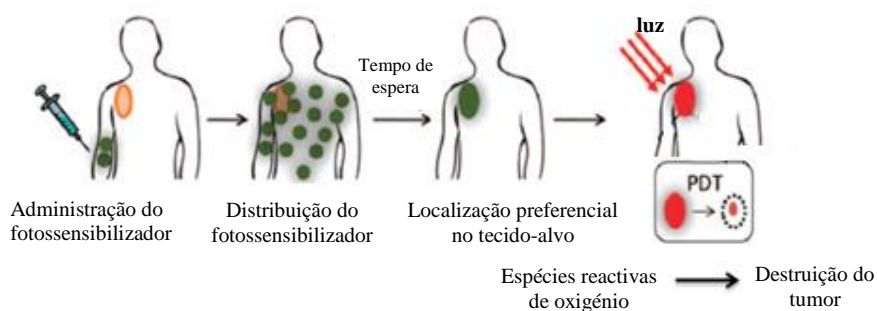


Figura 1.1. Esquema ilustrativo da terapia fotodinâmica.<sup>71</sup>

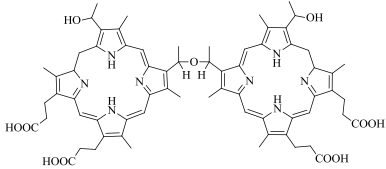
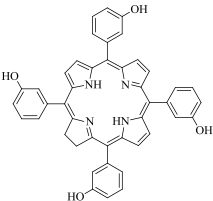
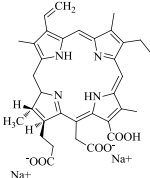
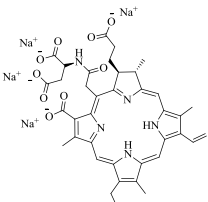
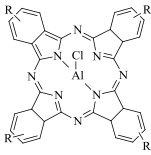
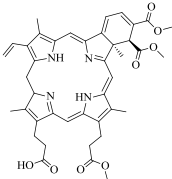
A solubilidade do fotossensibilizador é também um factor de relevante importância na distribuição e localização do mesmo no interior das células tumorais. Enquanto a solubilidade em meio aquoso é fundamental para a biodisponibilidade do sensibilizador, a lipofilicidade é importante para a difusão através da barreira lipídica e localização endocelular.<sup>71,72</sup> Assim, um fotossensibilizador ideal para PDT deve possuir as seguintes características:<sup>18,71,72</sup> a) elevada pureza e estabilidade química; b) síntese fácil e de elevado rendimento; c) acumulação preferencial no tecido tumoral; d) baixa toxicidade no escuro, tanto do fotossensibilizador, como dos metabolitos; e) forte absorção na região do infra-vermelho, no espectro electromagnético de uv-visível (680-800 nm, a designada “janela terapêutica”); f) possuir características fotofísicas apropriadas, como elevado rendimento quântico de oxigénio singleto e um estado tripleto com um tempo de semi-vida elevado; g) solúvel nos fluidos dos tecidos e fácil distribuição *via* injeção, ou outros métodos; h) facilmente excretado do organismo após conclusão do tratamento.

Esta técnica é menos invasiva e apresenta menos efeitos secundários do que outros tratamentos tais como quimioterapia e radioterapia que podem causar graves danos físicos e emocionais aos pacientes, e não são frequentemente eficazes no tratamento do cancro, remetendo-o apenas para um estado de latência que vem a originar, mais tarde a recorrência do tumor.

A aplicação das porfirinas como agentes terapêuticos baseia-se, sobretudo, na capacidade que estes compostos possuem de gerar espécies citotóxicas de oxigénio, quando excitadas por radiação de comprimento de onda adequado.<sup>73</sup> Os fotossensibilizadores do tipo macrociclos tetrapirrólicos são, segundo a literatura, divididos em três gerações. Os de primeira geração, do tipo porfirínico, incluindo a hematoporfirina e seus derivados, foram já intensamente estudados e aprovados para comercialização. No entanto, apesar do seu sucesso, nomeadamente, a Photofrin® apresenta muitos inconvenientes, particularmente, baixo coeficiente de extinção molar, o que implica a administração de grandes quantidades de composto para obter uma resposta fototerapêutica eficiente; baixa penetração nos tecidos pela luz devido ao seu máximo de absorção não ir além dos 630 nm e baixa velocidade de eliminação, o que causa fotossensibilidade prolongada da pele, após tratamento.<sup>72,73</sup> Estes inconvenientes

levaram ao desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, designados por segunda geração de fotossensibilizadores, que inclui vários derivados de porfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas (Tabela 1.4).<sup>74-77</sup>

Tabela 1.4. Macrociclos tetrapirrólicos como fotossensibilizadores para PDT.

| Fotossensibilizador  |  | Aplicação  |
|--|--|--|
| <p>Photofrin®</p>                                   | <p>Fotossensibilizador de 1ª geração</p> | <p>Aprovado pela FDA, em 1993, para o tratamento do cancro da bexiga e posteriormente, em 1994, tratamento do pulmão e, em 1995, do esófago.</p> |
| <p>Foscan®</p>                                     | <p>Fotossensibilizador de 2ª geração</p> | <p>Aprovado pela agência europeia de medicina (EMA), em 2001, para tratamento de cancro do pescoço e cabeça.</p>                                 |
| <p>Visudyne®</p>                                  |  | <p>Aprovado pela FDA, em 2000, para tratamento de doença degenerativa macular relacionada com a idade.</p>                                       |
| <p>Laserphyrin®</p>                               | <p>Fotossensibilizador de 2ª geração</p> | <p>Aprovado pela PMDA, em 2004, para tratamento cancro do pulmão.</p>  |
| <p>Photosens®</p>  <p>R=H ou -SO<sub>3</sub>H</p> |  | <p>Aprovado pelo Ministério da Saúde, na Rússia, em 2001, para tratamento de cancro de pescoço e cabeça.</p>                                     |
| <p>Radachlorin®</p>                               |  | <p>Aprovado pelo Ministério da Saúde, na Rússia, em 2009, para tratamento de cancro de pele.</p>   |

Segundo a literatura, estes fotossensibilizadores de segunda geração diferem, em geral, dos da primeira geração por absorverem luz para valores de comprimento de onda mais elevados, entre 650-800 nm (“janela terapêutica”).<sup>74-77</sup> Contudo ainda existem algumas limitações relativamente à lipofilicidade destes compostos, surgindo desta forma a necessidade de desenvolver uma terceira geração de fotossensibilizadores que possuam propriedades anfífilas adequadas para a difusão através da barreira lipídica e localização endocelular. Assim, pretende-se, neste trabalho, modelar *meso-tetraarilporfirinas* com grupos éster sulfónico e sulfonamida, já referenciados como muito promissores para aplicação como fotossensibilizadores para PDT.<sup>60,78-80</sup>

Uma outra forma de aumentar a selectividade e especificidade dos fotossensibilizadores, para melhorar a sua captação tumoral, baseia-se no desenvolvimento de sistemas de entrega selectiva de fármacos, isto é, sistemas de transporte até ao tecido-alvo. Para isso têm sido estudadas muitas estratégias de entrega de fotossensibilizadores e alguns veículos transportadores apresentam grande potencial, tais como emulsões de lipossomas e nanopartículas.<sup>75,81</sup> Uma outra alternativa possível é ligar covalentemente os fotossensibilizadores a moléculas de interesse biológico,<sup>82</sup> existindo já na literatura exemplos de macrociclos tetrapirrólicos, como clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas, conjugados com várias proteínas de importância biológica como por exemplo, a BSA,<sup>28,83-86</sup> conjugados de lipoproteínas,<sup>28,87</sup> anticorpos,<sup>88</sup> peptídeos,<sup>89-94</sup> ácido fólico,<sup>95</sup> sacarídeos<sup>96-99</sup> e polissacarídeos<sup>100-104</sup> ou polímeros sintéticos biocompatíveis, como o polietilenoglicol,<sup>105</sup> com resultados bastante promissores. O crescente interesse pela preparação destes conjugados deve-se às vantagens associadas à entrega específica do sensibilizador na célula tumoral/órgão desejado, também à procura de marcadores fluorescentes para obter informações *in vivo* da sua farmacocinética e/ou função, e ainda à preparação de potenciais pró-drogas onde poderemos associar a função de fotossensibilizador, com, por exemplo, a actividade anti-inflamatória ou analgésica de um outro componente libertado no local, por exemplo, o paracetamol.

Assim, como era importante otimizar a estrutura dos potenciais fotossensibilizadores para PDT, foram sintetizados macrociclos tetrapirrólicos do tipo porfirina, clorina e bacterioclorina e derivatizados para lhes incutir características

anfifílicas, introduzindo grupos sulfonamida e grupos éster sulfónico. Foram também sintetizados conjugados de porfirinas com diferentes resíduos com actividade biológica comprovada, como por exemplo grupos acetamidofenol (paracetamol) e aminoácido, estando os resultados descritos no Capítulo 2 desta Tese.

### 1.3. Imagiologia molecular

A imagiologia molecular emergiu no final do século XX como uma resultante da intersecção da biologia molecular com a imagem *in vivo*. As técnicas de imagiologia molecular permitem a visualização de funções celulares e o seguimento de processos moleculares em organismos vivos, de forma não invasiva. As principais potencialidades neste domínio centram-se no diagnóstico de doenças degenerativas como o cancro, doenças neurodegenerativas e ainda patologias cardiovasculares, contribuindo para melhorar o diagnóstico precoce e tratamento destas doenças.<sup>106</sup> Na última década têm ocorrido avanços tecnológicos significativos em imagiologia médica, estando os principais métodos de imagem representados na Figura 1.2. Das técnicas de imagiologia nuclear é dado especial destaque às que utilizam métodos de imagem *in vivo* (cintigrafia, tomografia por emissão de fotão único - SPECT e tomografia por emissão de positrões - PET), utilizadas como técnicas de diagnóstico. Neste trabalho iremos enfatizar sobretudo a técnica de PET no que diz respeito a técnicas de medicina nuclear, tendo em conta o facto de utilizar isótopos de elementos com maior prevalência nas moléculas orgânicas, como o carbono, o azoto, o oxigénio e o flúor, por oposição à SPECT que depende sobretudo de elementos pouco comuns como o tecnécio, o índio ou o gálio.

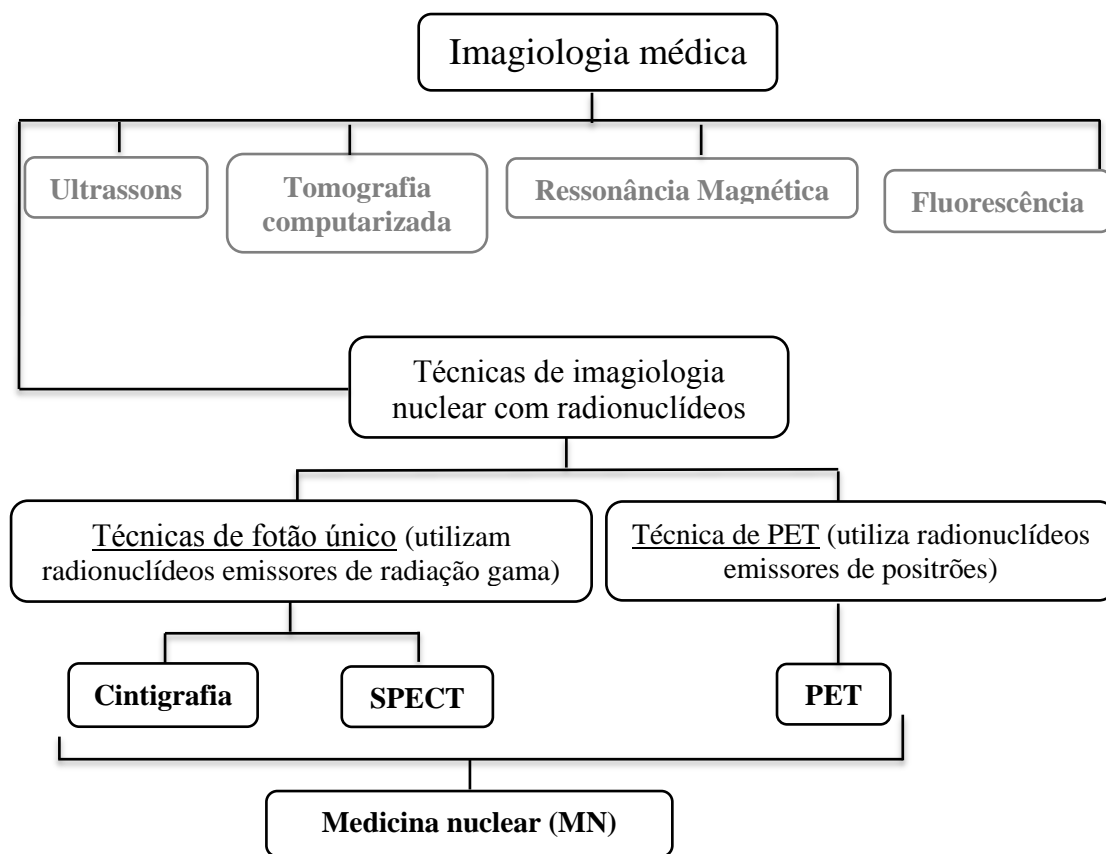


Figura 1.2. Representação esquemática das técnicas e métodos de imagem mais utilizados em imagiologia médica

Assim, a medicina nuclear é definida como sendo uma disciplina que engloba todas as aplicações médicas de materiais radioactivos no diagnóstico, terapêutica e investigação médica. Permite avaliar tecidos e funções orgânicas do corpo humano, normais e anormais, sendo um procedimento eficaz, seguro e não-invasivo, com possibilidade de utilização de núclídeos emissores de radiação (radionuclídeos), detectados em massas ínfimas (na ordem dos nano a femtomolar).<sup>107,108</sup> Esta estratégia utiliza radiofármacos, que são moléculas biológicas que incorporam um radionuclídeo, e que quando administradas a um ser vivo, apresentam o mesmo comportamento da molécula original e, simultaneamente, emitem radiação passível de ser detectada e quantificada. As características físico-químicas dos radiofármacos determinam a sua farmacocinética, isto é, a sua fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do

organismo, enquanto as características físicas do radionuclídeo indicam a aplicação do composto e o procedimento adequado.

Dado que a quantidade de radionuclídeo necessária para a avaliação dos processos bioquímicos é muito reduzida, o radiofármaco não interfere com os sistemas fisiológicos em estudo, no entanto, em contrapartida, o seu manuseamento requer cuidados especiais, não só a nível da sua síntese como também ao nível da segurança do seu manuseamento, seguindo procedimentos experimentais muito rigorosos, controlados por entidades competentes. A preparação de um radiofármaco inicia-se com síntese de um substrato, de baixo custo e fácil acesso, seguido da marcação com o radionuclídeo produzido, por exemplo por um ciclotrão, com posterior análise e caracterização do produto acabado, que depois dos devidos ensaios de controlo de qualidade poderá ser usado em diagnóstico e/ou terapia. Posteriormente, o radiofármaco é administrado por via endovenosa (embora por vezes também possa ser por via oral ou inalação), e vai acumular-se no órgão ou tecido de interesse, emitindo energia sob a forma de radiação, que será detectada por um equipamento apropriado (câmara gama no caso da SPECT ou tomógrafo no caso da PET).

Uma vez que é nosso objectivo sintetizar compostos que possam ser usados como potenciais radiofármacos, é necessário esclarecer alguns conceitos importantes, como o de radioactividade, decaimento radioactivo e tempo de semi-vida. A radioactividade é o processo de decaimento espontâneo e transformação de um núcleo atómico instável acompanhado da emissão de partículas nucleares e/ou radiação electromagnética.<sup>108-111</sup> O processo de decaimento espontâneo é designado por decaimento radioactivo e descreve uma função exponencial, ou seja, o número de átomos que decai em qualquer instante no tempo é determinado pelo número de núcleos instáveis, presentes nessa amostra, e pela constante de decaimento  $\lambda$  característica do núcleo (Equação 1 -  $A_0$  corresponde à quantidade de actividade inicial da amostra e  $A_t$  à quantidade presente ao fim de um tempo  $t$ ).<sup>109</sup>

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Equação 1}$$

O tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) ou período de semi-desintegração de um radionuclídeo designa o tempo necessário para que uma dada quantidade desse

radionuclídeo se reduza a metade (Figura 1.3), sendo independente das condições físico-químicas e característico de cada radionuclídeo.

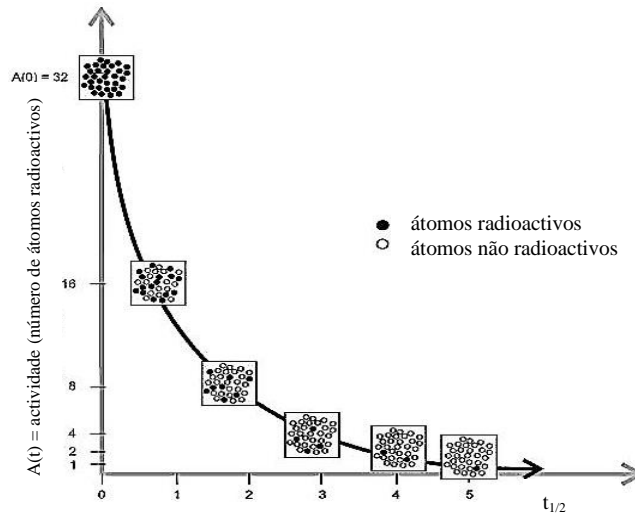


Figura 1.3. Curva de decaimento de uma população de átomos em função do tempo.<sup>109</sup>

Como já foi referido anteriormente, os radionuclídeos podem ser produzidos em reactores nucleares ou num ciclotrão, por um conjunto de reacções nucleares. Um ciclotrão é um acelerador circular de partículas com carga eléctrica. Na Figura 1.4 está representado um esquema sucinto do seu funcionamento.

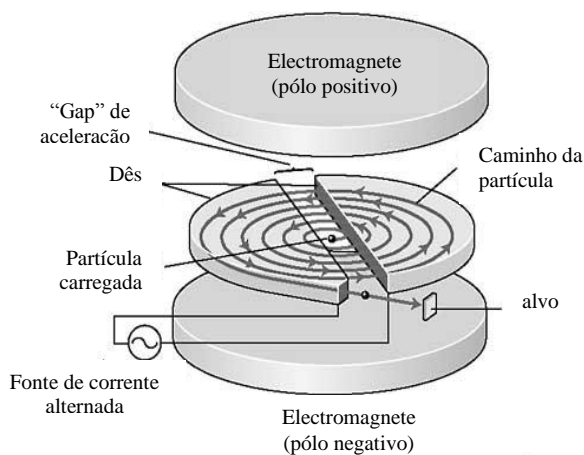


Figura 1.4. Esquema representativo do funcionamento de um ciclotrão.<sup>107</sup>



O ciclotrão é constituído por duas metades de um círculo bipolares (*Dês*), separadas por um “gap” de aceleração, nas quais se produz uma tensão alternada de frequência elevada, por acção da uma oscilação da diferença de potencial aplicada por uma fonte de alimentação. O campo eléctrico gerado pelos *Dês*, sob vácuo, leva à aceleração das partículas carregadas, que rapidamente adquirem uma elevada energia cinética. Estas partículas altamente energéticas, por acção de um campo magnético, deslocam-se em espiral até serem desviadas para a janela de saída e de imediato bombardeadas contra alvos contendo materiais estáveis (que podem variar dependendo do isótopo), originando assim o respectivo núcleo radioactivo,<sup>107,109</sup> para posterior produção do radiofármaco pretendido. Na Equação 2 está representada uma simples reacção nuclear induzido por um protão (p) num alvo  ${}^A_Z\text{X}$ , com emissão de um neutrão e a formação do radionuclídeo  ${}^A_{Z+1}\text{Y}$ . Com base nestes princípios básicos, na secção seguinte será descrito mais pormenorizadamente a técnica de PET, uma vez que se trata de um dos objectivos centrais deste trabalho.



### 1.3.1. Tomografia por Emissão de Positrões (PET)

A técnica de PET consiste na detecção directa e quantificação da distribuição de moléculas biológicas, marcadas com emissores de positrões que, quando administradas a um ser vivo, desempenham funções específicas, podendo fornecer informações sobre as funções metabólicas em que intervêm. É usada sobretudo em oncologia, tanto na identificação/localização de tumores como no acompanhamento da sua evolução mas também no diagnóstico de diversas doenças neurodegenerativas, tais como, as doenças de Alzheimer e de Parkinson. Tem também aplicação em cardiologia,<sup>112,113</sup> em exames de funcionamento de outros órgãos como tiróide, rins, fígado e pulmões.<sup>114</sup> Os estudos de PET permitem a detecção de alterações fisiológicas as quais precedem frequentemente as alterações morfológicas, numa fase inicial da doença, aumentando assim a possibilidade de sucesso do tratamento; tem igualmente uma crescente aplicação em ensaios clínicos e pré-clínicos, para análise da evolução da situação

terapêutica, permitindo a recolha de informação sobre a farmacocinética e biodistribuição da molécula em estudo.<sup>114</sup>

Como foi referido anteriormente, o núcleo instável de um radionuclídeo decai para o núcleo mais estável emitindo radiação. Os radionuclídeos usados em diagnósticos de PET são necessariamente diferentes dos usados nos restantes exames de medicina nuclear, já que este tipo de diagnóstico se baseia no decaimento de núcleos emissores de positrões (partículas  $\beta^+$  ou electrões com carga positiva). A tomografia por emissão de positrões inicia-se então com a administração de um radionuclídeo emissor de positrões, geralmente incorporado numa molécula biologicamente activa. Após a sua administração há um período de espera para que se concentre nos tecidos alvo. Aí, o radionuclídeo irá decair para a sua forma mais estável, com a emissão de um positrão. Este depois de percorrer uma pequena distância (da ordem das décimas de milímetro) aniquila-se com um electrão do meio envolvente para dar lugar à emissão de dois fotões com 511 keV de energia, emitidos em direcções opostas (Figura 1.5). Um tomógrafo constituído por anéis de detectores, colocado à volta do paciente, permite localizar a origem da aniquilação traçando um conjunto de linhas rectas, designadas por linhas de resposta (LOR, *line of response*).<sup>112,113</sup> Para que o par de fotões gama emitidos na aniquilação sejam considerados válidos na formação das imagens, os equipamentos precisam de detectar os dois fotões quase em simultâneo. Assim, com base nas LORs geradas e por meio de computação matemática, são reconstruídos os locais de emissão de positrões a partir das energias e direcções de cada par de raios gama, gerando imagens tridimensionais do paciente.

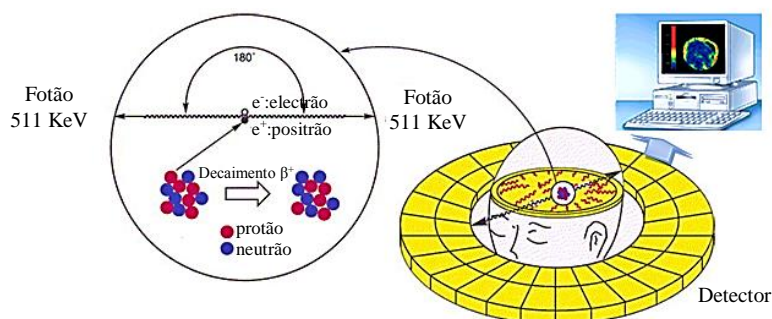


Figura 1.5. Esquema ilustrativo do processo de PET.<sup>115</sup>

Como já foi referido, apenas radionuclídeos emissores de positrões podem ser usados em PET, destes, os mais comuns são o flúor-18 ( $[^{18}\text{F}]$ ), azoto-13 ( $[^{13}\text{N}]$ ), carbono-11 ( $[^{11}\text{C}]$ ) e oxigénio-15 ( $[^{15}\text{O}]$ ) (Tabela 1.5), que apresentam elevada percentagem de decaimento por emissão de positrões mas, em contrapartida, reduzido tempo de semi-vida, o que pode ser um factor limitante no tempo de síntese, purificação, controlo de qualidade e aplicação clínica.<sup>107,108</sup> Existem outros radionuclídeos emissores de positrões, de salientar o cobre-64 ( $[^{64}\text{Cu}]$ ) e iodo-124 ( $[^{124}\text{I}]$ ), que apresentam, por um lado, períodos de semi-vida elevados, no entanto, apenas 17,9% e 25,6% de decaimento por emissão de positrões, respectivamente (Tabela 1.5)

Tabela 1.5. Nuclídeos emissores de positrões.<sup>107</sup>

| Radionuclideo    | $t_{1/2}$ (min) | Decaimento por emissão $\beta^+$ (%) | Principal reacção nuclear              | Produto de decaimento |
|------------------|-----------------|--------------------------------------|--|-----------------------|
| $^{18}\text{F}$  | 109,8           | 97                                   | $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$      | $^{18}\text{O}$       |
| $^{11}\text{C}$  | 20,4            | 99                                   | $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ | $^{11}\text{B}$       |
| $^{13}\text{N}$  | 9,98            | 100                                  | $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$ | $^{13}\text{C}$       |
| $^{15}\text{O}$  | 2,05            | 99                                   | $^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$      | $^{15}\text{N}$       |
| $^{64}\text{Cu}$ | 762             | 17.9                                 | $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$    | $^{64}\text{Ni}$      |
| $^{124}\text{I}$ | 6840            | 25.6                                 | $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$   | $^{124}\text{Te}$     |

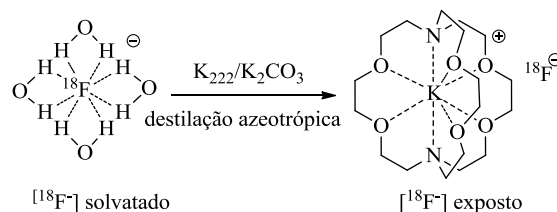
A maioria dos radiofármacos utilizados em diagnóstico por PET contém um dos quatro emissores de positrões mais conhecidos, oxigénio-15, azoto-13, carbono-11 e flúor-18.<sup>116-120</sup> No entanto o oxigénio-15, azoto-13 e o carbono-11, pelos seus tempos de semi-vida muito curtos, só podem ser usados para estudar processos que apresentem cinética rápida, e em casos onde os exames clínicos são feitos no centro de produção. Já o flúor-18, principalmente devido à sua semi-vida de 110 minutos, permite mais tempo para os processos de síntese, purificação e imagem, sendo possível ser usado fora do centro de produção.<sup>121</sup>

Uma vez que um dos objectivos do trabalho desenvolvido nesta Tese é a síntese de potenciais marcadores fluorados do tipo porfirina, demos maior ênfase à síntese de compostos marcados com flúor-18. O flúor-18 pode ser produzido através de várias reacções nucleares em que a principal diferença entre estas é o material utilizado como

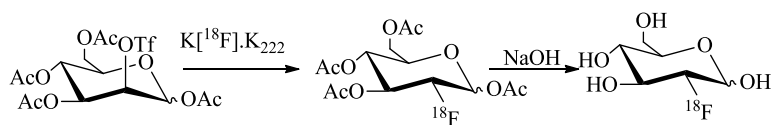
alvo (líquido ou gasoso), determinando assim a forma química em que é obtido. De alvos gasosos (como por exemplo  $[^{20}\text{Ne}]$  e  $[^{18}\text{O}]$ ), é produzido o flúor-18 gasoso, electrofílico ( $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ ), utilizando um transportador (c. a., do inglês “*carrier added*”), isto é, em função da sua alta reactividade, o flúor-18 electrofílico adere às paredes do alvo, sendo imprescindível a adição de flúor-19 ( $[^{19}\text{F}_2]$ ) não radioactivo para o remover. Por outro lado, de alvos líquidos (como por exemplo, água enriquecida –  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) obtém-se o fluoreto nucleofílico ( $[^{18}\text{F}^-]$ ) (n.c.a., do inglês “*no carrier added*”),<sup>122,123</sup> em solução aquosa, sendo este utilizado no âmbito do trabalho desenvolvido nesta Tese.

Existem duas principais formas de promover florações nucleofílicas com flúor-18 nucleofílico ( $[^{18}\text{F}^-]$ ): i) substituição directa de grupos abandonantes constituintes do precursor, que pode ou não ser seguida por hidrólise de grupos protectores que estejam presentes na molécula; ii) preparação de um agente de floração intermediário por substituição nucleofílica, seguido de segunda reacção de acoplamento à molécula com actividade biológica. É de salientar que a molécula precursora deve conter na sua estrutura um bom grupo abandonante, os quais em reacções de substituição nucleofílica são bases fracas, como por exemplo grupos éster sulfónico.

O flúor-18 aquoso obtido é um nucleófilo fraco devido ao seu elevado grau de solvatação e assim a adição de um catalisador de transferência de fase, como por exemplo o kriptofix ( $\text{K}_{222}$ ), provou ser crucial no aumento da reactividade do ião fluoreto na reacção de substituição nucleofílica (Esquema 1.2).<sup>124</sup> Um bom exemplo, e bem conhecido, de substituição nucleofílica com flúor-18 é a síntese de  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ , a 2- $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-2-desoxi-D-glicose}$ , (Esquema 1.3), um radiofármaco muito utilizado no ambiente clínico para o diagnóstico de alguns tipos de cancro.<sup>124</sup>



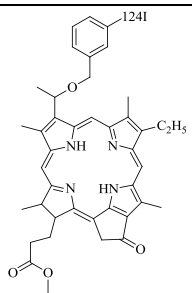
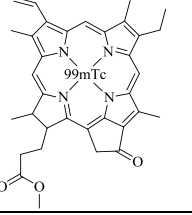
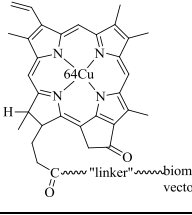
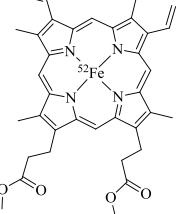
Esquema 1.2. Esquema representativo da activação do flúor-18 nucleofílico ( $[^{18}\text{F}^-]$ ), utilizando um sistema carbonato de potássio/kriptofix.

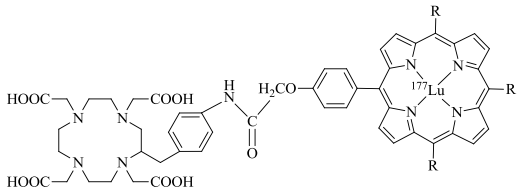
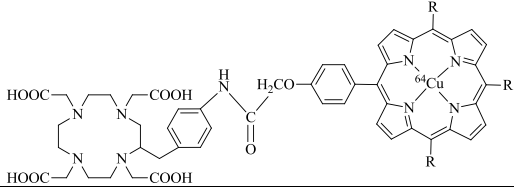
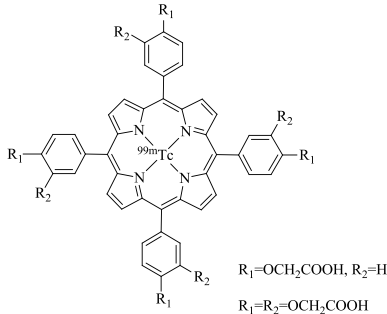
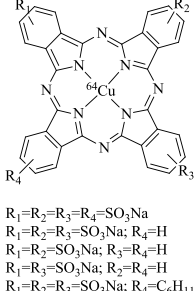
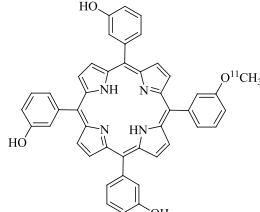
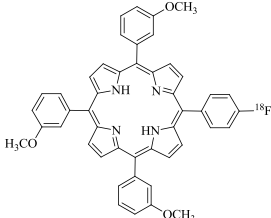
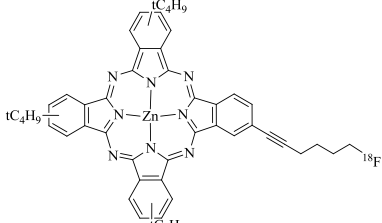


Esquema 1.3. Síntese de [<sup>18</sup>F]FDG por substituição nucleofílica alifática.

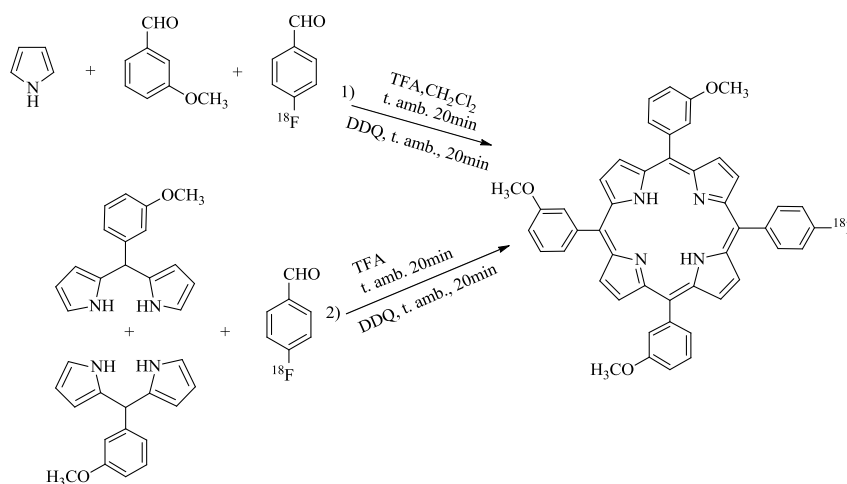
O desenvolvimento de processos de síntese e marcação de macrociclos tetrapirrólicos com radioisótopos, para potencial aplicação como marcadores em PET, tem recentemente suscitado elevado interesse. Exemplos seleccionados sobre a aplicação de macrociclos tetrapirrólicos em PET, baseados nas publicações dos últimos 10 anos, apresentam-se na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Macrociclos tetrapirrólicos em estudos de PET.

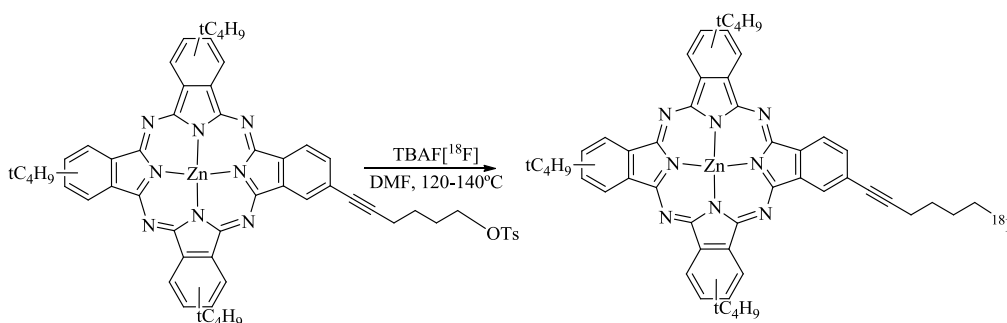
|   | Macrociclo tetrapirrólico marcado   | Aplicação/estudos efectuados   |
|---|---|--|
| 1 |  | Potencial agente de imagem (óptica ou PET) e também terapêutico <sup>125</sup> |
| 2 |  | Potencial agente de imagem para infeções <sup>126</sup>                        |
| 3 |  | Imagem de receptores de ácido fólico <sup>127</sup>                            |
| 4 |  | Elevada captação em células tumorais de ratos, <i>in vitro</i> <sup>128</sup>  |

|    |   |   |
|----|---|---|
| 5  |    | Potencial agente de contraste para terapia em oncologia <sup>129</sup>  |
| 6  |    | Potencial agente de contraste bimodal <sup>130</sup>  |
| 7  |    | Detecção e tratamento de cancro <sup>131,132</sup>  |
| 8  |   | Potencial agente de imagem para PET <sup>133,134</sup>  |
| 9  |  | Potencial agente de imagem para PET <sup>135</sup>  |
| 10 |  | Potencial agente de imagem para PET <sup>136</sup>  |
| 11 |  | Potencial aplicação em terapia de cancro (PDT) e também diagnóstico (por fluorescência e/ou PET) <sup>137</sup> |

Pela análise da Tabela 1.6, é possível verificar apenas duas publicações na literatura de macrociclos tetrapirrólicos marcados com flúor-18 (entrada **10** e **11**). Um dos estudos publicados refere a otimização da metodologia de síntese de uma [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroporfirina, usando o [ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzaldeído como precursor (Esquema 1.4);<sup>136</sup> no entanto, os autores obtiveram um baixo rendimento do produto marcado (9-20%), mesmo após otimização do método de síntese. A segunda publicação, mais recente, descreve a síntese de uma [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroftalocianina, a partir de um precursor com um bom grupo abandonante (Esquema 1.5),<sup>137</sup> com rendimento de produto marcado inferior a 10%.



Esquema 1.4. Metodologias de síntese da 5-(4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorofenil)-10,15,20-(3-metóxi)trifenilporfirina.<sup>136</sup>



Esquema 1.5. Síntese de uma ftalocianina marcada com [ $^{18}\text{F}$ ].<sup>137</sup>

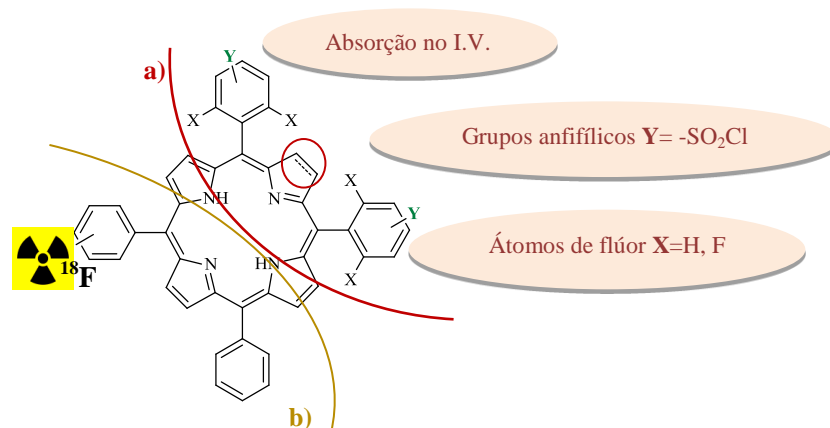
Ainda analisando a Tabela 1.6, existe uma enorme variedade de complexos metálicos de macrociclos tetrapirrólicos usados no tratamento e diagnóstico de

patologias, ao longo da última década. É bem conhecida a facilidade deste tipo de compostos complexarem com uma grande variedade de metais sendo o cobre-64 ( $[^{64}\text{Cu}]$ ) um dos metais de escolha para a sua marcação, com o seu vantajoso tempo de semi-vida de 12 horas, e o processo de síntese envolver apenas a mistura do sal de cobre radioactivo com precursor pretendido, no solvente apropriado.<sup>127,130</sup>

Desta forma e atendendo às vantagens do flúor-18 em relação a outros radioisótopos, tendo como base a Tabela 1.6, pode afirmar-se que a aplicação de porfirinas em tomografia por emissão de positrões surge com grandes potencialidades e assim nesta Tese pretendemos otimizar métodos de fluoração de porfirinas laboratorialmente, tendo em vista a sua posterior marcação com flúor-18. O estudo iniciou-se para desenvolvimento de potenciais novos compostos para diagnóstico de tumores, usando PET como técnica imagiológica. Para além disso descrevem-se métodos de optimização da síntese de complexos porfirínicos de cobre para servirem como modelos laboratoriais para posterior marcação radioactiva com cobre-64. Todos os resultados encontram-se descritos e discutidos no Capítulo 3 desta Tese.

No Esquema 1.6 apresenta-se o *design* molecular dos macrociclos tetrapirrólicos que foram objecto dos estudos desta Tese. Por forma a conferir-lhes as propriedades adequadas para potencial aplicação em PDT, nomeadamente desvio da gama de absorção espectral para o vermelho e modelação das propriedades anfifílicas, neste trabalho são apresentados métodos de síntese de *meso-tetraquisarilporfirinas*, bacterioclorinas e clorinas fluoradas incorporando grupos éster sulfónico e sulfonamida (Esquema 1.14-a). No caso da potencial aplicação dos macrociclos tetrapirrólicos como potenciais marcadores para diagnóstico em imagiologia médica, utilizando a técnica de PET, pretende-se sintetizar *meso-tetraarilporfirinas* com um bom grupo abandonante na sua estrutura (exemplo: grupo tosilo) para posterior marcação com flúor radioactivo *via* substituição nucleofílica (flúor-18) (Esquema 1.14-b).





Esquema 1.6. Design de macrociclos tetrapirrólicos para potencial aplicação em a) terapia fotodinâmica, b) imagiologia por PET.

## Bibliografia

- 
- <sup>1</sup> Silva E. M. P., Giuntini F., Fastino M. A. F., Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Silva A. M.S, Santana-Marques M. G., Ferrer-Correia A. J., Cavaleiro J. A. S, Caeiro M. F., Duarte R. R, Tavares S. A. P., Pegado I. N., Almeida B., Matos A. P. A, Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 3333.
- <sup>2</sup> Rebelo S. L. H, Pereira M. M., Simões M. M. Q, Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., *J. Catal.*, **2005**, 234, 76.
- <sup>3</sup> Campbell W. M., Burell A. K., Officer D. L., Jolley K. W., *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, 248, 1363.
- <sup>4</sup> Linke-Schaetzel M., Bhise A. D., Gliemann H., Koch T., Schimmel T., Balaban T. S., *Thin Solid films*, **2004**, 451, 16.
- <sup>5</sup> Hasselman G. M.:, Watson D. F., Stromberg J. R., Bocian D. F, Holten D., Lindsey J. S., Meyer G. J, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 25430.
- <sup>6</sup> Calvete M. , Yang G. Y., Hanack M., *Syn. Met.*, **2004**, 141, 231.
- <sup>7</sup> Murtinho D., Pineiro M., Pereira M. M., Gonsalves A. M. D. R., Arnaut L. G., Graça M. M., Burrows H. D., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 2441.
- <sup>8</sup> Amor T. B., Bortolotto L., Jori G., *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 68, 314.
- <sup>9</sup> Mittra R. A, Singerman L. J, *Optom. Vis. Sci.*, **2002**, 79, 218.
- <sup>10</sup> Kulkarni A. D, Kuppermann B. D, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 1994.
- <sup>11</sup> Pereira M. A., M. Faustino A. F., Tomé J. P. C, Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Cunha Â., Almeida A., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, 13, 680.
- <sup>12</sup> Pereira A. M. V. M., Hausmann A., Tomé J. P. C., Trukhina O., Urbani M., Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., Guldi D. M., Torres T., *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 3210.
- <sup>13</sup> Silva J. N., Haigle J., Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Mazière J. C., Santos R., Cavaleiro J. A. S., Filipe P., *Photochem. Photobiol. Sci*, **2006**, 5, 126.
- <sup>14</sup> Jonathan R. S, Marton A, Kee H. L., Kirmaier C, Diers J. R., Lindsey J. S, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 15464.
- <sup>15</sup> Nyman E. S, Hynninen P. H., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, 73, 1.

- 
- <sup>16</sup> Miguens Pereira, M.; Arnaut Moreira, L. G.; Formosinho Simões, S.; Monteiro, C. J. P. *New chlorin and/or bacteriochlorin derivatives of porphyrin, useful as anti-cancer and/or antiviral and/or antimicrobial drugs*, WO/2006/053707, **2006**
- <sup>17</sup> Detty M. R., Gibson S. L., Wagner S. J., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 3897.
- <sup>18</sup> Sternberg E. D., Dolphin D., Brückner C., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151.
- <sup>19</sup> Pandey R., James N. S., Chen Y., Missert J., Sajjad M., *Photodynamic Therapy, Methods in Molecular Biology*, ed Gomer C. J., **2010**, 223.
- <sup>20</sup> Vicente M. G. H., *Curr Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **2001**, 1, 175.
- <sup>21</sup> Lovell J. F., Liu T. W. B., Chen J., Zheng G., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2839.
- <sup>22</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simoes A. V. C., Pinto S. M. A., Arnaut L. G., Sa, G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L. B., Simoes S., Formosinho S. J., *J. Porphyrins Phtalocyanines.*, **2009**, 13,567.
- <sup>23</sup> Pereira M. M., Abreu A. R., Goncalves N. P. F., Calvete M. J. F., Simoes A. V. C., Monteiro C. J. P., Arnaut L. G., Eusebio M. E., Canotilho J., *Green Chem.*, **2012**, 14, 1666.
- <sup>24</sup> Dabrowski J. M., Arnaut L. G., Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Urbanska K., Simoes S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2010**, 5, 1770.
- <sup>25</sup> Grancho J. C. P., Pereira M. M., Miguel M. G., Gonsalves A. M. A. R., Burrows H. D., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, 249.
- <sup>26</sup> Pandey S. K., Gryshuk A. L., Graham A., Ohkubo K., Fukuzumi S., Dobhal M. P., Zheng G., Ou Z., Zhan R., Kadish K. M., Oseroff A., Ramaprasad S., Pandey R. K., *Tetrahedron*, **2003**, 59, 10059.
- <sup>27</sup> Shahbazi-Gahrouei D, Williams M, Rizvi S, Allen B. J, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2001**, 14, 169.
- <sup>28</sup> Josefsen L. B., Boyle R. W., *Theranostics*, **2012**, 2, 916.
- <sup>29</sup> Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 340.
- <sup>30</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões A. V. C., Pinto S. M. A., Abreu A. R., Sá G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L. B., Dabrowski J. M., Formosinho S. J., Simões S., Arnaut L. G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545.
- <sup>31</sup> Armstrong J. S., *British J. Pharmac.*, **2006**, 147, 239.

- 
- <sup>32</sup> Almeida R. D., Manadas B. J., Carvalho A. P., *Biochem. Biophys. Acta*, **2004**, 1704, 59.
- <sup>33</sup> Hagmann W. K., *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 4359.
- <sup>34</sup> Purser S, Moore P. R., Swallow S., Gouverneur V., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 320.
- <sup>35</sup> David O'Hagan, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 308.
- <sup>36</sup> Smart B. E., *J. Fluorine Chem.*, **2001**, 109, 3.
- <sup>37</sup> Dolbier Jr W. R., *Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, **2009**.
- <sup>38</sup> Goulin L *et al*, *J. Chem. Soc, Perkin Trans 1*, **1999**, 1785.
- <sup>39</sup> Ando A, Kumadaki I, *J. Fluorine Chem.*, **1999**, 100, 135.
- <sup>40</sup> Shimizu M., Hiyama T., *Angew. Chim.*, **2005**, 44, 214.
- <sup>41</sup> Steven D. Y. *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, 39, 2602.
- <sup>42</sup> Rosenblum S. B., Huynh T., Afonso A., Davis H. R., Yumibe N., Clader J. W., Burnett D. A., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 973.
- <sup>43</sup> Wong D. T., Bymaster F. P., Engleman E. A., *Life Sciences*, **1995**, 57, 411.
- <sup>44</sup> Kirk K. L., *J. Fluorine Chem.*, **2006**, 127, 1013.
- <sup>45</sup> Rothmund P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625.
- <sup>46</sup> Adler A. D., Skalar L., Longo F. R., Finarelli J. D., Finarelli M., *J. Heterocycl. Chem.*, **1968**, 5, 669.
- <sup>47</sup> Adler A. D., Longo F. R., Finarelli J. D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- <sup>48</sup> Gonsalves A. M. D. R., Johnstone R. A. W., Pereira M. M, deSantAna A. M. P., Serra A. C., Sobral A. J. F. N., Stocks P. A., *Heterocycles*, **1996**, 43, 829.
- <sup>49</sup> Goslinski T., Piskorz J., *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.*, **2011**, 12, 304.
- <sup>50</sup> Longo F. R, Finarelli M. G and Kim J. B., *J. Heterocycl. Chem.*, **1969**; 6: 927.
- <sup>51</sup> Costa J. I. T., Tomé A. C., Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2011**; 15: 1116.
- <sup>52</sup> Songca S. P., Bonnett R., *South African journal of chemistry*, **1997**, 50, 40.
- <sup>53</sup> Songca S. P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 1469.
- <sup>54</sup> Moon S. C., Shin J.-H., Jeong B. H., Kim H. S., Byung S. Y., Lee J.-S., Leec B. S., Namgoong S. K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1435.

- 
- <sup>55</sup> Ko Y.-J., Yun K.-J., Kang M.-S., Park J., Lee K.-T., Park S. B., Shina J.-H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 2789.
- <sup>56</sup> Narra M., Elliott P., Swavey S., *Inorganica Chimica Acta*, **2006**, 359, 2256.
- <sup>57</sup> Costa L., Alves E., Carvalho C. M. B., Tomé J. P. C., Faustino M. A. F., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Cunha A., Almeida A., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7, 415.
- <sup>58</sup> Tomé J. P. C., Neves. G. P. M. S., Tomé A. C, Cavaleiro J. A. S., Soncin M., Magaraggia M., Ferro S., Jori G., *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 6649.
- <sup>59</sup> Johnstone R. A. W., Nunes M. L. P. G., Pereira M. M., Gonsalves A. M. D. R., Serra A. C., *Heterocycles*, **1996**, 7, 1423.
- <sup>60</sup> Monteiro C. J. P., Pereira M. M., Pinto S. M. A., Simões A. V. C, Sá G. F. F., Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Wyatt M. F., *Tetrahedron*, **2008**, 6.4, 5132.
- <sup>61</sup> Gonsalves, A.; Pereira, M. M., *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933
- <sup>62</sup> Lindsey J. S., Hsu H. C., Schreiman I. C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969.
- <sup>63</sup> Lindsey J. S., Wagner R. W., *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 828.
- <sup>64</sup> Arsenault, G. P., Bullock E., Macdonald S. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384.
- <sup>65</sup> van der Made A. W., Hoppenbrouwer E. J. H., Nolte R. J. M., Drenth W., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1988**, 107, 15.
- <sup>66</sup> Woller E. K., DiMagno S. G., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 1588.
- <sup>67</sup> Caminos D. A., Durantini E. N., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2005**; 9: 334.
- <sup>68</sup> Caminos D. A., Durantini E. N., *J. Photochem. Photobiol. A*, **2008**, 198, 274.
- <sup>69</sup> Elgie K. J., Scobie M., Boyle R. W., *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 2753.
- <sup>70</sup> Clarke O. J., Boyle R. W., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 7167.
- <sup>71</sup> Celli J. P., Spring B. Q., Rizvi I., Evans C. L., Samkoe K. S., Verma S., Pogue B. W., Hasan T., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2795.
- <sup>72</sup> G. Jori, *J. Photochem. Photobiol., B*, **1996**, 36, 87.
- <sup>73</sup> Pushpan S. K., Venkatraman S., Anand V. G., Sankar J., Parmeswaran D., Ganesan S., Chandrashekar T. K., *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, **2002**, 2, 187.
- <sup>74</sup> Bonnett R., “*Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*”, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, **2000**.
- <sup>75</sup> Allison R. R., Sibata C. H., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2010**, 7, 61.

- 
- <sup>76</sup> O'Connor A. E., Gallagher W. M., Byrne A. T., *Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1053.
- <sup>77</sup> Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., Kiesslich, T. *Laser Med. Sci.*, **2009**, 24, 259.
- <sup>78</sup> Ormond A. B., *Synthesis and Characterization of Porphyrin and Formazan Dyes as Potential PDT Sensitizers*, Tese de Doutorado, Raleigh, North Carolina, **2012**.
- <sup>79</sup> Bhaumik J., Weissleder R., McCarthy J. R., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5894.
- <sup>80</sup> Sobral A. J., *Estudos de síntese de porfirinas para produção de filmes moleculares*, Tese de Doutorado, Coimbra, **1998**.
- <sup>81</sup> Konan Y. N., Gurny R., Allémann E., *J. Photochem. Photobiol. B*, **2002**, 66, 89.
- <sup>82</sup> Josefsen L. B., Boyle R. W., *Brit. J. Pharmacol.*, **2008**, 154, 1.
- <sup>83</sup> Sutton J. M., Clarke O. J., Fernandez N., Boyle R. W., *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 249.
- <sup>84</sup> Pandey R. K., Constantine S., Tsuchida T., Zheng G., Medforth C. J., Aoudia M., Kozyrev A. N., Rodgers M. A. J., Kato H., Smith K. M., Dougherty T. J., *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2770.
- <sup>85</sup> Sharman W. M., Liera J. E, Allen C. M., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2004**, 56, 53.
- <sup>86</sup> Stojanovic S.D., Zaric S.D., *The Open Structural Biology Journal*, **2009**, 3, 34.
- <sup>87</sup> Hamblin M. R., Newman J., *J. Photochem Photobiol. B*, **1994**, 26, 147.
- <sup>88</sup> Smith K., Malatesti N., Cauchon N., Hunting D., Lecomte R., Lier J. E., Greenman J., Boyle R. W., *Immunology*, **2010**, 132, 256.
- <sup>89</sup> Chaloin L., Bigey P., Loup C., Marin M., Galeotti N., Piechaczyk M., Heitz F., Meunier B., *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 691.
- <sup>90</sup> Vazquez M. S., Jensen T. J., Fronczek F. R., Hammer R. P., Vicente M. G. H., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 852.
- <sup>91</sup> Vazquez M. S., Jensen T. J., Hammer R. P., Vicente M. G. H., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 1364.
- <sup>92</sup> Wang J. T.-W., Giuntini F., Eggleston I. M., Bown S. G., MacRobert A. J., *J. Control. Release*, **2012**, 157, 305.
- <sup>93</sup> Dmitriev R. I., Ropiak H. M., Ponomarev G. V., Yashunsky D. V., Papkovsky D. B., *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 2507.

- 
- <sup>94</sup> Sehgal I, Sibrian-Vazquez M., Vicente M. G., *J. Med. Chem.*, **2008**, 19, 6014.
- <sup>95</sup> Khoza P., Antunes E., Chen J.-Y., Nyokong T., *J. Lumin.*, **2013**, 134, 784.
- <sup>96</sup> Cavaleiro J. A. S., Tomé J. P. C., Faustino M. A. F., *Top. Heterocycl. Chem.*, **2007**, 7, 179.
- <sup>97</sup> Laville I., Figueiredo T., Looock B., Pigaglio S., Maillard P., Grierson D. S., Carrez D., Croisyc A., Blaisa J., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 1643.
- <sup>98</sup> Maillard P., Looock B., Grierson D.S., Laville I., Blais J., Doz F., Desjardins L., Carrez D., Guerquin-Kern J.-L., Croisy A., *Photodiagn. Photodyn.*, **2007**, 4, 261.
- <sup>99</sup> Obata M., Hirohara S., Sharyo K., Alitomo H., Kajiwara K., Ogata S., Tanihara M., Ohtsuki C., Yano S., *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1770, 1204.
- <sup>100</sup> Lee S. J., Koo H., Jeong H., Huh M. S., Choi Y., Jeong S. Y., Byun Y., Choi K., Kim K., Kwon I. C., *J. Control. Release*, **2011**, 152, 21.
- <sup>101</sup> Lim C.-K., Shin J., Kwon I. C., Jeong S. Y., Kim S., *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 1022.
- <sup>102</sup> Synytsya A., Grafová M., Slepicka P., Gedeon O., Synytsya A., *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 489.
- <sup>103</sup> Abdelghany S. M., Schmid D., Deacon J., Jaworski J., Fay F., McLaughlin K. M., Gormley J. A., Burrows J. F., Longley D. B., Donnelly R. F., Scott C. J., *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 302.
- <sup>104</sup> Gaware V. S., Håkerud M., Leósson K., Jónsdóttir S., Hogset A., Berg K., Másson M., *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 807.
- <sup>105</sup> Vazquez M. S., Jensen T. J., Vicente M. G. H., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2007**, 86, 9.
- <sup>106</sup> Simal C. J. R., *Rev. Med. Minas Gerais*, **2011**, 21, 289.
- <sup>107</sup> Lima P. J. J., *Física em Medicina Nuclear – Temas e Aplicações*, Imprensa da Universidade de Coimbra, **2008**.
- <sup>108</sup> Lima P. J. J., *Biofísica Médica*, Imprensa da Universidade de Coimbra, **2003**.
- <sup>109</sup> Powsner R. A., Powsner E. R., *Essential Nuclear Medicine Physics*, 2nd edition, Blackwell Publishing, Malden, **2006**.
- <sup>110</sup> Heinrich L. K., *Nuclear and Radiochemistry: fundamentals and Applications*. 2<sup>nd</sup> edition, WILEY-VCH, Weinheim, **2001**.

- 
- <sup>111</sup> Saha G. B., *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*, 2nd edition, New York: Springer-Verlag, **2001**.
- <sup>112</sup> Saha G. B., *Basics of PET Imaging: Physics, Chemistry and Regulations*, 2nd Edition, Springer, New York, **2010**.
- <sup>113</sup> Bailey D. L., Townsend D. W., Valk P. E., Maisey M. N., *Positron Emission Tomography: basic sciences*, Springer, Londres, **2005**.
- <sup>114</sup> Dunphy M. P. S., Lewis J., *Journal of Nuclear Medicine*, **2009**, 50, 106S
- <sup>115</sup> Suzuki M., Doi H., Hosoya T., Långström B., Watanabe Y., *TRAC- Trend Anal. Chem.*, **2004**, 23, 595.
- <sup>116</sup> Bars D. L., *J. Fluorine Chem.*, **2006**, 127, 1488.
- <sup>117</sup> Mathis C. A., Lopresti B. J., Klunk W. E., *Nucl. Med. Biol.*, **2007**, 34, 809.
- <sup>118</sup> Langer O., Nagren K., Dolle F., Lundkvist C., Sandell J., Swahn C. G., Vaufrey F., Crouzel C., Maziere B., Halldin C., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1999**, 42, 1183.
- <sup>119</sup> Pike V. W., Halldin C., Crouzel C., Barre L., Nutt D. J., Osman S., Shah F., Turton D. R., Waters S. L., *Nucl. Med. Biol.*, **1993**, 20, 503.
- <sup>120</sup> Bacharach S. L., Libutti S. K., Carrasquillo J. A., *Nucl. Med. Biol*, **2000**, 27, 671.
- <sup>121</sup> Snyder S. E., Kilbourn M. R., *Chemistry of fluorine-18 radiopharmaceuticals. In Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, **2003**.
- <sup>122</sup> Coenen H. H., *Fluorine-18 Labeling Methods: Features and Possibilities of Basic Reactions*, PET Chemistry - Ernst Schering Research Foundation Workshop, **2007**, Volume 64, 15.
- <sup>123</sup> Coenen H. H., Elsinga P. H., Iwata R., Kilbourn M. R., Pillai M. R. A., Rajan M. G. R., Wagner Jr. H. N., Zaknun J. J., *Nucl. Med. Biol.*, **2010**, 37, 727.
- <sup>124</sup> Miller P. W., Long N. J., Vilar R., Gee A. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8998.
- <sup>125</sup> Pandey S. K., Gryshunk A. L., Sajjad M., Zheng X., Chen Y., Abouzeid M. M., Morgan J., Charamisinau I., Nabi H. A., Oseroff A., Pandey R. K., *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 6286.
- <sup>126</sup> Ocakoglu K., Bayrak E., Onursal M., Yilmaz O., Lambrecht F. Y., Holzwarth A. R., *Appl. Radiat. Isotopes*, **2011**, 69, 1165.



- 
- <sup>127</sup> Shi J., Liu T. W.B., Chen J., Green D., Jaffray D., Wilson B. C., Wang F., Zheng G., *Theranostics*, **2011**, 1, 363.
- <sup>128</sup> Thaller R. A., Lyster D. M., Dolphin D., *Adv Exp Med Biol.*, **1983**, 160, 265.
- <sup>129</sup> Das T., Chakraborty S., Sarma H. D., Banerjee S., Venkatesh M., *Nucl. Med. Biol.*, **2010**, 37, 655.
- <sup>130</sup> Gros C. P., Eggenspiller A., Nonat A., Barbe J.-M., Denat F., *Med. Chem. Commun.*, **2011**, 2, 119.
- <sup>131</sup> Shetty S. J., Murugesan S., Chatterjee S. R., Banerjee S., Sristava T. S., Noronha O. P. D., Samuel A. M., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **1996**, 38, 411
- <sup>132</sup> Murugesan S., Shetty S. J., Srivastava T. S., Samuel A. M., Noronha O. P. D., *J. Photochem. Photobiol. B*, **2002**, 68, 33
- <sup>133</sup> Ranyuk E. R., Cauchon N., Ali H., Lecomte R., Guérin B., van Lier J. E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 7470.
- <sup>134</sup> Faulkner A. S., Rousseau J. A., Langlois R., Berard V., Lecomte R., Bernard F., van Lier J. E., *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2008**, 12, 49
- <sup>135</sup> Gonçalves N. P., *Metilação de porfirinas para marcação com carbono-11 e potencial aplicação em Imagiologia PET*, dissertação de Mestrado, FCTUC-Coimbra, **2010**.
- <sup>136</sup> Kavali R. R., Lee B. C., Moon B. S., Yang S. D., Chun K. S., Choi C. W., Lee C.-H., Chi D. Y., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2005**, 48, 749.
- <sup>137</sup> Ranyuk E., Ali H., Guérin B., Lier J.E., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2013**; 17: 850.



# **Capítulo 2**

**Síntese de macrociclos tetrapirrólicos  
fluorados anfifílicos e derivados conjugados**



O objectivo fulcral do trabalho descrito neste capítulo centra-se na síntese e caracterização de macrociclos tetrapirrólicos fluorados (porfirinas, clorinas e bacterioclorinas) para potencial desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica (PDT) e/ou imagem molecular após radiomarcagem com flúor-18.

Tal como foi referido no Capítulo 1, a substituição de átomos de hidrogénio por átomos de flúor em determinadas posições de uma molécula é uma metodologia muito utilizada no desenvolvimento de fármacos,<sup>1,2</sup> uma vez que pode não só contribuir para o aumento da semi-vida plasmática do composto no organismo, mas também modelar as suas propriedades físico-químicas e consequentemente a sua biodisponibilidade e permeabilidade através das membranas celulares.<sup>3,4</sup> No domínio dos macrociclos tetrapirrólicos, o número de APIs contendo átomos de flúor na sua constituição é muito reduzido, existindo apenas um em fase de ensaios clínicos para tratamento do cancro, e cujos estudos iniciais, nomeadamente a estratégia sintética, foi objecto de estudos descritos nesta tese. Neste capítulo, descrevemos a preparação e modelação estrutural de derivados de macrociclos tetrapirrólicos, contendo átomos de flúor na sua estrutura, de forma a obter uma família de compostos com diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas, que possam ser usados para transposição em maior escala e também desenvolver novos fotossensibilizadores para terapia e/ou diagnóstico. No que diz respeito à terapia, pretende-se moléculas com propriedades ideais para potencial utilização como fotossensibilizadores em terapia de cancro (nomeadamente PDT), estando os resultados descritos na secção 2.1. Relativamente ao diagnóstico, foram optimizadas novas moléculas de porfirinas, radiomarcadas com flúor-18, para potencial uso como radiofármacos no diagnóstico do cancro, usando a técnica de tomografia por emissão de positrões (PET) e os resultados apresentam-se no Capítulo 3.

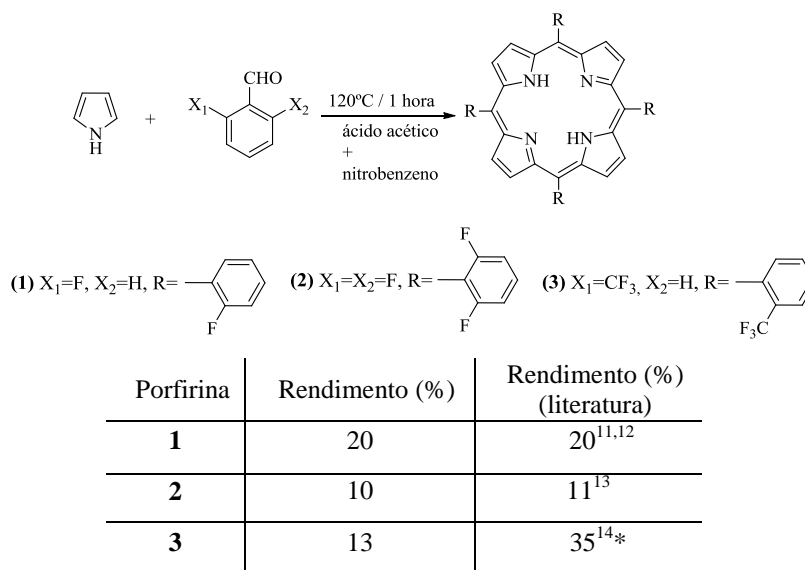
## 2.1. Síntese de *meso-tetraquisarilporfirinas* fluoradas

Tal como referido no Capítulo 1, de entre as múltiplas metodologias de síntese de *meso-tetraquisarilporfirinas*,<sup>5-8</sup> o método do nitrobenzeno<sup>9</sup> (um só passo) e o método de Lindsey<sup>10</sup> (dois passos) continuam a ser os métodos mais atractivos para a preparação de porfirinas, por permitirem a condensação directa de pirrol com aldeídos, e o produto final ser obtido com baixa contaminação das respectivas clorinas. Atendendo ao

objectivo deste trabalho se centrar também no desenvolvimento de métodos de síntese de macrociclos tetrapirrólicos que possam ser facilmente transponíveis para uma maior escala, seleccionámos, para a síntese das porfirinas descritas neste trabalho, o método do nitrobenzeno devido à facilidade de execução e isolamento final dos produtos. Salienta-se que a principal vantagem do método do nitrobenzeno, em comparação com outros descritos na literatura, é a possibilidade de, no meio da mistura reaccional, se efectuar simultaneamente o passo de condensação do aldeído com o pirrol (formação do porfirinogénio) e a reacção de oxidação do porfirinogénio para a correspondente porfirina, uma vez que com temperaturas altas o nitrobenzeno poder funcionar simultaneamente como solvente e como agente oxidante.<sup>9</sup> Deste modo, o uso de um oxidante de baixo custo como o nitrobenzeno, torna o método do solvente nitrado mais atractivo do ponto de vista económico, quando se pretende desenvolver métodos de síntese de porfirinas em grande escala e com elevado grau de pureza.

Assim, numa experiência tipo, colocou-se uma mistura de ácido acético/nitrobenzeno (2:1), o pirrol e uma quantidade equimolar do aldeído fluorado pretendido, deixando a mistura em agitação à temperatura de 120°C. Após 60 minutos de reacção, a mistura foi arrefecida até atingir a temperatura ambiente, observando-se na maioria dos casos, a precipitação da porfirina pretendida. No entanto, com o intuito de maximizar a precipitação adicionou-se metanol, deixando-se posteriormente a mistura de reacção em repouso, no mínimo durante 18 horas, a uma temperatura entre 5-7°C. Após todo este processo, o sólido foi filtrado e o produto obtido lavado com metanol, obtendo-se cristais roxos das *meso-tetraquisarilporfirinas* fluoradas, com os substituintes nas posições *meso*, provenientes da estrutura dos aldeídos de partida. No Esquema 2.1 está representado o processo geral de síntese das *meso-tetraquisarilporfirinas*, *5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirina 1*, *5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluorofenil)porfirina 2* e *5,10,15,20-tetraquis(2-trifluorometilfenil)porfirina 3* e os respectivos rendimentos da reacção após purificação e isolamento. Desta forma, foi possível preparar as porfirinas fluoradas **1** e **2**, precursoras dos novos compostos descritos nas secções seguintes, com rendimentos semelhantes aos previamente descritos por Pereira *et al.*<sup>11-13</sup> e, pela primeira vez, a porfirina contendo um

grupo trifluorometil **3** com um rendimento de 13%, usando o método do nitrobenzeno (Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Síntese de porfirinas fluoradas segundo o método do nitrobenzeno.<sup>9</sup>

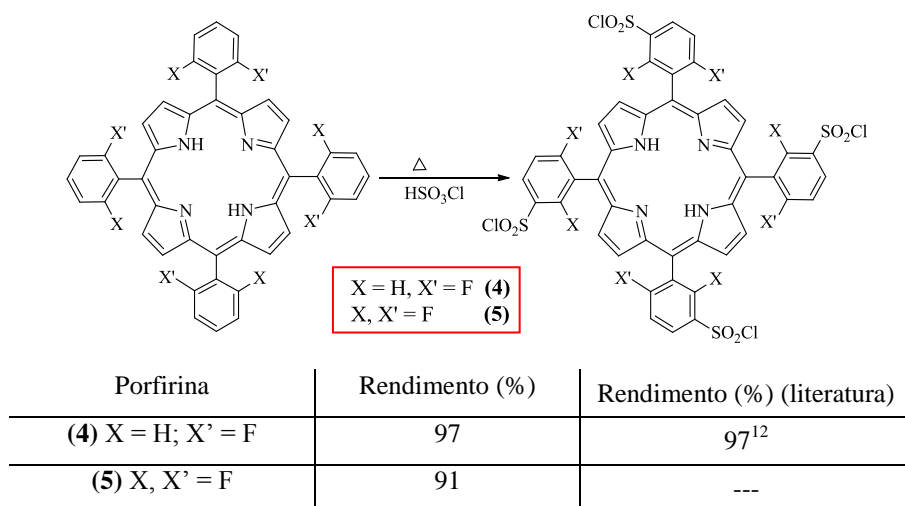
(\*rendimento obtido pelo método de Lindsey)

Salienta-se que apesar do rendimento da síntese da porfirina **3** ser inferior, comparando com o rendimento de 35% obtido pelo método de Lindsey, neste estudo não foi necessário recorrer a processos de purificação baseados na utilização de colunas cromatográficas de gel de sílica, nem elevados volumes de solventes clorados, pelo que consideramos que a expansão da metodologia do nitrobenzeno a porfirinas com grupos fortemente electronegativos, e em posições *orto* dos grupos fenilo, como é o caso do grupo trifluorometil, abrem perspectivas para a utilização desta metodologia sintética para a preparação de compostos fluorados em maior escala. As novas porfirinas sintetizadas foram caracterizados por RMN  $^1H$  e  $^{19}F$ , e por espectrometria de massa, estando os dados experimentais descritos no Capítulo 4.

Tendo em conta o nosso objectivo global de preparar sensibilizadores fluorados para aplicação em sistemas vivos e dado o crescente número de aplicações de porfirinas e derivados em ciências biomédicas,<sup>15-19</sup> considerámos importante modelar a sua biocompatibilidade, uma vez que as *meso-tetraquisarilporfirinas* fluoradas sintetizadas anteriormente apresentam uma baixa solubilidade em meios fisiológicos, como consequência da grande hidrofobicidade do macrociclo, não cumprindo os requisitos

necessários para estudos biológicos. Deste modo, para promover a modelação das propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas destes compostos, seguiu-se uma estratégia previamente desenvolvida por Pereira *et al.*,<sup>20</sup> que consiste na sua derivatização com grupos clorossulfónicos, seguido de reacção com nucleófilos. Salienta-se que já foram descritos derivados do tipo sulfonamida de porfirinas contendo átomos de cloro e de flúor na sua estrutura,<sup>12,21</sup> no entanto poucos são os exemplos da modelação estrutural *via* ésteres sulfónicos.<sup>21</sup>

Na sequência do trabalho desenvolvido conducente à dissertação de Mestrado,<sup>22</sup> em que foram preparados derivados de macrociclos tetrapirrólicos, *via* clorossulfonação, no trabalho apresentado nesta Tese, foi seguida esta metodologia para a modelação estrutural das porfirinas fluoradas **1**, **2** e **3**. Foram assim sintetizadas a *meso-tetraquis*(2-fluoro-5-clorossulfonilfenil)porfirina **4** e a *meso-tetraquis*(2,6-difluoro-3-clorossulfonilfenil)porfirina **5** (Esquema 2.2).



Esquema 2.2. Clorossulfonação das *meso-tetraquis*arilporfirinas e respectivos rendimentos obtidos.

Atendendo a que se trata de reacções de substituição electrofílica aromática e que a presença de grupos atractores de electrões desactiva o anel aromático, foram efectuadas optimizações da reacção de clorossulfonação de cada composto em particular. Para a clorossulfonação da porfirina **1**, seguimos o procedimento descrito na literatura,<sup>12,22</sup> e o rendimento obtido encontra-se de acordo com o já publicado anteriormente (Esquema 2.2). Quanto à porfirina **2**, atendendo à elevada

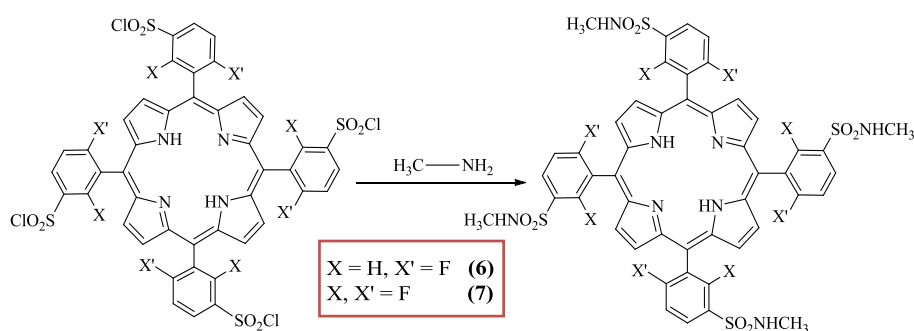


electronegatividade do átomo de flúor, e à presença de dois átomos no grupo fenilo das posições *meso* da porfirina, efectuou-se um estudo do efeito da variação da temperatura (30, 60 e 100°C) na selectividade e rendimento do produto final. Assim, na clorossulfonação da porfirina **2**, observou-se por tlc, usando diclorometano como eluente, que quando a reacção foi efectuada a 30°C o rendimento de produto clorossulfonado, após 120 minutos, era baixo, o mesmo se observando à temperatura de 60°C. Por outro lado, a 100°C e após 120 minutos, observou-se por tlc a formação de um componente principal atribuído ao produto clorossulfonado pretendido. Deste modo, seleccionou-se a temperatura de 100°C, para efectuar a reacção. Numa experiência tipo, a porfirina **2** foi dissolvida directamente num excesso de ácido clorossulfónico (1:40) à temperatura de 100° C, durante 120 minutos. Após arrefecimento da mistura reaccional até à temperatura ambiente, o excesso de ácido clorossulfónico e outros sub-produtos são retirados através de uma lavagem contínua com água. Neste método de isolamento temos um sistema bifásico, de diclorometano/água, em que a porfirina clorossulfonada se encontra na fase orgânica estando assim mais protegida do ataque nucleofílico da água. A neutralização do produto foi conseguida adicionando uma solução de hidrogenocarbonato de sódio, observando-se a passagem da solução de cor verde a vermelho escuro, o que indica a transformação do dicatião na correspondente porfirina neutra. Separam-se as fases, recolhendo a fase orgânica e, após uso de agente secante, o solvente foi filtrado e evaporado, obtendo-se a porfirina clorossulfonada **5**, com rendimento superior a 90% (Esquema 2.2).

Finalmente, procedeu-se à optimização da síntese da *meso-tetraquis*(2-trifluorometilfenil)porfirina **3**, como descrito para a porfirina **1** e **2**, colocando a porfirina **3** com um excesso de ácido clorossulfónico (1:40). Em todas as experiências de clorossulfonação efectuadas com esta porfirina obteve-se uma mistura complexa de produtos de cor verde e castanha. Após separação destes por tlc preparativo, análise por RMN <sup>1</sup>H e HPLC-MS não foi possível atribuir uma estrutura inequívoca dos produtos formados e desta forma, decidimos prosseguir os estudos apenas com as porfirinas clorossulfonadas **4** e **5**.

A grande susceptibilidade do grupo clorossulfonilo para sofrer ataque nucleofílico na presença de amins ou água, tem sido objecto de diversos estudos,<sup>12,20-25</sup> e foi também usada neste trabalho com o objectivo de modelar a anfifilicidade das porfirinas

conferindo-lhes propriedades mais apropriadas para desenvolvimento de potenciais fotossensibilizadores para PDT. Para aumentar a sua compatibilidade com meios biológicos, as porfirinas fluoradas clorossulfonadas **4** e **5**, anteriormente sintetizadas, foram transformadas nas respectivas sulfonamidas, fazendo-as reagir com metilamina (Esquema 2.3), e/ou ésteres sulfónicos, fazendo-as reagir com álcoois de estrutura variada (Esquema 2.4). Na síntese de porfirinas contendo grupos sulfonamida, seguiu-se a metodologia descrita na literatura para este tipo de compostos,<sup>12,22</sup> e que consiste na adição de um excesso da metilamina (1:40) a uma solução de *meso-tetraquis*(2-fluoro-5-clorossulfonilfenil)porfirina **4** em diclorometano, à temperatura ambiente e com agitação contínua, durante 3 horas. O controlo da reacção foi feito por tlc e para eliminar a amina em excesso, procedeu-se a uma lavagem do produto obtido com uma solução de ácido clorídrico (1M), de seguida com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e posteriormente com água destilada. Recolheu-se a fase orgânica, secou-se e procedeu-se a uma cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente uma mistura de diclorometano:acetato de etilo (1:2). O solvente foi evaporado obtendo-se desta forma os cristais roxos da *meso-tetraquis*(2-fluoro-5-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirina **6**, com rendimentos superiores a 70%. Utilizando a mesma metodologia, foi preparada também a *meso-tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirina **7** e a caracterização de ambas as porfirinas encontra-se descrita na secção experimental desta tese, Capítulo 4.



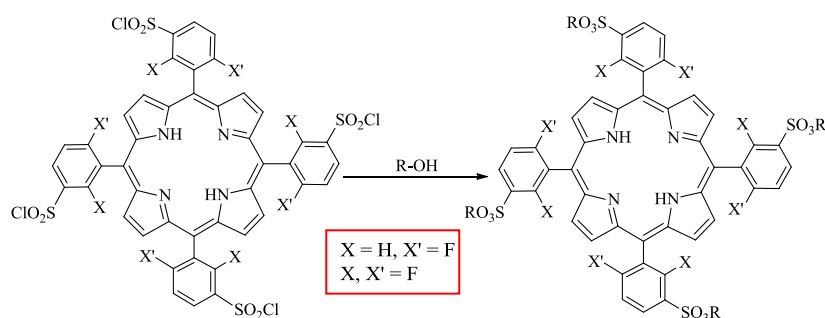
| Porfirina             | Rendimento (%) | Rendimento (%) (literatura) |
|-----------------------|----------------|-----------------------------|
| ( <b>6</b> ) X=H,X'=F | 78             | 78 <sup>12</sup>            |
| ( <b>7</b> ) X,X'=F   | 71             | ---                         |

Esquema 2.3. Síntese e rendimento da reacção das porfirinas com grupos sulfonamida.

Salientamos que a preparação de sulfonamidas, *via* clorossulfonação de *meso-tetraquis*arilporfirinas é um método eficiente de síntese de derivados porfirínicos, uma vez que os mesmos foram obtidos após cromatografia com um rendimento superior a 70%, valores que se encontram de acordo com os da literatura para este tipo de compostos, excepto a que continha grupos trifluorometil em posições *orto* que originou sempre uma mistura complexa de produtos.

Com o intuito de expandir a família de porfirinas fluoradas, contendo na sua estrutura outras funcionalidades químicas, decidiu-se prosseguir os estudos com a síntese de porfirinas derivatizadas com grupos éster sulfónico, através da reacção das porfirinas clorossulfonadas **4** e **5**, com álcoois de estrutura variada. Atendendo a que os álcoois são nucleófilos mais fracos do que as aminas, os estudos prosseguiram com a optimização das condições de reacção para preparar uma família de porfirinas com grupos éster sulfónico na sua constituição. Para tal foram seguidas três estratégias diferentes: i) uso de piridina como base; ii) preparação de alcoolatos de sódio, usando sódio metálico; iii) preparação de alcoolatos de sódio, usando uma solução concentrada de hidróxido de sódio. Seguindo a estratégia i), o rendimento do produto isolado foi apenas de 30% devido ao processo de isolamento. No caso da estratégia ii), usando o sódio metálico na formação do alcoolato de sódio para posterior reacção com a porfirina clorossulfonada, obteve-se maioritariamente produtos solúveis em água, resultantes de hidrólise do grupo clorossulfónico. Desta forma, decidimos seguir a via sintética iii) e numa experiência tipo, a porfirina clorossulfonada pretendida foi dissolvida em THF seco e adicionada a uma mistura, previamente em agitação a 0°C, de álcool desejado (1:40), dissolvido em THF e uma solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio (1:8). A reacção foi mantida à temperatura ambiente, durante 1 hora, sendo controlada por tlc até total consumo do material de partida. De seguida, adicionou-se 50 mL de diclorometano e procedeu-se a uma lavagem do produto obtido com água. Recolheu-se a fase orgânica, secou-se e purificou-se o produto por cromatografia de coluna de gel de sílica, usando uma mistura de diclorometano/acetato de etilo. O solvente foi evaporado dando origem aos respectivos ésteres sulfónicos na forma de um sólido roxo escuro. Foram assim preparadas, usando propan-1-ol, a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-(3-propoxissulfonil)fenil]porfirina **8** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(3-propoxissulfonil)fenil]porfirina **13**; usando 3,3,3-trifluoropropan-1-ol, a *5,10,15,20-*

*tetraquis*[2-fluoro-5-(3,3,3-trifluoropropoxissulfonil)fenil]porfirina **9** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(3,3,3-trifluoropropoxissulfonil)fenil]porfirina **14**; usando butan-1-ol, a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-(3-butoxissulfonil)fenil]porfirina **10** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(3-butoxissulfonil)fenil]porfirina **15**; usando 2,2,3,4,4,4-hexafluorobutan-1-ol a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxissulfonil)fenil]porfirina **11** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxissulfonil)fenil]porfirina **16** e usando 4,4,5,5,5-pentafluoropentan-1-ol a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloxissulfonil)fenil]porfirina **12** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloxissulfonil)fenil]porfirina **17**. Os rendimentos obtidos, após isolamento, foram superiores a 80% (Esquema 2.4). Todas as porfirinas sintetizadas foram caracterizadas por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  e por espectrometria de Massa, encontrando-se descritas no Capítulo 4 desta tese (um exemplo da caracterização completa de uma porfirina contendo grupos éster sulfônico encontra-se em anexo 1 – Figuras A1 e A2).



| Porfirina<br>X = H, X' = F   |                | Porfirina<br>X, X' = F   |                |
|--|----------------|--|----------------|
|  | Rendimento (%) |  | Rendimento (%) |
| <b>(8)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                   | 94             | <b>(13)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                  | 78             |
| <b>(9)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                   | 96             | <b>(14)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                  | 85             |
| <b>(10)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>                  | 89             | <b>(15)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>                  | 82             |
| <b>(11)</b> R=CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> | 84             | <b>(16)</b> R=CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> | 81             |
| <b>(12)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 95             | <b>(17)</b> R=(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | 82             |

Esquema 2.4. Esquema geral de síntese e rendimentos obtidos na síntese de porfirinas contendo ésteres sulfônicos como substituintes nos fenilos *meso*.

Pela análise da tabela do Esquema 2.4 concluímos que a síntese de porfirinas incorporando ésteres sulfônicos, nos grupos fenilo das posições *meso* do macrociclo, é

uma eficiente estratégia para derivatizar macrociclos tetrapirrólicos, uma vez que foi obtida uma nova família de compostos com rendimentos superiores a 80%.

Sabendo que os macrociclos tetrapirrólicos são uma das classes de compostos mais procurados pela comunidade científica para desenvolver novos fotossensibilizadores para PDT,<sup>15,17-33</sup> e estando estabelecido que muitos deles se conseguem atravessar a membrana celular, é de elevada relevância, no desenvolvimento de qualquer nova molécula, conhecer a sua afinidade membranar para inferir sobre a localização desta nos tecidos tumorais. A afinidade membranar de um fotossensibilizador é controlada pelo seu carácter anfifílico, que depende necessariamente da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa molécula. É importante salientar que, para além da modelação da capacidade das moléculas para se localizarem nas zonas hidrofóbicas/hidrofílicas da membrana celular ou das proteínas transportadoras, a estrutura anfifílica também permite evitar a agregação típica dos macrociclos tetrapirrólicos, que pode provocar diminuição da formação de espécies reactivas de oxigénio.<sup>34</sup> Deste modo, a variação sistemática das propriedades anfifílicas de uma molécula é um dos desafios no *design* molecular de novos macrociclos tetrapirrólicos biocompatíveis.

Vários autores e mesmo empresas farmacêuticas utilizam o cálculo do coeficiente de partição octanol/água como uma primeira aproximação para obter dados sobre as propriedades anfifílicas das moléculas. Esta foi também a estratégia seguida neste trabalho. Sendo assim, para avaliar o carácter anfifílico dos compostos sintetizados, nomeadamente o efeito de átomos de flúor e o tamanho da cadeia lateral das porfirinas com grupos éster sulfónico, os estudos prosseguiram com a determinação dos coeficientes de partição octanol/água. O coeficiente de partição é definido como sendo o valor utilizado para caracterizar a lipofilia de um composto, ou seja, a tendência deste para se distribuir entre um solvente orgânico apolar e água, influenciando desta forma a tendência de uma molécula se movimentar através de compartimentos biológicos. O papel deste parâmetro nos mecanismos de transporte transmembranar foi observado, em 1964, nos estudos pioneiros de Hansch e Fujita<sup>35</sup> e, anos mais tarde, Lipinski evidenciou a sua importância no planeamento racional de qualquer fármaco,<sup>36</sup> salientando que a capacidade do fármaco se dissolver mais facilmente em solventes apolares ou polares é crucial para o desempenho eficaz da sua função no organismo. Deve encontrar-se então

um compromisso entre a lipofilia e a hidrofília, já que moléculas altamente lipofílicas têm tendência para ficar retidas nos tecidos gordos, a ligarem-se mais fortemente às proteínas plasmáticas diminuindo a interacção com os receptores e a serem muito pouco solúveis na fase aquosa, dificultando a sua biodistribuição. Pelo contrário, as moléculas muito hidrofílicas não têm a capacidade de atravessar a bicamada lipídica da membrana celular, ficando assim mais susceptíveis a serem rapidamente excretadas sem que ocorra a acção farmacológica pretendida. Collander,<sup>37</sup> em 1951, descreveu pela primeira vez, e mais tarde Hansch<sup>38</sup> confirmou, que um sistema bifásico octanol/água pode mimificar de uma forma simplista, *in vitro*, a interface soro fisiológico-membrana celular. O coeficiente de partição octanol/água é então definido pela razão da concentração do composto em estudo, após dissolução num sistema formado por octanol e água (Equação 1), em que P é o coeficiente de partição, C<sub>o</sub> a concentração do composto existente na fase orgânica e C<sub>aq</sub> a concentração do composto na fase aquosa:

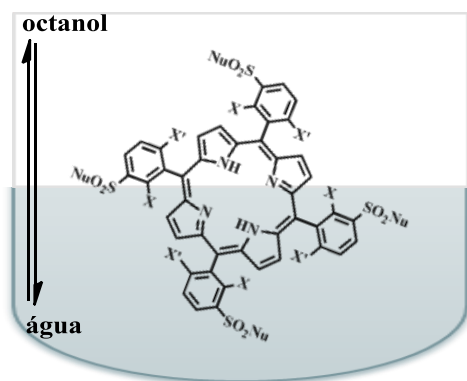
$$P=C_o/C_{aq} \qquad \text{Equação 1}$$

Neste trabalho seleccionámos o método mais comum de determinação de coeficientes de partição octanol/água, designado em inglês por “*shake-flash method*”,<sup>39,40,41</sup> que se baseia na determinação directa das concentrações de um determinado composto, que é agitado numa mistura de fase orgânica e fase aquosa. Como fase orgânica foi usado o octanol e como fase aquosa tampão fosfato, PBS (do inglês “*phosphate saline buffer*”, pH 7.4). Sendo assim, seguindo esta metodologia, com pequenas alterações,<sup>12,42</sup> foram traçadas rectas de calibração da concentração em função da emissão de fluorescência, excitando a banda de absorção Soret, a 420 nm, e medindo a fluorescência de seis soluções de porfirina (concentrações entre 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-5</sup>M, usando como solvente uma mistura de 70% etanol: 30% PBS e 70% etanol: 30% octanol). Seguidamente, uma quantidade bem determinada de porfirina pretendida foi colocada numa mistura com igual volume de octanol e PBS, agitada vigorosamente e centrifugada, à temperatura ambiente. Alíquotas de igual volume de cada uma das fases foram recolhidas, foi medida a fluorescência de cada fase e comparado o resultado com os valores das rectas de calibração calculadas previamente. Desta forma, foi possível encontrar o valor da concentração do composto pretendido e, segundo a Equação 1,

calculou-se o valor do respectivo coeficiente de partição, para as porfirinas **6-17**. Os valores dos coeficientes encontram-se geralmente tabelados sob a forma de logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água ( $\log P_{\text{octanol/água}}$ ). Assim, se  $\log P=0$ , é indicativo que  $P=1$  e o composto tem afinidade para ambas as fases. Se  $\log P<0$ , conseqüentemente  $P<1$  indicando que o composto tem maior afinidade para a fase aquosa, enquanto se  $\log P>0$ ,  $P>1$  e o composto tem mais afinidade para a fase orgânica.<sup>43</sup> Pode pois concluir-se que quanto menor o  $P$  mais hidrofílico será o composto e, quanto maior o  $P$ , mais lipofílico será o composto aumentando, em geral, a partição através da bicamada lipídica da membrana celular.

Lipinski, baseado em cálculos teóricos e valores de coeficientes de partição de uma vasta gama de compostos, descreveu a chamada “regra de 5” que considera que um fármaco terá uma fraca permeação através da membrana celular quando: i) possui mais de cinco ligações dadoras de hidrogénio; ii) existem mais de 10 ligações locais aceitadores de hidrogénios; iii) peso molecular superior a 500 e iv) o  $\log P>5$ . No entanto, existem excepções à regra como é o caso das vitaminas, antibióticos e antifúngicos.<sup>44,45,46</sup> Na Tabela 2.1 encontram-se os valores calculados do logaritmo do coeficiente de partição das porfirinas sintetizadas neste trabalho, contendo como substituintes dos grupos fenilo das posições *meso* grupos éster sulfónico e sulfonamidas.

Tabela 2.1. Valores de coeficiente de partição (dados pelo valor de  $\log P$ ) para porfirinas contendo grupos éster sulfónico e sulfonamida, sintetizadas neste trabalho.



|   | Nucleófilo (Nu) |               | $\log P_{\text{octanol/água}}$ |
|---|-----------------|---------------|--------------------------------|
| -NHCH <sub>3</sub>  | <b>6</b>        | X = H, X' = F | 2,33 <sup>12</sup>             |
|   | <b>7</b>        | X, X' = F     | 2,74                           |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                  | <b>8</b>        | X = H, X' = F | 0,13                           |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>                  | <b>10</b>       | X = H, X' = F | 0,41                           |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                  | <b>9</b>        | X = H, X' = F | 0,89                           |
|   | <b>14</b>       | X, X' = F     | 1,01                           |
| -CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> CHF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> | <b>11</b>       | X = H, X' = F | 1,14                           |
|   | <b>16</b>       | X, X' = F     | 1,49                           |
| -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CF <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>  | <b>12</b>       | X = H, X' = F | 1,37                           |
|   | <b>17</b>       | X, X' = F     | 1,94                           |

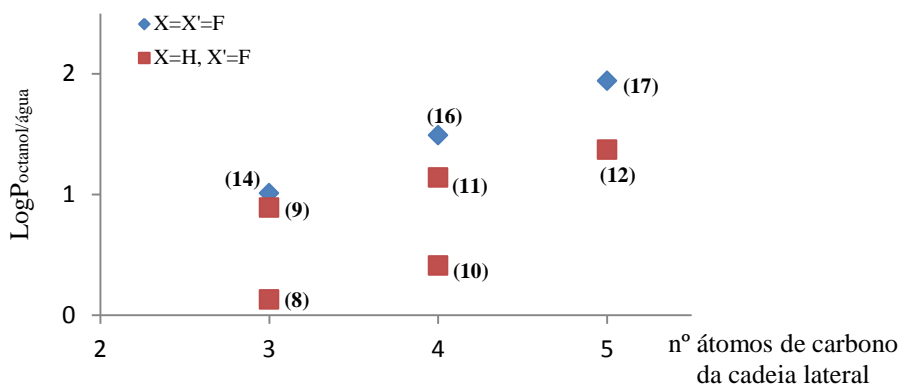


Figura 2.1. Valores de  $\log P_{(\text{octanol}/\text{água})}$  em função do número de átomos de carbono presentes na cadeia lateral das porfirinas com grupos éster sulfônico.

Pela análise da Tabela 2.1 e da Figura 2.1 é possível observar que a presença de átomos de flúor na estrutura da porfirina tem um efeito considerável na variação da anfifilicidade destes compostos, existindo mesmo uma relação entre o  $\log P_{\text{octanol}/\text{água}}$  e o aumento do número de átomos de flúor presentes na estrutura. É de notar que esta relação depende da distribuição dos átomos de flúor na cadeia lateral em causa, uma vez que o coeficiente de partição para as porfirinas com 6 átomos de flúor na cadeia lateral (porfirinas **11** e **16**,  $\log P_{\text{octanol}/\text{água}}=1,14$  e  $1,49$ , respectivamente) é inferior ao das porfirinas com 5 átomos de flúor na cadeia lateral (porfirinas **12** e **17**,  $\log P_{\text{octanol}/\text{água}}=1,37$  e  $1,94$ , respectivamente). Assim, comparando cadeias laterais homólogas, com e sem átomos de flúor, é possível constatar que o aumento do número dos átomos de flúor contribui para o aumento do coeficiente de partição octanol/água dos compostos em estudo, ou seja, aumenta a sua lipofilicidade, atribuindo perspectivas para a sua potencial administração oral<sup>47</sup> e, uma vez que os valores obtidos ( $1,49$ - $1,94$ ) são aproximados aos valores dos descritos como ótimo para absorção intestinal<sup>48</sup> podem também facilitar a penetração e acumulação nos tecidos cancerígenos.<sup>44,46</sup> As novas porfirinas com grupos éster sulfônico com cadeias laterais sem átomos de flúor (porfirina **8** e **10**) apresentam coeficientes de partição mais baixos ( $\log P_{\text{octanol}/\text{água}}=0,13$  e  $\log P_{\text{octanol}/\text{água}}=0,41$ ), sugerindo que estes compostos são mais hidrofílicos que os compostos com cadeias laterais fluoradas, podendo ser estes mais apropriados para



administração intravenosa.<sup>47</sup> As porfirinas com grupos sulfonamida (**6** e **7**) são os compostos mais lipofílicos ( $\log P_{\text{octanol/água}}=2,33$  e  $\log P_{\text{octanol/água}}=2,74$ ), apresentando valores de coeficiente de partição octanol/água mais apropriados para potencial administração transdérmica de fármacos,<sup>49,50</sup> penetração e acumulação nos tecidos cancerígenos<sup>44,46</sup> e ainda no sistema nervoso central.<sup>51</sup> Pela análise da Figura 2.1 é possível observar o aumento do valor do  $\log P_{\text{octanol/água}}$  com o número de carbonos da cadeia lateral das porfirinas com grupos éster sulfónico na sua estrutura, mas também o aumento do  $\log P_{\text{octanol/água}}$  com o aumento do nº de átomos de flúor presentes na porfirina.

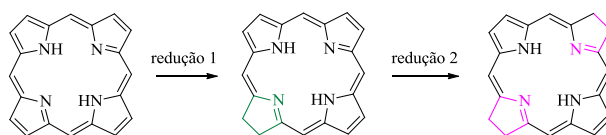
Em resumo, nesta secção foi descrito um método eficiente de síntese de *meso-tetraarilporfirinas* fluoradas e sua derivatização com grupos sulfonamida e éster sulfónico e determinados os coeficientes de partição octanol/água de todos os compostos sintetizados, observando-se uma forte influência, tanto no número de átomos de flúor, como do tipo de grupo substituinte. Desta forma, podemos afirmar que as novas porfirinas desenvolvidas nesta secção abrem múltiplas potencialidades para a posterior avaliação biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, abrindo mesmo perspectivas para diferentes vias de administração. Salienta-se que estes estudos estão inseridos num projecto de colaboração do grupo de Catálise e Química Fina da Universidade de Coimbra, com as empresas Luzitin e Bluepharma, para desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para PDT.

## 2.2. Síntese de *meso-tetraquisarilbacterioclorinas* e *clorinas fluoradas*

As porfirinas são macrociclos aromáticos com 22 electrões  $\pi$  que apresentam uma forte absorção por volta dos 420 nm (banda Soret) e 4 bandas Q com comprimento de absorção máximo de 650 nm. No entanto, como foi referido no Capítulo 1, para obter o efeito fotodinâmico ideal, o fotossensibilizador após activação com luz de comprimento de onda adequado, além de formar espécies de oxigénio reactivas – ROS - a partir do estado tripleto, ele deve absorver preferencialmente na região do infra-vermelho, para aumentar a eficiência da penetração da luz nos tecidos. Uma vez que duas das duplas ligações dos sistemas porfirínicos apresentam a reactividade típica de uma dupla ligação

C-C, é possível promover várias alterações estruturais, nomeadamente, redução de uma ou duas destas ligações, mantendo a aromaticidade e gerando assim clorinas e bacterioclorinas, respectivamente. Esta alteração provoca uma alteração de simetria da molécula e, como consequência, a observação de um desvio batocrómico das bandas, principalmente das bandas Q, para a zona espectral do vermelho, assim como o aumento da absorvidade molar das mesmas.

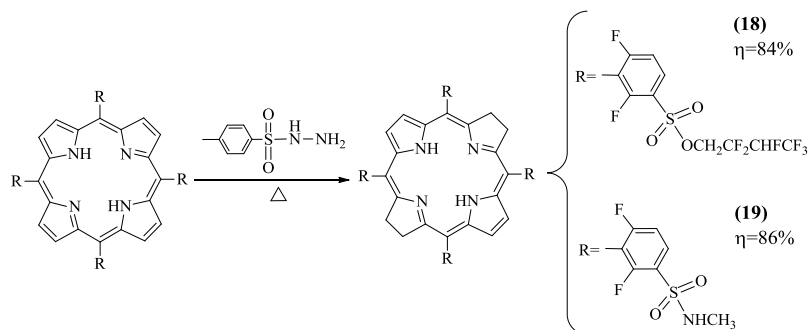
Evidência de trabalhos anteriores, de que as bacterioclorinas e clorinas com halogénios nas posições *orto* dos grupos fenilo das posições *meso*, eram consideravelmente estáveis na presença de oxigénio e luz<sup>52-54</sup>, e que macrociclos tetrapirrólicos deste tipo apresentam algumas das propriedades ideais para serem aplicados em PDT,<sup>55-59</sup> decidimos, após isolamento dos precursores porfirínicos fluorados, alargar os estudos à síntese de algumas hidroporfirinas do tipo bacterioclorina e clorina seleccionadas. A nossa estratégia sintética para a obtenção destas hidroporfirinas usa como material de partida uma *meso-tetraquisarilporfirina* fluorada pretendida, seguindo-se a reacção de redução para o nível de clorina ou de bacterioclorina, por adição de quantidades optimizadas do agente redutor, *p*-toluenosulfonil-hidrazida (Esquema 2.5). De entre os vários métodos de síntese de hidroporfirinas, descritos na literatura<sup>60-66</sup> e já apresentados no Capítulo 1, decidimos seleccionar, como ponto de partida para estes estudos, o método de redução de macrociclos tetrapirrólicos sem solvente, com diimida, patenteado em 2010<sup>67</sup>, por ser um método simples e ambientalmente mais sustentável, do que o inicialmente descrito por Withlock,<sup>68</sup> uma vez que evita a utilização de piridina ou outros solventes tóxicos.



Esquema 2.5. Estratégia sintética para a síntese de hidroporfirinas do tipo *meso-tetraquisarilbacterioclorinas* e *meso-tetraquisarilclorinas*.

Com base nos resultados apresentados na secção 2.1., no que diz respeito aos coeficientes de partição, para a continuação dos estudos escolhemos a porfirina **7** com grupos sulfonamida ( $\log P_{\text{octanol/água}}=2,53$ ) e a porfirina **16** com grupos éster sulfónico

( $\log P_{\text{octanol/água}}=1,49$ ), com valores de coeficiente de partição octanol/água dentro da gama com valores, sugeridos na literatura, como sendo mais apropriados para que ocorra penetração e acumulação em tecidos cancerígenos.<sup>44,46</sup> Desta forma, para a síntese de hidroporfirinas fluoradas decidimos avaliar a possibilidade de utilizar *p*-toluenossulfonil-hidrazida como fonte de hidrogénio, na ausência de base e de solvente (Esquema 2.6). Trata-se de uma reacção sem solvente, tipo sólido-sólido, em que a hidrazida funde e dissolve a porfirina, obtendo-se no fim um crude acastanhado. Então, numa experiência tipo, misturámos cuidadosamente a porfirina **16** com um excesso de *p*-toluenossulfonil-hidrazida (1:30) até formar um pó homogéneo. Introduzimos o pó num reactor de aço, que se manteve sob vácuo (0.1 bar), durante 1 hora. De seguida, o reactor foi aquecido a 140°C durante 10 minutos. Depois de completa a reacção, o reactor permaneceu fechado até atingir a temperatura ambiente e comprovou-se por espectroscopia de UV-Visível, directamente do meio reaccional a formação da bacterioclorina com elevado grau de pureza (Figura 2.2). O crude foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna, sob atmosfera inerte, usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente, primeiro diclorometano:éter de petróleo (1:3), e posteriormente diclorometano para recolher o produto. Após evaporação do solvente foi possível obter a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxissulfonil)fenil]bacterioclorina **18** com um rendimento de 84%. Desta forma, foi também possível sintetizar a *5,10,15,20-tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoil)fenil]bacterioclorina **19** com um rendimento de 86% (Esquema 2.6). A caracterização das bacterioclorinas sintetizadas neste secção, respectivos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>19</sup>F, espectrometria de Massa e coeficientes de extinção molar encontra-se descrita no Capítulo 4.



Esquema 2.6. Síntese das bacterioclorinas **18** e **19** *via* redução usando a *p*-toluenossulfonil-hidrazida e respectivos rendimentos obtidos.

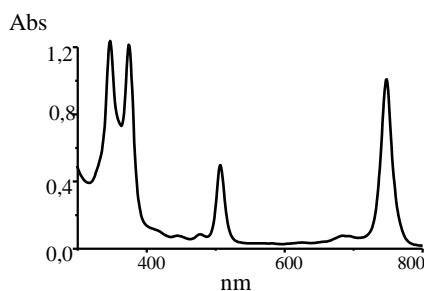


Figura 2.2. Espectro de UV-Visível do crude da bacterioclorina **18**, em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

O mecanismo aceite para a geração de diimida e a redução da porfirina inclui a formação da estrutura *syn* da diimida por clivagem térmica da *p*-toluenossulfonil-hidrazida.<sup>68</sup> O uso de elevado excesso estequiométrico dos precursores de diimida, necessário para que toda a porfirina se transforme em bacterioclorina, atribui-se e ao facto de apenas a diimida com estrutura *syn* permitir a formação do estado de transição cíclico, ou ainda da diimida formada poder sofrer decomposição, dando lugar a hidrazida e nitrogénio. A formação de bacterioclorinas *via* reacção sólido-sólido por degradação da *p*-toluenossulfonil-hidrazida e libertação de nitrogénio foi seguida por termomicroscopia.<sup>69</sup>

Uma vez que tínhamos desenvolvido um método ambientalmente sustentável de redução de porfirinas com o objectivo de obter bacterioclorinas, pretendíamos seguir o mesmo princípio para a síntese de clorinas.<sup>69</sup> Sendo assim, numa experiência tipo, partindo de uma mistura em pó da porfirina **16** e *p*-toluenossulfonil-hidrazida (1:15) colocada num reactor, deixou-se sob vácuo (0.1 bar), durante 1 hora. De seguida, o reactor foi colocado em aquecimento a 140°C durante 15 minutos e deixado arrefecer até atingir a temperatura ambiente (Esquema 2.7-i). O crude obtido foi redissolvido em diclorometano e purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente, primeiro diclorometano:éter de petróleo (1:3), para remover o excesso de hidrazida, e depois diclorometano para recolher o produto. Após evaporação do solvente, o sólido foi dissolvido em DME adicionando-se posteriormente FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1:1), seguido de uma solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), gota-a-gota. A mistura foi deixada em agitação, à temperatura ambiente e o evoluir da reacção foi controlado por espectroscopia de UV-Visível, em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, até desaparecimento da banda de

absorção típica da bacterioclorina (~750 nm), e o aparecimento da banda de absorção a ~650 nm, típica da clorina. (Figura 2.3). Após lavagem com água, o produto foi extraído com diclorometano e purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente diclorometano e recolhendo-se a fracção de cor verde acastanhado, correspondente à 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxis-sulfonil)fenil]clorina **20**, com um rendimento de 63% (Esquema 2.7-ii). Seguindo este procedimento foi também possível obter a 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoil)fenilclorina **21**, com um rendimento de 72% (Esquema 2.7-ii). A caracterização das clorinas sintetizadas neste secção, respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{19}\text{F}$ , espectrometria de Massa e coeficientes de extinção molar, encontra-se descrita no Capítulo 4. Salienta-se ainda a elevada estabilidade, na presença de oxigénio e luz, das bacterioclorinas e clorinas fluoradas sintetizadas com grupos sulfonamida e éster sulfónico na sua estrutura.<sup>70,71</sup>

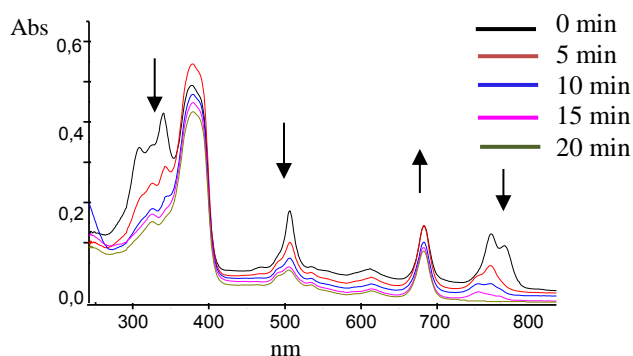
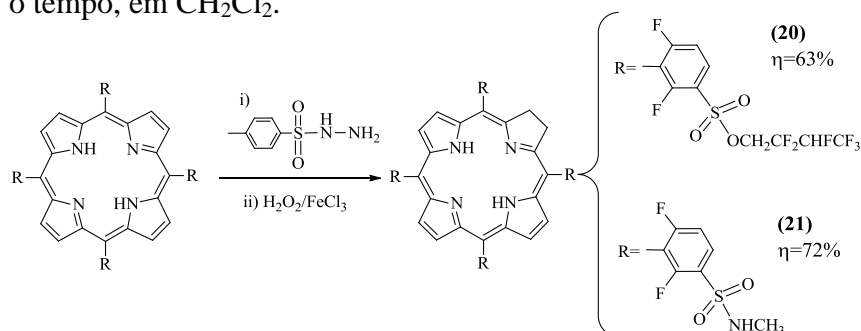


Figura 2.3. Espectros de UV-Visível do evoluir da reacção de síntese da clorina **20** com o tempo, em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



Esquema 2.7. Síntese das clorinas **20** e **21**, via (i) redução com *p*-toluenossulfonil-hidrazida e (ii) posterior oxidação selectiva com  $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ .

As bacterioclorinas **18** e **19** foram obtidas com rendimentos superiores a 80% e as clorinas **20** e **21** com rendimento superior a 60%. Desta forma salientamos que o método de síntese de bacterioclorinas recorrendo a uma reacção sólido-sólido, e de clorinas com peróxido de hidrogénio/cloreto de ferro, permitiu-nos sintetizar de um modo reprodutível, e de uma forma ambientalmente sustentável, estruturas variadas de macrociclos tetrapirrólicos com características ideais para potencial aplicação em terapia fotodinâmica de cancro.

Resumindo, nesta secção, descreveram-se métodos de síntese eficientes de bacterioclorinas e clorinas estáveis, incorporando como substituintes grupos sulfonamida e/ou éster sulfónico, previamente seleccionados a partir dos coeficientes de partição octanol-água ( $\log P_{\text{octanol/água}}=2,74$  e  $\log P_{\text{octanol/água}}=1,49$ , respectivamente). O método de síntese, sem solvente, *via* diimida, revelou ser o apropriado tanto para a redução de porfirinas contendo grupos sulfonamida como éster sulfónico. Esta estratégia sintética permitiu desenvolver um método ambientalmente sustentável de síntese de bacterioclorinas e clorinas. Salientamos que estas novas hidroporfirinas desenvolvidas nesta secção abrem múltiplas potencialidades para a posterior avaliação biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, como potenciais fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica do cancro. Destacamos ainda o composto **21**, seleccionado para prosseguir estudos clínicos, pela empresa Luzitin, após optimização do processo de síntese para utilização em larga escala.

### **2.3. Síntese de conjugados contendo macrociclos tetrapirrólicos**

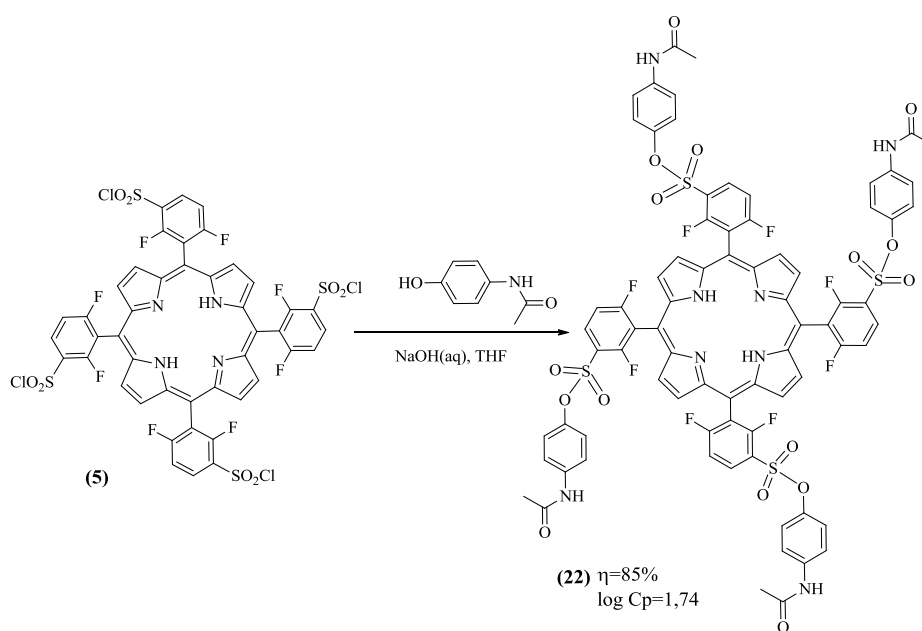
Tal como referido no Capítulo 1, as múltiplas funções desempenhadas pelos macrociclos tetrapirrólicos têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de conjugados resultantes da ligação covalente entre porfirinas e moléculas biológicas. O crescente interesse pela preparação destes conjugados deve-se às vantagens associadas à entrega específica do sensibilizador na célula tumoral/órgão desejado à procura de marcadores fluorescentes para obter informações *in vivo* da sua farmacocinética e/ou função, e ainda na preparação de potenciais pró-drogas onde

poderemos associar a função de fotossensibilizador, por exemplo, com actividade anti-inflamatória ou analgésica de um outro componente libertado no local.

Sendo o objectivo deste trabalho desenvolver novas moléculas derivadas de macrociclos tetrapirrólicos mais específicas para células/órgãos-alvo decidimos estudar estratégias para a ligação deste tipo de moléculas a compostos biológicos, nomeadamente paracetamol e aminoácidos.

### - Conjugados de paracetamol

Existem na literatura algumas evidências de que aquando ou após a realização de tratamentos clínicos utilizando a terapia fotodinâmica (PDT) podem ocorrer manifestações de dor resultantes quer da exposição à luz, quer da ocorrência de processos inflamatórios após a terapia.<sup>72</sup> Assim, com o objectivo de aumentar a especificidade dos macrociclos tetrapirrólicos desenvolvidos neste trabalho, para células cancerígenas e/ou infecciosas e simultaneamente prevenir e/ou diminuir a dor, associada ao tratamento, os estudos prosseguiram com a ligação do paracetamol, conhecido pelas suas propriedades analgésicas,<sup>73,74</sup> à porfirina clorossulfonada **5**, *via* éster sulfónico. Deste modo, a preparação da porfirina **22** seguiu a metodologia anteriormente descrita, na secção 2, para os ésteres sulfónicos (Esquema 2.8). Numa experiência tipo, uma solução básica (NaOH concentrado) de paracetamol (acetamidofenol) em THF, foi adicionada a porfirina clorossulfonada **5** (40:1) dissolvida em THF seco, à temperatura ambiente. O isolamento foi efectuado de acordo com o procedimento descrito para os ésteres sulfónicos (secção 2.1), sendo a purificação efectuada por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente acetato de etilo. Após evaporação do solvente e secagem do sólido obteve-se a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonil)fenil]porfirina **22**, com um rendimento de 85%. A caracterização completa encontra-se descrita no Capítulo 4.



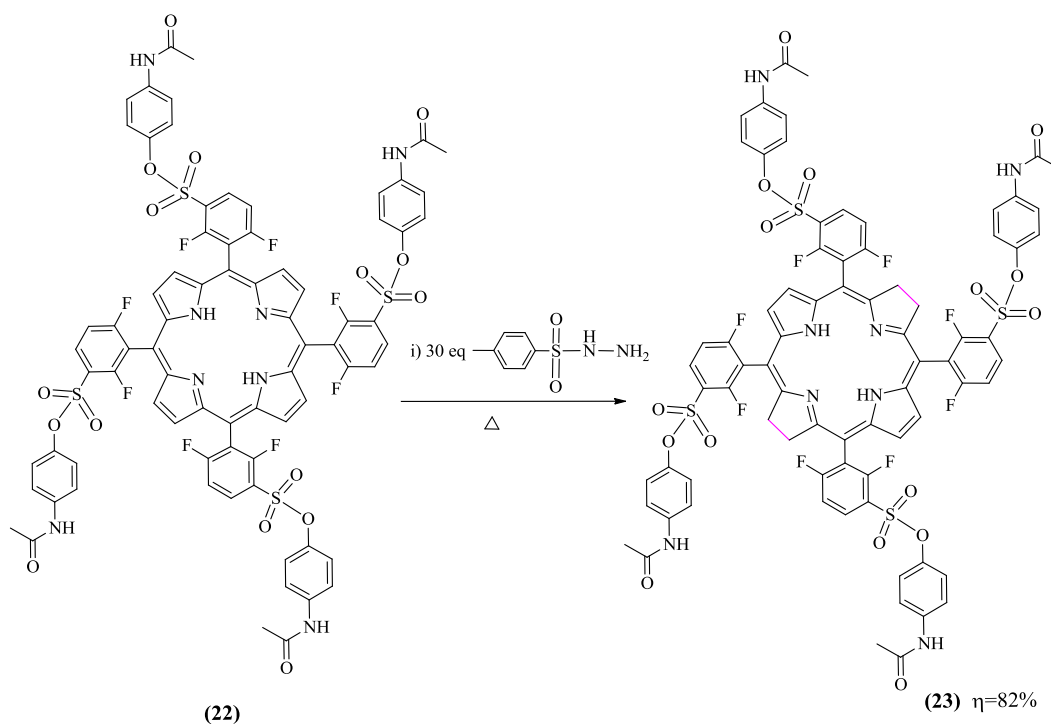
Esquema 2.8. Esquema geral de síntese da porfirina **22**.

Para avaliar o carácter anfifílico da molécula **22** procedeu-se à determinação do cálculo do coeficiente de partição octanol/água, metodologia usada na secção 2.1, tendo-se obtido um valor de  $\log P_{\text{octanol/água}}=1,74$ . Compostos com valores de coeficiente de partição entre 1-2 encontram-se descritos na literatura como sendo apropriados para administração oral e com acentuada afinidade para tecidos cancerígenos.<sup>44,46,47</sup>

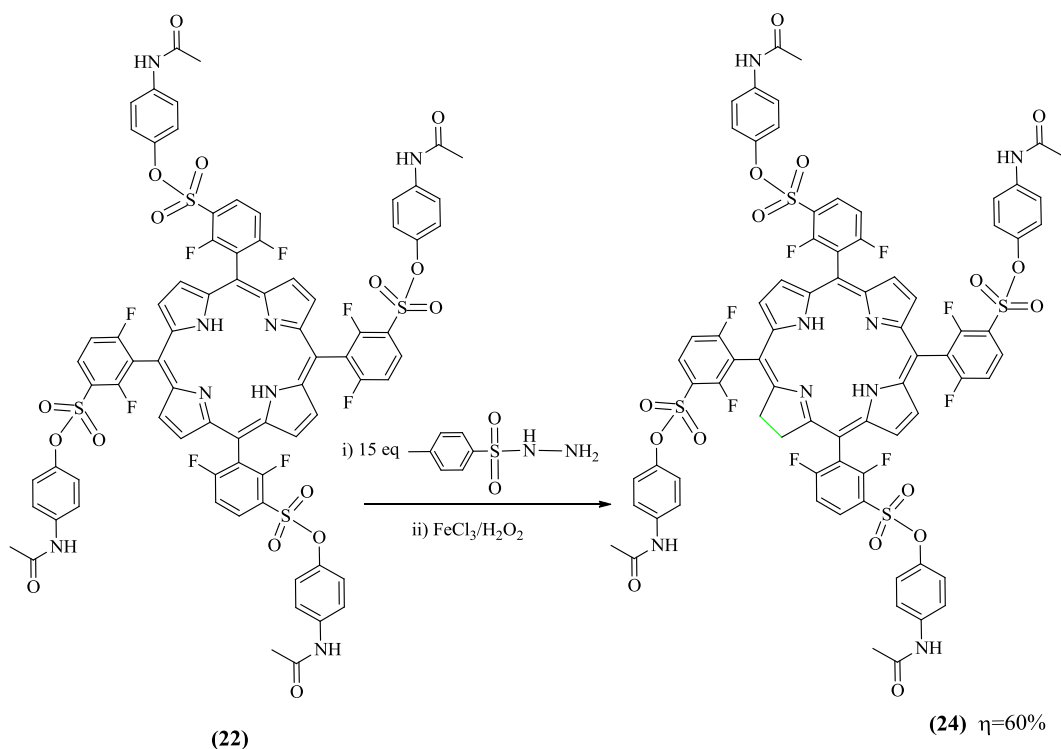
Uma vez que as hidroporfirinas apresentam características ideais para potencial uso em PDT, procedemos à redução da porfirina **22**, com *p*-toluenossulfonyl-hidrazida (sem solvente) para preparação da *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonyl)fenil]bacterioclorina **23** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonyl)fenil]clorina **24**, respectivamente (Esquema 2.9 e 2.10). Tal como anteriormente descrito na secção 2.2, para a síntese da bacterioclorina, utilizou-se uma relação de porfirina:hidrazida de 1:30 e após a síntese, procedeu-se à sua purificação por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente, primeiro diclorometano, e posteriormente acetato de etilo para recolher o produto pretendido, obtendo-se a bacterioclorina **23**, com um rendimento de 82% (Esquema 2.9). Quanto à clorina **24**, utilizou-se uma relação porfirina:hidrazida de 1:15.



Após a redução e obtenção de mistura de clorina e bacterioclorina foi necessário proceder à oxidação da bacterioclorina à clorina usando  $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ . Purificou-se posteriormente o produto em coluna de gel de sílica usando acetato de etilo como eluente, obtendo-se desta forma a clorina **24**, com um rendimento de 60% (Esquema 2.10). Após purificação e isolamento da bacterioclorina **23** e da clorina **24**, foi efectuada a caracterização por RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{19}\text{F}$  e espectrometria de Massa, cujos resultados se encontram descritos no Capítulo 4 e em anexo 1 – Figuras A3, A4, A5 e A6.



Esquema 2.9. Síntese da bacterioclorina **23** via redução com *p*-toluenossulfonil-hidrazida



Esquema 2.10. Síntese da clorina **24**, via i) e posteriormente oxidação selectiva com  $\text{FeCl}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  (via ii).

Foram também determinados os coeficientes de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) desta série de compostos conjugados de paracetamol, a partir dos espectros de absorção no UV-Visível (Figura 2.4) preparando soluções, em etanol, da porfirina **22**, da bacterioclorina **23** e da clorina **24**. Para determinar o  $\epsilon$  para cada uma das bandas de absorção típicas de cada composto, foram efectuadas soluções e respectivas diluições com concentrações entre  $10^{-4}$  e  $10^{-7}$ M. Assim, através da Lei de Beer Lambert ( $A=\epsilon bc$ , em que  $A$  é a absorvância,  $\epsilon$  a absorvidade molar,  $b$  o caminho óptico percorrido pela luz e  $c$  a concentração da solução), foi possível representar gráficos de absorção em função da concentração do composto pretendido e determinar os respectivos valores de  $\epsilon$  através do declive da recta ajustada. Os valores obtidos apresentam-se na Tabela 2.2.

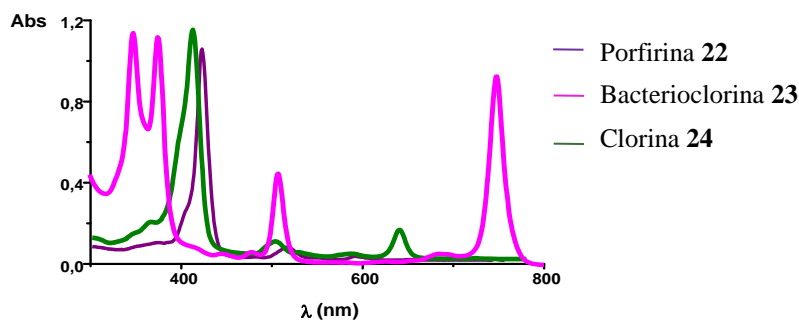


Figura 2.4. Espectros de visível da porfirina **22** e das hidroporfirinas **23** e **24**, em etanol.

Tabela 2.2. Espectros de absorção UV-Visível da porfirina **22**; clorina **23**, bacterioclorina **24**, e respectivos coeficientes de absorvidade molar.

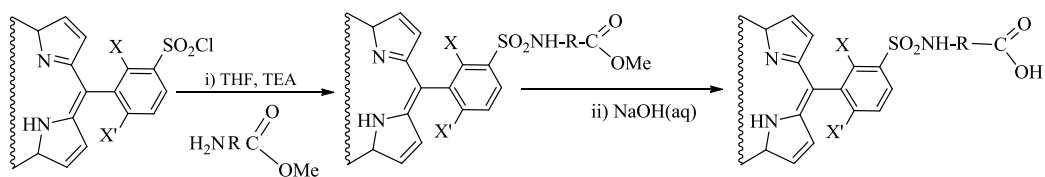
| Macrociclo<br>tetrapirrólico | $\lambda_{\text{absorção máx}} \text{ (nm)}$          |       |                    |                    |                    |                    |
|------------------------------|---|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                              | $\epsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$ |       |                    |                    |                    |                    |
|                              | <b>B</b>  |       | <b>Qx</b>          |                    | <b>Qy</b>          |                    |
| Porfirina <b>22</b>          | 410,0   |       | Qx(0,0)            | Qx(1,0)            | Qy(0,0)            | Qy(1,0)            |
|                              | $2,24 \times 10^5$                                    |       | 504,5              | 534,5              | 582,0              | 640,0              |
| Bacterioclorina <b>23</b>    | Bx  | By    | 504,5              |                    | 746,5              |                    |
|                              | 346,0   | 373,5 | $2,84 \times 10^4$ |                    | $5,21 \times 10^4$ |                    |
| Clorina <b>24</b>            | 405,5   |       | 505,0              | 530,0              | 598,0              | 653,5              |
|                              | $5,74 \times 10^5$                                    |       | $5,23 \times 10^4$ | $1,94 \times 10^3$ | $1,72 \times 10^3$ | $1,17 \times 10^4$ |

Desta forma, foi possível sintetizar uma família de compostos com potencial aplicação como pró-droga e/ou fotossensibilizador para PDT, que se encontram a ser estudados *in vitro* e *in vivo*, no âmbito de um projecto de colaboração com J. Dabrowski, da Universidade de Cracóvia, na Polónia.

### - Conjugados de aminoácidos

Está documentado na literatura que porfirinas conjugadas com aminoácidos apresentam elevada afinidade para células cancerígenas,<sup>75-77</sup> salientando-se ainda que porfirinas catiónicas são capazes de se intercalar em sequências de DNA de células

cancerígenas, facilitando a sua destruição após irradiação com luz.<sup>78</sup> Desta forma, decidimos seleccionar os aminoácidos naturais, glicina e leucina (com propriedades anti-cancerígenas já descritas na literatura<sup>79-83</sup>) para se ligarem covalentemente às porfirinas **4** e **5**, sintetizadas na secção 2. Assim, numa experiência tipo, ao hidrócloro do éster metílico da glicina, previamente dissolvido em THF e trietilamina, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (12:1), em THF seco. A mistura permaneceu em agitação, à temperatura ambiente, durante 12 horas. Seguidamente procedeu-se à lavagem com água e extraiu-se o produto com diclorometano. Purificou-se por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente acetato de etilo/diclorometano (2:1), obtendo-se a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-*N*-((2-metoxi-2-oxoetil)sulfamoil)fenil]porfirina **25**, com um rendimento de 52%. Seguindo o mesmo procedimento foram também sintetizadas as porfirinas *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-(*S*)-*N*-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentil)sulfamoil)fenil]porfirina **26** com um rendimento de 55% e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-*N*-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentilsulfamoil)fenil]porfirina **27** com um rendimento de 68% (Esquema 2.10). Para obter as correspondentes porfirinas com grupos carboxílicos livres procedeu-se à reacção de hidrólise dos ésteres metílicos dos aminoácidos ligados covalentemente às porfirinas. Assim, a porfirina pretendida foi deixada em agitação numa solução de hidróxido de sódio (0,1M), em refluxo, durante 2 horas. Após arrefecimento a solução foi acidificada a pH 1, usando uma solução de ácido clorídrico (1 M). O produto foi extraído com éter etílico e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, obtendo-se desta forma as porfirinas *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-*N*-((carboximetil)sulfamoil)fenil]porfirina **28** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2-fluoro-5-*N*-(1-carboxi-4-metil-2-pentil)-sulfamoil]fenilporfirina **29**, com rendimentos superiores a 80% (Esquema 2.11).



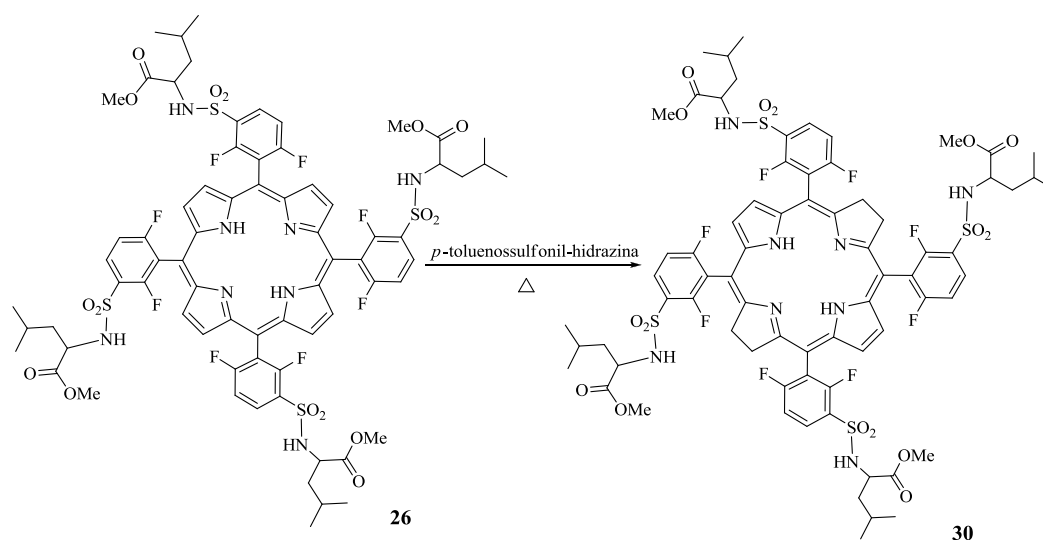
| $\text{—HN—R—C(=O)OMe}$     | Rendimento(%)<br>i)  | $\text{LogP}_{\text{octanol/água}}$ |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| (25) $\text{X = H, X' = F}$ | 52                   | 1,66                                |
| (26) $\text{X = H, X' = F}$ | 55                   | 1,87                                |
| (27) $\text{X, X' = F}$     | 68                   | 1,95                                |
| $\text{—HN—R—C(=O)OH}$      | Rendimento(%)<br>ii) | $\text{LogP}_{\text{octanol/água}}$ |
| (28) $\text{X = H, X' = F}$ | 80                   | -0,32                               |
| (29) $\text{X = H, X' = F}$ | 82                   | -0,18                               |

Esquema 2.11. Esquema geral de síntese dos conjugados de aminoácidos (passo i), sua hidrólise (passo ii) e respectivos rendimentos e coeficientes de partição (octanol/água).

Uma vez mais, seguiu-se a estratégia da determinação do coeficiente de partição octanol/água ( $\text{logP}_{\text{octanol/água}}$ ) para obter informações acerca da lipofilicidade deste tipo de compostos. Deste modo, seguindo o procedimento descrito na secção 2.1 determinaram-se os  $\text{logP}_{\text{octanol/água}}$ , por fluorescência, obtendo-se valores entre -0,18 a 1,95 (Esquema 2.10). Pela análise dos valores calculados, as porfirinas com grupos carboxilo livres, **28** e **29**, apresentam coeficientes de partição com valor negativo, -0,32 e -0,18, respectivamente, indicando que estes são bastante hidrofílicos, em geral

considerados apropriados para administração intravenosa, mas demasiado baixos para permitir a permeação através da membrana celular.<sup>84</sup> Por outro lado, as porfirinas contendo grupos éster metílicos de aminoácido (**25-27**) apresentam coeficientes de partição positivos, 1,66; 1,87 e 1,95 respectivamente, indicando por sua vez que estes serão mais lipofílicos, possibilitando a sua administração oral e penetração e acumulação em tecidos cancerígenos e ainda ao nível do sistema nervoso central.<sup>43,44,48,51</sup>

Para aumentar a potencialidade destes conjugados para uso em PDT, decidimos sintetizar a respectiva bacterioclorina a partir da porfirina **27**, a porfirina mais lipofílica ( $\log P_{\text{octanol/água}}=1,95$ ), da família de porfirinas sintetizadas com grupos aminoácidos conjugados. Deste modo seguiu-se o procedimento descrito na secção 2.2 para a reacção de redução da porfirina **27** com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (1:30). O crude da mistura reaccional obtida foi purificada em coluna de gel de sílica, usando como eluente, primeiro diclorometano para retirar o excesso de hidrazida e de seguida uma mistura de diclorometano:acetato de etilo (1:2) para recolher o produto desejado. Após evaporação do solvente obteve-se a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-*N*-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentilsulfamoíl)fenil)bacterioclorina **30**, com um rendimento de 80% (Esquema 2.12).



Esquema 2.12. Síntese da bacterioclorina **30**.

## 2.4. Conclusão

O estudo da síntese de porfirinas, resultantes da condensação de pirrol com aldeídos, num só passo, com substituintes nas posições *meso* e posições  $\beta$  livres, teve início com Rothemund, em 1935<sup>85</sup>. Desde então existem múltiplas versões mais recentes, nomeadamente o método de Adler<sup>86,87</sup> e o do nitrobenzeno<sup>88</sup>, no entanto o método de Adler apresenta como desvantagens os baixos rendimentos obtidos quando os aldeídos incorporam substituintes nas posições *orto* e ainda a contaminação com, pelo menos, 10% das respectivas clorinas. Com o desenvolvimento do método do nitrobenzeno estas limitações foram ultrapassadas e por isso foi este o método seleccionado para preparar as *meso*-arilporfirina fluoradas utilizadas como precursoras dos novos compostos desenvolvidos neste trabalho.

Após preparação das *meso*-tetraquisarilporfirinas fluoradas, 5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirina **1** e 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluorofenil)porfirina **2**, (com rendimentos de 20% e 11%, respectivamente) e no sentido de modelar a sua anfifilicidade para potencial aplicação em meios biológicos, foram apresentados estudos de optimização da sua derivatização com grupos éster sulfónico e sulfonamida. Em primeiro lugar procedeu-se à optimização da reacção de clorossulfonação tendo-se concluído que a temperatura da reacção era um aspecto crítico para induzir a formação do tetraclorossulfonato, podendo concluir-se que no caso da porfirina **1**, que contém apenas um átomo de flúor nos fenilos das posições *meso* da porfirina, a melhor temperatura é a de 60°C e que, no caso de dois átomos de flúor, as melhores condições envolviam temperaturas 100°C, obtendo-se rendimentos acima dos 90% para os respectivos clorossulfonatos. Contudo, salienta-se que a derivatização das porfirinas com grupos éster sulfónico ou sulfonamidas foi efectuada sem se proceder ao isolamento do clorossulfonato de partida e que após reacção com os nucleófilos desejados, álcoois e aminas, respectivamente, obtiveram-se novas porfirinas com carácter anfifílico (porfirinas **6-17**), com rendimentos superiores 70%.

Para avaliar a sua biodisponibilidade foram determinados os coeficientes de partição octanol/água ( $\log P_{\text{octanol/água}}$ ) dos compostos sintetizados, observando-se uma forte influência, tanto no número de átomos de flúor, como do tipo de grupo

substituinte. Constatou-se também que em compostos com o mesmo tipo de grupos funcionais o aumento do número de átomos de flúor contribui sempre para um aumento do  $\log P_{\text{octanol/água}}$ . Por outro lado, os compostos com grupos sulfonamida na sua constituição apresentam um  $\log P_{\text{octanol/água}}$  superior ao das porfirinas com grupos éster sulfónicos na sua estrutura. Com os novos compostos desenvolvidos neste trabalho obtivemos valores de  $\log P_{\text{octanol/água}}$  compreendidos entre 0,31-2,74, o que nos permite concluir que poderão vir a ser seleccionados para múltiplas aplicações biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluindo diferentes vias de administração, consoante os fins pretendidos.

No sentido de desviar o valor da absorção dos compostos para a designada "janela terapêutica" foram descritos métodos eficientes de síntese de bacterioclorinas e clorinas estáveis, incorporando como substituintes grupos sulfonamida e/ou éster sulfónico. Os coeficientes de partição octanol-água obtidos para estes compostos aparentam ser adequados para potencial administração intravenosa ou transdérmica e facilitar a penetração e acumulação nos tecidos cancerígenos<sup>44,46</sup> ( $\log P_{\text{octanol/água}}=2,74$  e  $\log P_{\text{octanol/água}}=1,49$ , respectivamente). O método de síntese, sem solvente, de bacterioclorinas com diimida, revelou ser apropriado tanto para a redução de porfirinas contendo grupos sulfonamida, como também éster sulfónico, permitindo obter as respectivas bacterioclorinas (*5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil]bacterioclorina **18** e a *5,10,15,20-tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metil sulfamoíl)fenil]bacterioclorina **19**), com rendimentos de produto isolado superiores a 80%. Esta estratégia sintética também permitiu desenvolver um método ambientalmente sustentável de síntese de clorinas, que consistiu na redução da porfirina a uma mistura de bacterioclorina e clorina, seguido de oxidação com Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à correspondente clorina. Esta metodologia é uma boa alternativa à oxidação das bacterioclorinas com quinonas, por estas serem mais caras e de difícil separação dos produtos finais, permitindo obter a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil]clorina **20** e a *5,10,15,20-tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoíl)fenilclorina **21**, com rendimentos entre 60-70%. Desta forma, concluímos que as novas hidroporfirinas desenvolvidas nesta secção abrem múltiplas potencialidades para a



posterior avaliação biológica, tanto *in vitro* como *in vivo* como potenciais fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica do cancro.

Com o intuito de modelar a biodistribuição e também eventualmente poder contribuir para uma diminuição da dor/inflamação aquando do tratamento com PDT, foram sintetizados também os conjugados derivados de porfirinas com grupos aminoácidos e acetamidofenol. Uma vez mais as estratégias sintéticas seleccionadas no trabalho permitiram a sua eficiente síntese com rendimentos de produto isolado entre 50 e 85% e  $\log P_{\text{octanol-água}}$  entre -0,18 e 1,95. Foram também sintetizadas as hidroporfirinas, bacterioclorina e clorina do conjugado de acetamidofenol e ainda a bacterioclorina com grupos aminoácido com rendimentos entre 60-80%.

Todos os novos compostos sintetizados neste capítulo estão inseridos no âmbito de projectos de colaboração com a empresa Luzitin, Bluepharma e com o grupo de J. Drabrowski na Polónia, onde estão a ser avaliados *in vitro* e *in vivo* para potencial desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para terapia do cancro utilizando a PDT.

## Bibliografia

- <sup>1</sup> Dolbier W. R. Jr, *J. Fluorine Chem.*, **2005**, 126, 157.
- <sup>2</sup> Biffinger J. C., Kim H. W., DiMugno S. G., *Chem. Bio. Chem.*, **2004**, 5, 622.
- <sup>3</sup> Shimizu M., Hiyama T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 214.
- <sup>4</sup> Bohm H.-J., Banner D., Bendels S., Kansy M., Kuhn B., Muller K., Obst-Sander U., Stahl M., *Chem. Bio. Chem.*, **2004**, 5, 637.
- <sup>5</sup> Rothmund P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625.
- <sup>6</sup> Adler A. D., Sklar L., Longo F. R., Finarell J. D., Finarell M. G., *J. Heterocycl. Chem.*, **1968**, 5, 669.
- <sup>7</sup> Wagner R. W., Lawrence D. S., Lindsey J. S., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3069.
- <sup>8</sup> Vandermade A. W., Hoppenbrouwer E. J. H., Nolte R. J. M., Drenth W., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1988**, 107, 15.
- <sup>9</sup> Johnstone R. A. W., Nunes M. L. P. G., Pereira M. M., Gonsalves A. M. D. R., Serra A. C., *Heterocycles*, **1996**, 7, 1423.
- <sup>10</sup> Lindsey J. S., Hsu H. C., Schreiman I. C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969.
- <sup>11</sup> Pereira M. M., *Estudos de Ativação do Peróxido de Hidrogénio como Oxidante – Catálise por Metaloporfirinas e Preparação de Ácidos Peroxicarboxílicos in situ*, Dissertação de Doutoramento, Universidade de Coimbra, Coimbra, **1991**.
- <sup>12</sup> Monteiro C. J. P., Pereira M. M., Pinto S. M. A., Simões A. V. C., Sá G. F. F., Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Wyatt M. F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 5132.
- <sup>13</sup> Grancho J. C. P., Pereira M. M., Miguel M. G., Gonsalves A. M. R., Burrows H. D., *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, 249.
- <sup>14</sup> Lindsey J. S., Wagner R. W., *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 828.
- <sup>15</sup> Josefsen L. B., Boyle R. W., *Theranostics*, **2012**, 2, 916.
- <sup>16</sup> Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 340.
- <sup>17</sup> Nyman E. S., Hynninen P. H., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, 73, 1.
- <sup>18</sup> Ogawa K., Kobuke Y., *BioMed Research International*, **2013**, 2013, 1.
- <sup>19</sup> Dabrowski J. M., Pereira M. M., Arnaut L. G., Monteiro C. J. P., Peixoto A. F., Karocki A., Urbanska K., Stochel G., *Photochem. Photobiol.*, **2007**, 83, 897.

- 
- <sup>20</sup> Gonsalves A. M. A. R., Johnstone R. A. W., Pereira M. M., de SantAna A. M. P., Serra A. C., Sobral A. J. F. N., Stokes P. A., *Heterocycles*, **1996**, 43, 829.
- <sup>21</sup> Sobral A. J. F. N., Eléouet S., Rousset N., Gonsalves A. M. A. R., Meur O., Bourré L. Patrice T., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2002**, 6, 456.
- <sup>22</sup> Simões A. V. C., *Modelação Estrutural e Síntese de Meso-tetraquisbacterioclorinas Fluoradas*, Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, **2008**.
- <sup>23</sup> Cremlyn R. J., *Chlorosulfonic Acid - A Versatile Reagent*, University of Hertfordshire, **2002**.
- <sup>24</sup> Silva E., Pereira M. M., Burrows H. D., Azenha M. E., Sarakha M., Bolte M., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 200.
- <sup>25</sup> Pereira M. M., Arnaut L. G.; Formosinho S., Monteiro C. J. P., WO/2006/053707, **2006**.
- <sup>26</sup> Sternberg E. D, Dolphin D., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151.
- <sup>27</sup> Pandey R. K., Goswami L. N., Chen Y., Gryshuk A., Missert J. R., Oseroff A., Dougherty T. J., *Laser Surg. Med.*, **2006**, 38, 445.
- <sup>28</sup> Chen Y., Li G., Pandey R. K., *Curr. Org. Chem.*, **2004**, 8, 1105.
- <sup>29</sup> Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Mendonça A. F., Pegado I. N., Duarte R., Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 3878.
- <sup>30</sup> Phillips D., *Pure Appl. Chem.*, **2011**, 83, 733.
- <sup>31</sup> Borbas K. E., Chandrashaker V., Muthiah C., Kee H. L., Holten D., Lindsey J. S., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3145.
- <sup>32</sup> Sehgal I., Sibrian-Vazquez M., Vicente M. G. H., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 6014.
- <sup>33</sup> Pineiro M., Pereira M. M., Gonsalves A.M. A. R., Arnaut L. G , Formosinho S. J., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2001**, 138, 147.
- <sup>34</sup> Wiehe A., simonenko E. J., Senge M. O., Roder B., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 758.
- <sup>35</sup> Hansch C., Fujita T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1616.
- <sup>36</sup> Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 46, 3.
- <sup>37</sup> Collander R., *Acta Chem. Scand.*, **1951**, 5, 774.
- <sup>38</sup> Scott D. C., Clymer J. W., *Pharma. Technol.*, **2002**, 30.

- <sup>39</sup> Danielsson L.-G., Zhang Y.-H., *Trac-Trend Anal. Chem.*, **1996**, 15, 188.
- <sup>40</sup> Clemente G., *Saúde & Tecnologia*, **2011**, 5, 29.
- <sup>41</sup> Engelmann F. M., Rocha S. V. O., Toma H. E., Araki K., Baptista M. S., *Intern. J. Pharm.*, **2007**, 329, 12.
- <sup>42</sup> Rutkowska E., Pajak K., *Acta Pol. Pharm.*, **2013**, 70, 3.
- <sup>43</sup> Mitragotri S., *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96, 1832.
- <sup>44</sup> Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, 23, 3.
- <sup>45</sup> Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J., *J. Comb. Chem.*, **1999**, 1, 55.
- <sup>46</sup> Lombardo F., Shalaeva M. Y., Tupper K. A., Gao F., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2490.
- <sup>47</sup> Pereira D. G., *Quim. Nova*, **2007**, 30, 171.
- <sup>48</sup> Amidon G. L., Lennernäs H., Shah V. P., Crison J.R., *Pharma Res.*, **1995**, 12, 413.
- <sup>49</sup> Hawkins G. S., *J. Pharm. Sci.*, **1986**, 75, 378.
- <sup>50</sup> Guy R. H., Hadgraft J., *Pharma. Res*, **1988**, 5, 753.
- <sup>51</sup> Pajouhesh H., Lenz G. R., *Neurotherapeutics*, **2005**, 2, 541.
- <sup>52</sup> Pineiro M., Gonsalves A. M. A. R., Pereira M. M., Formosinho S. J., Arnaut L. G., *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 3787.
- <sup>53</sup> Monteiro C. J. P., Pina J., Pereira M. M., Arnaut L. G., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2012**, 11, 1233.
- <sup>54</sup> Dabrowski J. M., Urbanska K., Arnaut L. G., Pereira M., Abreu A. R., Sérgio S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2011**, 6, 465.
- <sup>55</sup> Dabrowski J. M., Krzykawska M., Arnaut L. G., Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões S., Urbanska S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2011**, 6, 1715.
- <sup>56</sup> Silva E. F. F., Serpa C., Dabrowski J. M., Monteiro C. J. P., Formosinho S. J., Stochel G., Urbanska K., Simões S., Pereira M. M., Arnaut L. G., *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 9273.
- <sup>57</sup> Dabrowski J. M., Arnaut L. G., Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Urbanska K., Simões S., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2010**, 5, 1770.
- <sup>58</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simoes A. V. C., Pinto S. M. A., Abreu A. R., Sá G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L. B., Dabrowski J. M., Formosinho S. J., Simoes S., Arnaut L. G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545.

- 
- <sup>59</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões A. V. C., Pinto S. M. A., Arnaut L. G., Sá G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L., Simões S., Formosinho S., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 567.
- <sup>60</sup> Liu C., Dobhal M. P., Ethirajan M., Missert J. R., Pandey R. K., Balasubramanian S., Sukumaran D. K., Zhang M., Kadish K. M., Ohkubo K., Fukuzumi S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14311.
- <sup>61</sup> Silva A. M. G., Tomé A. C., Neves M., Silva A. M. S., Cavaleiro J. A. S., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 2306.
- <sup>62</sup> Tomé A. C., Neves M., Cavaleiro J. A. S., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 408.
- <sup>63</sup> Pereira N. A., Fonseca S. M., Serra A. C., Pinho e Melo T. M. V. D., Burrows H. D., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3970.
- <sup>64</sup> Galezowski M., Gryko D. T., *Curr. Org. Chem.*, **2007**, 11, 1310.
- <sup>65</sup> Kraymer M., Ptaszek M., Kim H. J., Meneely K. R., Fan D. Z., Secor K., Lindsey J. S., *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 1016.
- <sup>66</sup> Bonnett R., White R. D., Winfield U. J., Berenbaum M. C., *Biochem J.*, **1989**, 261, 277.
- <sup>67</sup> Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Pereira M. M., Stochel G., Urbanska K., WO2010/047611-A1, **2010**.
- <sup>68</sup> Whitlock Jr H. W., Hanauer R., Oester M. Y., Bower B. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 7485.
- <sup>69</sup> Pereira M. M., Abreu A. R., Goncalves N. P. F., Calvete M. J. F., Simões A. V. C., Monteiro C. J. P., Arnaut L. G., Eusébio M. E., Canotilho J., *Green Chem.*, **2012**, 14, 1666.
- <sup>70</sup> Dabrowski J. M., Arnaut L. G., Pereira M. M., Urbanska K., Stochel G., *Med. Chem. Comm.*, **2012**, 3, 502.
- <sup>71</sup> Silva E. F., Schaberle F. A., Monteiro C. J., Dąbrowski J. M., Arnaut L. G., *Photochem Photobiol Sci.*, **2013**, 12, 1187.
- <sup>72</sup> Wiegell S. R., Stender I. -M., Na R., Wulf H. C., *Arch. Dermatol.*, **2003**, 139, 1173.
- <sup>73</sup> Graham G., Davies M. J., Day R. O., Mohamudally A., Scott K. F., *Inflammopharmacol.*, **2013**, 21, 201.

- 
- <sup>74</sup> *Some Chemicals that Cause Tumours of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances*, IARC Monographs, Vol. 73, page 402.
- <sup>75</sup> Wang H. M., Jiang J. Q., Xiao J. H., Gao R. L., Lin F. Y., Liu X. Y., *Chem. Biol. Interac.*, **2008**, 172, 154.
- <sup>76</sup> Serra V. V., Zamarrón A., Faustino M. A. F., Cruz M. C. I., Blázquez A., Rodrigues J. M. M., Neves M. G. P. M. S., Cavaleiro J. A. S., Juarranz A., Rodríguez F. S., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 6170.
- <sup>77</sup> Ressurreição A. S. M., Pineiro M., Arnaut L. G., Gonsalves A. M. A. R., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, 11, 50.
- <sup>78</sup> Hirakawa K., Kawanishi S., Segawa H., Hirano T., *J. Porphyrins Phthalocyanine*, **2006**, 10, 1285.
- <sup>79</sup> Jain M., Nilsson R., Sonia S., Nikhil M., Toshimori K., Souza A. L., Kafri R., Kirschner W. M., Clish C. B., Mootha V. K., *Science*, **2012**, 25; 1040.
- <sup>80</sup> Yamashina S., Ikejima K., Rusyn I., Sato N., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2007**, 22, Suppl. 1; S62.
- <sup>81</sup> Ghasemi J., Saaidpour S., *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 604, 99.
- <sup>82</sup> Wang Q., Bailey C. G., Tiffen J., Thoeng A., Minhas V., Lehman M. L., Hendy S. C., Buchanan G., Nelson C. C., Rasko J. E. J., Holst J., *Cancer Res.*, **2011**, 71, 7525.
- <sup>83</sup> Tee A. R., *J. Natl Cancer Inst*, **2013**, doi:10.1093/jnci/djt252.
- <sup>84</sup> Ano R., Kimura Y., Urakami M., Shima M., Matsuno R., Ueno T., Akamatsu M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 249.
- <sup>85</sup> Rothmund P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, 58, 625
- <sup>86</sup> Adler A. D., Skalar L., Longo F. R., Finarelli J. D., Finarelli M., *J. Heterocycl. Chem.*, **1968**, 5, 669.
- <sup>87</sup> Adler A. D., Longo F. R., Finarelli J. D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- <sup>88</sup> Gonsalves A. M. D. R., Johnstone R. A. W., Pereira M. M., deSantAna A. M. P., Serra A. C., Sobral A. J. F. N., Stocks P. A., *Heterocycles*, **1996**, 43, 829.

# **Capítulo 3**

**Síntese de porfirinas marcadas com flúor-18 para desenvolvimento de potenciais marcadores para tomografia por emissão de positrões**

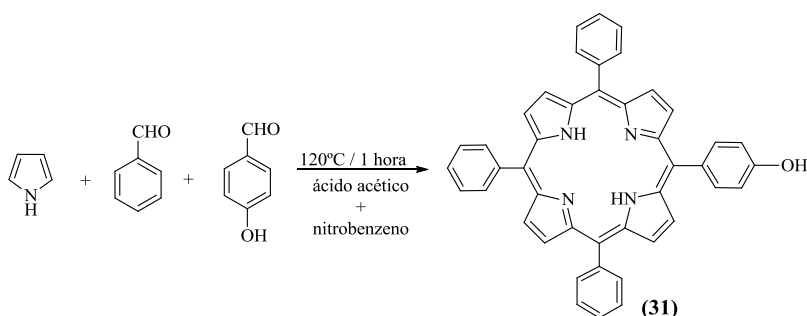




### 3.1. Síntese de porfirinas precursoras da reacção de fluoração (reacção “fria”)

Tal como referido no Capítulo 1, as moléculas fluoradas são actualmente a base de muitos APIs, devido à sua biocompatibilidade conferindo, em muitos casos, maior especificidade para os seus alvos moleculares. Assim, no sentido de prosseguir com o objectivo fulcral desta tese que consistia na marcação radioactiva de macrociclos tetrapirrólicos com flúor-18 e sua avaliação para potencial aplicação como novos agentes de contraste, recorrendo à técnica de PET, em primeiro lugar optimizámos a síntese laboratorial de macrociclos tetrapirrólicos não-simétricos, contendo um bom grupo abandonante, em condições “frias”, para seguidamente se proceder à optimização da reacção de fluoração com um agente fluorante não radioactivo. Após efectuada esta optimização o processo de síntese foi transposto para o laboratório do ICNAS (Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas à Saúde) onde foi efectuada a optimização do processo de marcação com flúor radioactivo (flúor-18), *via* substituição nucleofílica.

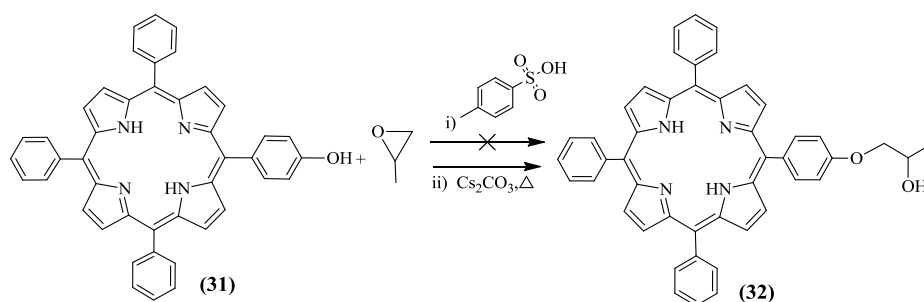
Para evitar marcação não controlada com flúor-18, os estudos iniciaram-se com a síntese de uma molécula contendo apenas um centro nucleofílico. Para tal, e tendo em conta a fundamentação já descrita no Capítulo 2, recorreu-se ao método do nitrobenzeno. Assim, colocaram-se os aldeídos 4-hidroxibenzaldeído e benzaldeído, numa relação de 1:3, numa mistura de ácido acético/nitrobenzeno (2:1). Posteriormente foi adicionado pirrol e a mistura permaneceu a 120°C durante 1 hora (Esquema 3.1). Ao contrário do que acontece com a maioria das porfirinas simétricas, esta mistura de compostos não precipita directamente no meio reaccional, sendo necessário proceder à evaporação do ácido acético e nitrobenzeno, através de destilação a pressão reduzida ( $P=10^{-1}$ - $10^{-2}$ bar). Seguidamente, redissolveu-se o crude obtido em diclorometano e efectuou-se a respectiva purificação com recurso a coluna cromatográfica de gel de sílica, usando inicialmente como eluente uma mistura de éter de petróleo:diclorometano (1:1), e posteriormente apenas diclorometano. Após evaporação do solvente e secagem sob vácuo, obteve-se a 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **31**, com um rendimento de 9%, o que está em concordância com o descrito na literatura para este tipo de compostos.<sup>1</sup>



Esquema 3.1. Síntese da porfirina **31**, segundo o método do nitrobenzeno.

Uma vez sintetizada a porfirina funcionalizada com apenas um grupo hidroxilo, era importante ter um bom grupo abandonante na sua estrutura para posteriormente otimizar a reacção de fluoração, *via* substituição nucleofílica. No sentido de promover a activação do grupo hidroxilo, fizemos reagir a porfirina **31**, dissolvida em DMF, com 1,2-epoxipropano (1:2), na presença de ácido *p*-toluenossulfónico (Esquema 3.2), à temperatura ambiente, durante 24 horas. Não se observou qualquer transformação, por tlc. A experiência foi repetida subindo a temperatura para 60°C, e após 24 horas, observou-se a existência exclusiva de material de partida.

Posteriormente decidimos proceder à reacção de abertura do epóxido com catálise básica. Assim, numa experiência tipo, colocou-se em agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente, a porfirina hidroxilada **31**, dissolvida em DMF seco, e carbonato de céσιο (1:4). De seguida, adicionou-se 4 equivalentes de epoxipropano e a reacção permaneceu à temperatura ambiente durante 48 horas. Após análise por tlc não se observou qualquer transformação. Aumentou-se a temperatura da reacção para 60°C e após 24 horas observou-se finalmente a formação de produto. Este foi lavado (2x) com água e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e após cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente diclorometano obteve-se a 5-[4-(propoxi-2-ol)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina **32**, com um rendimento de 67%, cuja caracterização se encontra completamente descrita no Capítulo 4.

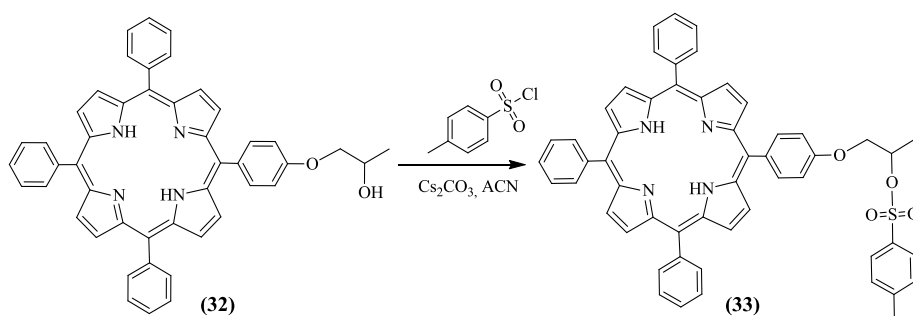


Esquema 3.2. Síntese de mono-hidroxiporfirinas por duas vias.

Prosseguimos com a estratégia de ligar um bom grupo abandonante, à porfirina **32** para posteriormente se proceder à fluoração *via* substituição nucleofílica. Salienta-se que na literatura, existem exemplos do uso de halogénios<sup>2,3</sup>, triflatos<sup>4</sup>, mesilatos<sup>2,3,5</sup> e tosilatos<sup>2,3,6,7,8</sup> como bons grupos abandonantes para efectuar reacções de substituição nucleofílica. Desta forma, por facilidade de isolamento e manipulação, decidimos adoptar a metodologia usando compostos com grupos tosilo na sua constituição (Esquema 3.3). Começámos por dissolver a porfirina hidroxilada **32**, em diclorometano e trietilamina seca, adicionando seguidamente cloreto de tosilo (1:2.5). Deixou-se reagir 48 horas, à temperatura ambiente não se observando, por tlc, qualquer transformação. Alterámos o método sintético dissolvendo a porfirina **32** em piridina seca, à temperatura de 0°C. Adicionou-se em seguida o cloreto de tosilo (1:6), a mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente durante 72h sem que o material de partida fosse completamente consumido. O crude foi lavado com uma solução aquosa de ácido clorídrico, água e por fim com uma solução salina. Posteriormente, o produto foi purificado em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano:éter de petróleo:acetato de etilo (1:3:0,5) obtendo-se a 5-[4-(propoxi-2-(4-metilbenzenossulfonato))fenil]-10,15,20-trifenilporfirina **33**, com um rendimento de 20%.

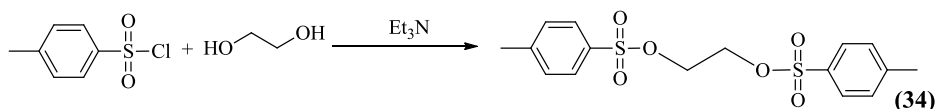
Para tentar melhorar o rendimento da reacção e evitar a utilização de piridina na reacção, problemas de isolamento e toxicidade a ela associados, repetiu-se a reacção utilizando carbonato de cézio.<sup>9</sup> Desta forma, colocou-se a porfirina hidroxilada **32**, cloreto de tosilo e carbonato de cézio (1:20:5), em acetonitrilo, deixando-se em refluxo, sob agitação, durante 48h. No entanto, por análise de tlc, observou-se maioritariamente

a presença de material de partida. Deixou-se nas mesmas condições durante mais 24 horas e desta vez, ao fazer a análise por tlc observou-se formação do produto pretendido e ainda a presença de algum material de partida. A reacção permaneceu um total de 96 horas, mas sem grandes alterações. Após a reacção, o solvente foi evaporado e a mistura redissolvida em diclorometano, lavada com água, uma solução de hidrogenocarbonato de sódio e solução salina de cloreto de sódio. Após purificação por coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano e em seguida uma mistura diclorometano:éter de petróleo:acetato de etilo (1:3:0,5), foi possível obter a porfirina **33**, com um rendimento de apenas 25% (Esquema 3.3), cuja caracterização completa se encontra descrita no Capítulo 4.

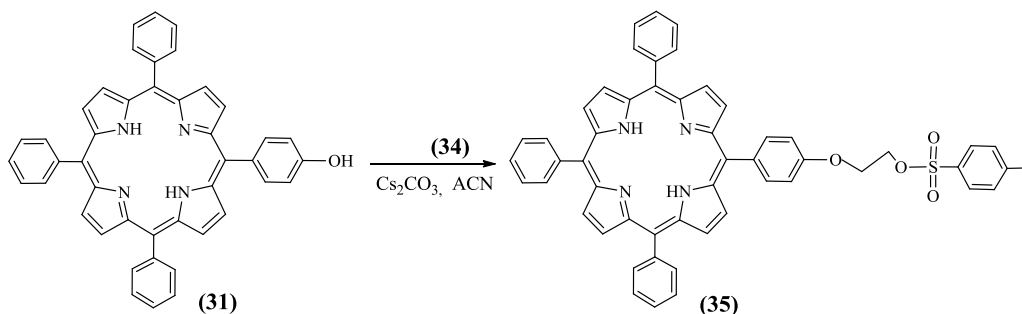


Esquema 3.3. Estratégia sintética de síntese do precursor **33**.

Atribuindo o baixo rendimento ao facto do grupo tosilo se encontrar ligado a um átomo de carbono secundário, decidiu-se alterar a estratégia sintética e testar a possibilidade de se utilizar um diol di-substituído. Deste modo, a uma solução de etilenoglicol em trietilamina (1:1,2) e diclorometano seco, adicionou-se, lentamente, cloreto de tosilo (1:0,25). A reacção permaneceu em agitação durante 24 horas, sendo posteriormente adicionado etanolamina para reagir com o excesso de cloreto de tosilo. A mistura resultante foi lavada com água e a fase orgânica foi extraída com diclorometano. Esta fase foi lavada com uma solução de HCl (1M) e uma solução salina, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada a pressão reduzida. A recristalização do produto utilizando etanol permitiu obter um sólido branco, que após isolamento e caracterização se identificou como 1,2-diil bis(4-metilbenzenossulfonato)etano **34**, com um rendimento de 48% (Esquema 3.4).

Esquema 3.4. Síntese do derivado **34** a partir de cloreto de tosilo e etilenoglicol.

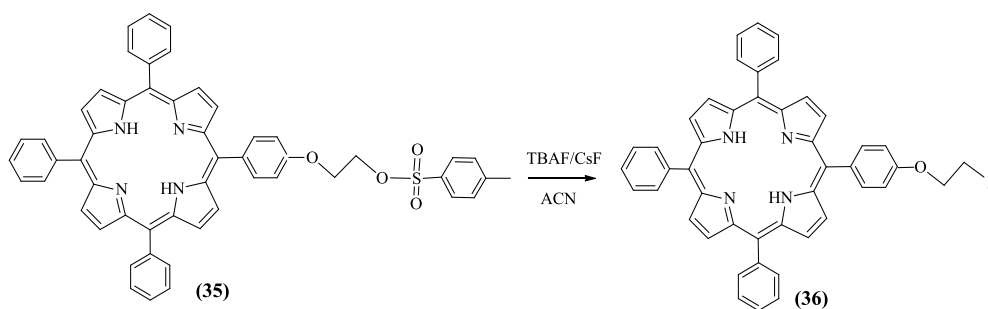
Tendo em vista a preparação da porfirina contendo um grupo tosilo na sua constituição, os estudos prosseguiram com a optimização da reacção da porfirina hidroxilada **31** com o derivado **34** (Esquema 3.5). Começámos por dissolver a porfirina **31** em acetonitrilo e adicionar um excesso de derivado **34** e carbonato de céσιο (1:20:5). A mistura reaccional permaneceu à temperatura de refluxo durante 72 horas. O produto foi evaporado e redissolvido em diclorometano, lavando-se sucessivamente com água e uma solução de bicarbonato de sódio e secando-se por fim com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e evaporou-se o excesso de solvente e a purificação foi efectuada com coluna de gel de sílica usando como eluente, diclorometano:éter de petróleo (1:1) para remover o excesso de derivado **34**, e seguidamente diclorometano para recolher o produto pretendido. Obteve-se a porfirina **35**, com um rendimento de 45%, cuja caracterização completa se encontra descrita no Capítulo 4 e no Anexo 1- Figura A7 e A8).

Esquema 3.5. Estratégia de síntese da porfirina **35**.

Salienta-se que usando estas condições a purificação do composto tornou-se bastante morosa, no que diz respeito à remoção do largo excesso de derivado **34**. Deste modo, decidimos optimizar as condições da reacção, usando metade do excesso usado anteriormente de derivado **34** em relação à porfirina **31** (10:1) e assim, seguindo o procedimento anteriormente descrito, foi possível obter a 5-[4-(2-(4-metil

benzenossulfonato))etoxifenil]-10,15,20-trifenilporfirina **35**, com um rendimento de 48%.

Antes de iniciar a marcação com flúor radioactivo, começámos por otimizar, em laboratório, a reacção de fluoração em condições “frias” da porfirina **35**, via substituição nucleofílica. Para isso, escolhemos dois tipos de agentes de fluoração: um orgânico, fluoreto de tetra-*n*-butilamónio (TBAF) e um inorgânico, fluoreto de céσιο (CsF), estando os resultados da optimização da reacção apresentados na Tabela 3.1.



Esquema 3.6. Condições da reacção de fluoração para obtenção da porfirina **36**.

Tabela 3.1. Optimização da reacção de fluoração da porfirina precursora **35**.

|          | Precursor           | Agente de fluoração | Solvente           | T (°C) | Tempo reacção | Produto fluorado <b>36</b> η (%) |
|----------|---------------------|---------------------|--------------------|--------|---------------|----------------------------------|
| <b>1</b> | Porfirina <b>35</b> | CsF                 | CH <sub>3</sub> CN | 70     | 11h           | 59                               |
| <b>2</b> |                     |                     |                    | 80     | 8h            | 62                               |
| <b>3</b> |                     |                     |                    | 90     | 6h            | 63                               |
| <b>4</b> |                     | TBAF                |                    | 70     | 2h            | 80                               |
| <b>5</b> |                     |                     |                    | 80     | 1h            | 80                               |
| <b>6</b> |                     |                     |                    | 90     | 1h            | 87                               |
| <b>7</b> |                     |                     |                    | 90     | 30min         | 85                               |

Pela análise da Tabela 3.1 podemos concluir que as melhores condições para efectuar a reacção de substituição foram aquelas onde se utilizou o TBAF como agente de fluoração, pois foi possível obter a 5-(2-fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **36** com rendimentos de produto isolado entre os 80-90% (**entrada 4-7**). Usando fluoreto de céσιο como agente de fluoração, os resultados não foram tão promissores possivelmente devido à dificuldade de solubilização deste em acetonitrilo, obtendo-se

rendimentos entre 50-60% (**entrada 1-3**). Assim, numa experiência tipo, ao precursor **35**, dissolvido em acetonitrilo, adicionou-se TBAF (1:5) em solução de THF e a reacção permaneceu a 90°C, durante 30 minutos (**entrada 7**). Em seguida, e após observar por tlc a ausência de material de partida, evaporou-se o solvente, redissolveu-se o crude em diclorometano e purificou-se por coluna de gel de sílica, usando apenas diclorometano como eluente. Obteve-se desta forma a porfirina **36** (Esquema 3.6), com um rendimento de 82%. Foi efectuada a respectiva caracterização, nomeadamente, através de espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{19}\text{F}$ , assim como por espectrometria de massa por ESI-TOF, cujos resultados se encontram descritos no Capítulo 4 e no Anexo 1 – Figura A9 e A10.

Após optimização do método de síntese da porfirina fluorada, a nível laboratorial, era relevante proceder à optimização das condições de separação e isolamento do produto pretendido, por HPLC, de forma a mimetizar as condições necessárias para a purificação e controlo analítico do mesmo, aquando da síntese do composto marcado com flúor radioactivo (flúor-18). Uma vez, que as experiências de marcação radioactiva com flúor-18 iam ser efectuadas no laboratório do ICNAS, foi usado o equipamento do mesmo, nomeadamente o HPLC com coluna analítica e posteriormente o HPLC com coluna semi-preparativa, para que o processo de optimização fosse efectuado exactamente nas mesmas condições cromatográficas.

Iniciámos os estudos de separação cromatográfica com a optimização das condições de separação do derivado **35** e fluorado **36**, num HPLC equipado com uma coluna analítica (*Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18*, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6x150mm), injectando 20-30  $\mu\text{L}$  da respectiva porfirina dissolvida em DMF. Começámos por utilizar uma mistura de eluentes com 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 5% tampão de formato de amónia (0,1 M; pH=7,2), com um fluxo de 1 mL/min. Nestas condições a porfirina **35** apresentou um tempo de retenção de 24 minutos enquanto a porfirina fluorada **36** apresentou um tempo de retenção de 21 minutos. Uma vez que pretendíamos sintetizar compostos radioactivos, considerámos estes tempos de retenção demasiado longos e por isso avaliámos uma nova mistura de eluentes, 95% MeOH: 5% tampão (formato de amónia 0,1 M; pH=7,2). Nestas condições a porfirina **35** apresenta um tempo de retenção de 8 minutos, enquanto o tempo de retenção da porfirina fluorada **36** é de 12 minutos. Continuámos a variar as percentagens do eluente, até atingir as condições de

separação que considerámos mais apropriadas para utilizar após as experiências de marcação radioactiva (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Tempos de retenção do precursor **35** e do produto fluorado **36**, em função do eluente e fluxo, medidos por HPLC com coluna analítica.

|          | Eluente     |                      | Fluxo<br>(mL/min) | t.r. (min)          |                     |
|----------|-------------|----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
|          | MeOH<br>(%) | Tampão pH=7,2<br>(%) |                   | Porfirina <b>35</b> | Porfirina <b>36</b> |
|          | <b>1</b>    | 95                   |                   | 5                   | 9-10                |
| <b>2</b> | 98          | 2                    | 5-6               | 7-8                 |                     |
| <b>3</b> | 99          | 1                    | 2-3               | 3-4                 |                     |

A mistura seleccionada para os estudos foi de 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=7,2) como eluente e fluxo de 1 mL/min. Nestas condições, o precursor **35** apresenta um tempo de retenção (t.r) entre 5-6 minutos e o produto fluorado **36** um tempo de retenção entre 7-8 minutos (Figura 3.1). Os picos obtidos no cromatograma foram atribuídos a cada um dos produtos da reacção através da injeção dos produtos puros, previamente isolados e caracterizados.

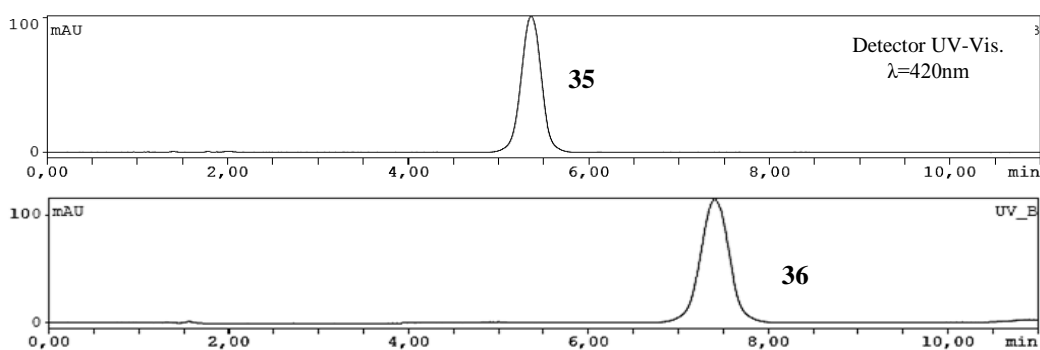


Figura 3.1. Cromatogramas obtidos para a porfirina **35** e **36** usando as condições de HPLC analítico: 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1 M; pH=7,2), 1 mL/min de fluxo.

Após optimização das condições para o posterior controlo analítico do produto radioactivo, por HPLC, necessitávamos proceder de igual modo para as condições de



separação por HPLC equipado com uma coluna semi-preparativa (*Phenomenex* Luna C18, 10  $\mu$ m, 10x250 mm). Desta forma, testámos diferentes misturas de solvente e fluxo, injectando 50-100  $\mu$ L da respectiva porfirina dissolvida em DMF, apresentando-se os resultados na Tabela 3.3. Assim, variando a mistura do eluente e o respectivo fluxo foi possível obter diferentes tempos de retenção para cada uma das porfirinas. Com 99% MeOH: 1% tampão (**entrada 2**-Tabela 3.3), variando o fluxo, os tempos de retenção eram muito próximos podendo levar a uma insuficiente separação. Alterando para 95% MeOH: 5% tampão (**entrada 1**-Tabela 3.3) obteve-se melhor separação, no entanto os tempos de retenção eram demasiado elevados, sendo pouco adequados para os estudos que pretendíamos.

Tabela 3.3. Optimização das condições de separação da porfirina **35** e **36**, por HPLC com coluna semi-preparativa.

| Eluente  |                                      |   | Fluxo<br>(mL/min) | t.r. (min)          |                     |
|----------|--------------------------------------|---|-------------------|---------------------|---------------------|
| MeOH (%) | Formato de amónia 0,1M<br>pH=7,2 (%) |   |                   | Porfirina <b>35</b> | Porfirina <b>36</b> |
| <b>1</b> | 95                                   | 5 | 4                 | 25-26               | 29-30               |
|          |                                      |   | 5                 | 24-25               | 28-29               |
| <b>2</b> | 99                                   | 1 | 5                 | 14-15               | 15-16               |
|          |                                      |   | 6                 | 12-13               | 14-15               |
| <b>3</b> | 98                                   | 2 | 8                 | 9-10                | 13-15               |

Prosseguimos as experiências utilizando as condições que considerámos ideais: 98% MeOH: 2% de tampão (formato de amónia 0,1 M; pH=7,2), entrada **3** - Tabela 3.3, e fluxo de 8mL/min. Nestas condições, obteve-se para a porfirina **35** um tempo de retenção entre 9-10 minutos (550-650 segundos) e para a porfirina **36** entre 13-15 minutos (800-900 segundos) (Figura 3.2).

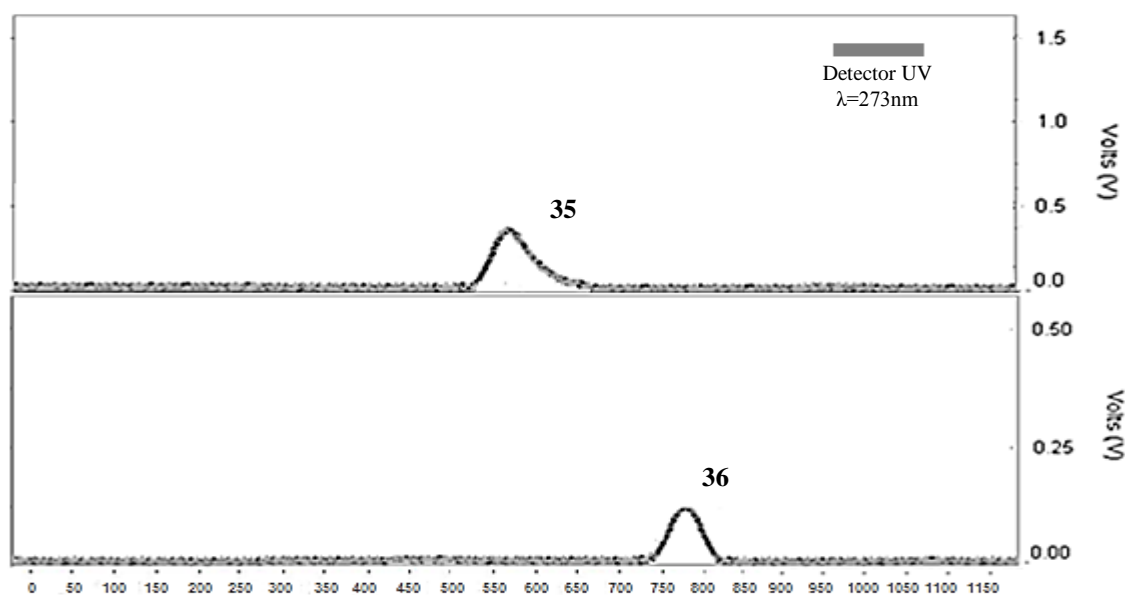


Figura 3.2. Cromatogramas obtidos para as porfirinas **35** e **36** usando as condições de HPLC semi-preparativo: 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1 M; pH=7,2) fluxo 8mL/min.

Com estes resultados, considerámos reunidas as condições para prosseguir com as experiências de marcação, uma vez que já tínhamos optimizadas não só condições de síntese de derivados fluorados, mas também condições eficientes de purificação, por HPLC, para promover a separação do material de partida (porfirina **35**) e do produto da reacção. A porfirina fluorada **36** irá ser utilizada como amostra referência para os estudos de análise e separação cromatográfica dos produtos marcados com flúor-18.

### 3.2. Marcação de porfirinas com flúor-18 (reacção “quente”)

Tal como referido no Capítulo 1, a síntese de macrociclos tetrapirrólicos, marcados com flúor radioactivo (flúor-18) *via* substituição nucleofílica, inicia-se com a produção do flúor-18, através da reacção nuclear,  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , tendo como material de partida água enriquecida a 97%, em oxigénio-18 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ). No caso específico do ICNAS, o ciclotrão é um IBA Cyclone<sup>®</sup>18/9 (IBA Molecular, Louvaine-La-Neuve, Bélgica), a reacção produz flúor-18 na forma de ião fluoreto radioactivo [ $^{18}\text{F}$ ] em solução aquosa, que posteriormente é enviado para uma câmara blindada (Figura 3.3),

impulsionado por um fluxo de hélio, através de um sistema de tubos apropriados para este transporte, onde irá decorrer a síntese.

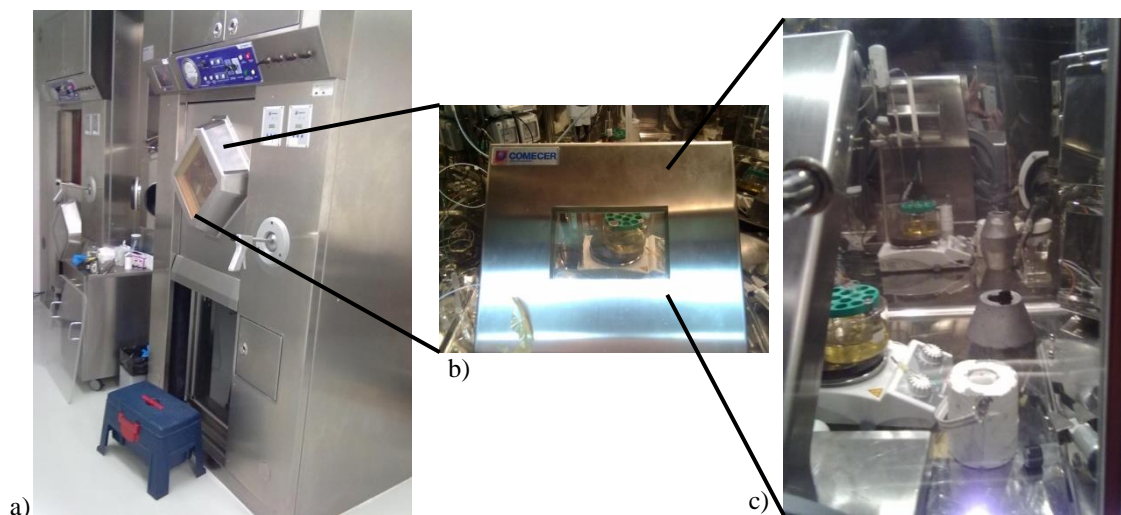
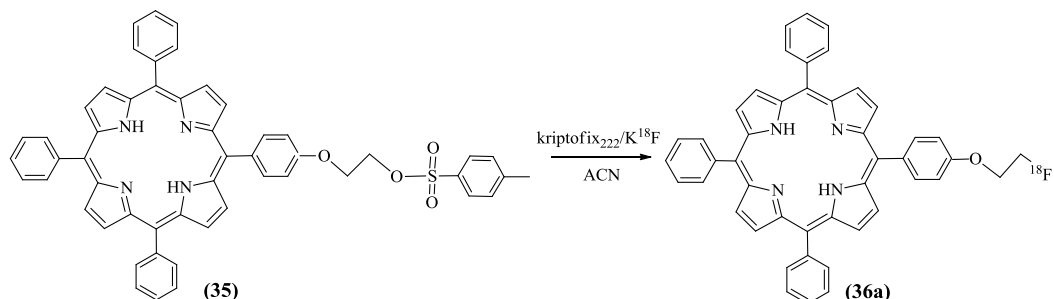


Figura 3.3. a) Exterior da câmara blindada; b) Anteparo de protecção no interior da câmara blindada; c) Vista atrás do anteparo, onde decorre a reacção de radiofluoração.

Para eliminar possíveis impurezas catiónicas, orgânicas e insolúveis em água, a solução de flúor-18, proveniente do ciclotrão num volume de cerca de 1-2 mL, é passada através de uma coluna contendo uma resina aniónica (*Accel Plus QMA Sep-Pak*) (Figura 3.4 A), que retém o [ $^{18}\text{F}$ ], extraindo-o desta forma da solução aquosa, enquanto as impurezas são removidas com a solução aquosa de  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (Figura 3.4 B). O [ $^{18}\text{F}$ ] retido na resina é eluído com uma solução aquosa de carbonato de potássio (0,05 M) e uma solução de kryptofix<sub>222</sub>, em acetonitrilo (0,04 M), um criptando cuja função é aumentar o carácter nucleofílico do fluoreto (Figura 3.4 C). Esta nova mistura, contendo tipicamente 97 a 99% de toda a actividade na forma de fluoreto de um complexo de kryptofix com potássio ( $\text{K}_{222}/\text{K}^{18}\text{F}$ ), foi recolhida para um tubo (Figura 3.4 D). De seguida procedeu-se a uma secagem azeotrópica da solução de forma a remover qualquer vestígio de água que influencie posteriormente a reacção de substituição nucleofílica. Esta secagem foi efectuada a 100°C, adicionando alíquotas de 1 mL de acetonitrilo anidro, com um fluxo contínuo de azoto, durante 15-20 minutos. Após secagem, a este tubo adicionou-se cerca de 2 mg de porfirina **35**, dissolvida em 1 mL de

acetonitrilo anidro e, usando as condições anteriormente otimizadas laboratorialmente na secção 3.1.1, a mistura foi colocada em agitação à temperatura de 100°C, durante 20-30 minutos (Figura 3.4 E e F) (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Condições de síntese da porfirina marcada com flúor-18, porfirina **36a**.

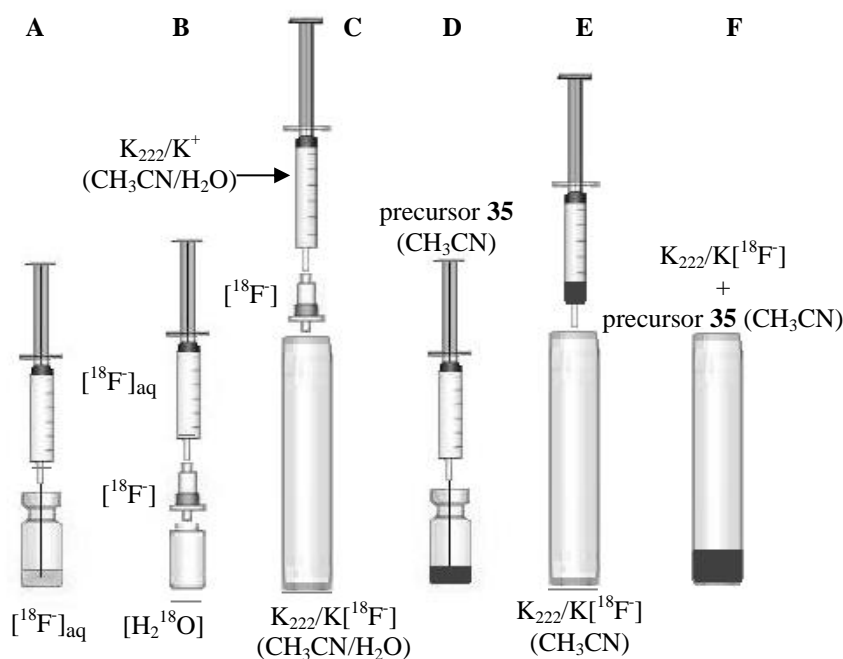


Figura 3.4. Esquema ilustrativo para a síntese da porfirina **36a**.

Seguidamente, e antes de proceder à purificação, foi efectuado o controlo analítico da mistura reaccional, usando as condições de HPLC previamente otimizadas e descritas na secção 3.1.2, injectando 20 $\mu\text{L}$  da mistura reaccional, de forma a confirmar a obtenção do produto marcado com flúor-18 (Figura 3.5).

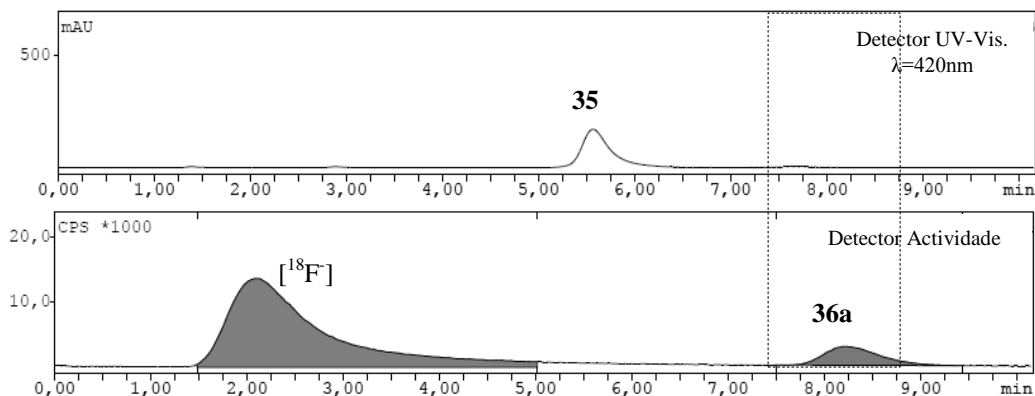


Figura 3.5. Cromatograma da mistura reaccional após marcação com flúor-18, obtido por HPLC com coluna analítica - 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=7,2), fluxo de 1 mL/min.

Através da análise por HPLC (Figura 3.5) observamos, no cromatograma referente à actividade da amostra injectada, o pico correspondente à formação 5-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **36a** (t.r=7-8 minutos), com um rendimento de porfirina, marcada com flúor-18, de 40% (foram efectuadas co-injecções da mistura reaccional com a porfirina fluorada **36**, para certificar que se tratava do produto pretendido). Observa-se também, entre 1,5-3 minutos, o pico do fluoreto livre que não reagiu. No cromatograma UV-Visível, entre 5-6 minutos, encontra-se o pico correspondente ao material de partida, porfirina **35**. Tendo em conta a desproporção da sua quantidade quando comparada com a baixa concentração de actividade de fluoreto radioactivo, salienta-se que o objectivo da radiosíntese não é o consumo total da porfirina precursora, mas sim obter uma eficiente marcação e posterior isolamento do produto marcado. Deste modo, após o controlo analítico da mistura reaccional procedemos finalmente à purificação do produto da reacção marcado com  $^{18}\text{F}$ , injectando cerca de 1 mL da mistura reaccional e usando as condições optimizadas na secção anterior: 98% MeOH: 2 % tampão (formato de amónia 0,1M; pH=7,2) e fluxo de 8mL/min (Figura 3.6).

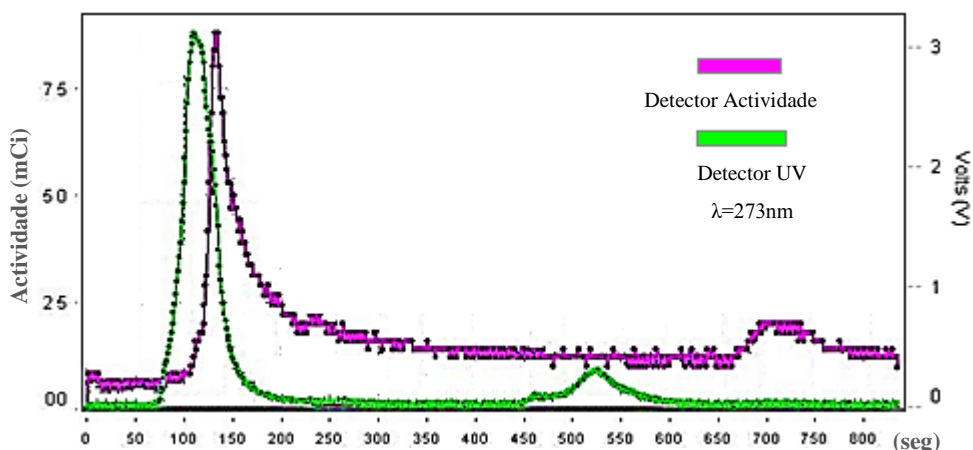


Figura 3.6. Cromatograma obtido durante a purificação da porfirina **36a**, marcada com flúor-18, usando HPLC com coluna semi-preparativa.

Seguindo o sinal de actividade da amostra, recolheu-se a fracção correspondente à porfirina marcada **36a**, entre os 650-750 segundos (11-13 minutos) e procedeu-se ao controlo analítico do produto puro (Figura 3.7).

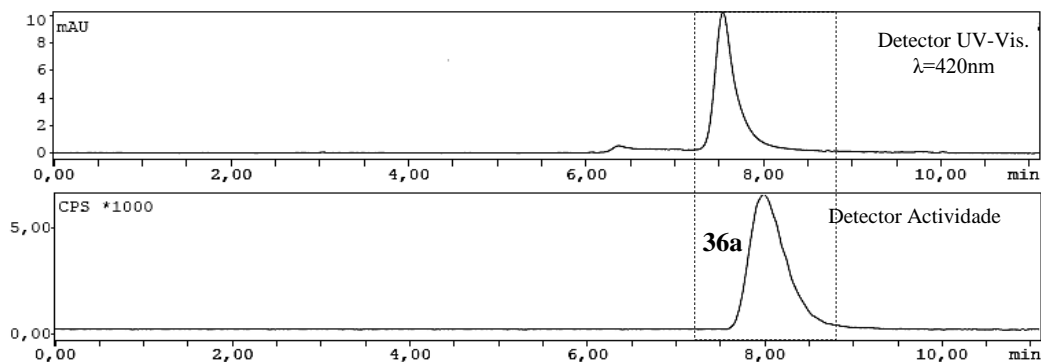


Figura 3.7. Cromatograma obtido, após purificação, em HPLC com coluna analítica, para a porfirina **36a** marcada com flúor-18, usando 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=7,2) e fluxo de 1 mL/min.

Pela análise do cromatograma apresentado na Figura 3.7 pode concluir-se que a marcação e purificação da porfirina **35** com flúor-18 foram efectuadas com êxito, uma vez que se obteve a porfirina **36a** com uma pureza radioquímica superior a 95% e uma pureza química bastante aceitável, sendo detectada apenas uma ínfima quantidade de produto “frio”. Salienta-se que esta porfirina marcada com flúor-18 foi utilizada em

estudos *in vivo* e *in vitro* para avaliação preliminar da sua potencial utilização como agente de diagnóstico em imagiologia médica, usando a técnica de PET. Foram realizados estudos de distribuição em ratinhos normais (2 machos, estirpe C57BL/6, com aproximadamente 24 semanas, provenientes do Biotério do CNC). Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tribromoetanol (Avertin®, 20 mg/ml), na veia da cauda com 500 e 900 kBq porfirina **36a** e colocados num sistema de imagem de alta resolução ClearPEM (PETsys Medical PET Imaging Systems, Portugal). Foram recolhidas imagens planares de corpo inteiro, durante 1 hora, após a qual os animais foram sacrificados e os órgãos de interesse recolhidos. Dos dados obtidos conclui-se que o composto apresenta uma biodistribuição rápida, com muito pouca captação nos tecidos cerebrais, pulmonares e musculares, e que a principal via de excreção é a hepática (Figura A11 – em anexo 1).

Foram também realizados testes preliminares de captação em células de cancro da bexiga (linha celular humana, UM-UC3, de cancro da bexiga). Os estudos realizados indiciam uma fase de captação crescente ao longo dos primeiros 45 minutos, seguida de uma perda progressiva da actividade a partir deste ponto (Figura A12 – Anexo 1). Os resultados são promissores mas são necessários estudos adicionais *in vivo* para confirmar se esta captação ocorre em condições fisiológicas.

### **3.3. Marcação de porfirinas com flúor-18 em módulo automático de síntese**

As experiências de síntese de macrociclos tetrapirrólicos marcados com flúor-18, em módulo automático, foram efectuadas no centro de investigação CIC biomaGUNE - Centro de Investigação Cooperativa em Biomateriais - em San Sebastian, Espanha, usando um módulo automático de síntese, de compostos radiofluorados (TRACERlab FX/FN) que adaptámos para sintetizar o nosso composto marcado com flúor-18 (Figura 3.8).

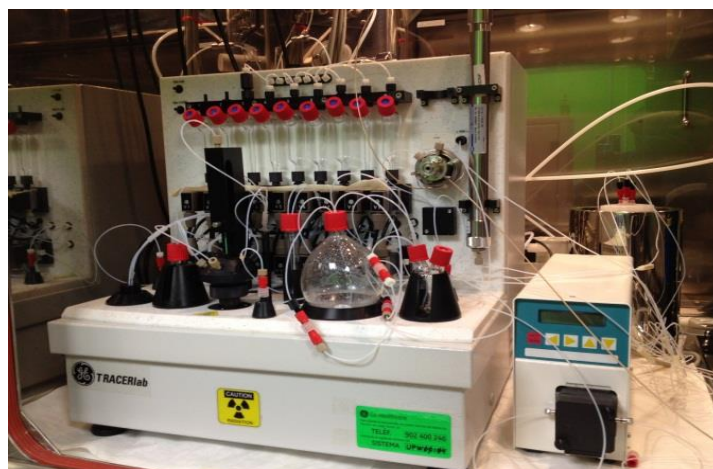


Figura 3.8. Módulo de síntese TRACERlab FX/FN, usado na radiofluoração da porfirina **35**.

Uma vez que se tratavam de condições experimentais diferentes das usadas no ICNAS, foi necessário repetir todo o processo de optimização da síntese, separação e purificação do composto por HPLC, com coluna analítica e também com coluna semi-preparativa, como efectuado anteriormente. As condições seleccionadas para iniciar os estudos, primeiramente, de controlo analítico (usando uma coluna *Agilent Technologies Zorbax Eclipse Plus C18*, 5 $\mu$ m; 4.6x150mm) foram: uma mistura de 94% MeOH: 6% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=6,8) e fluxo de 2 mL/min. Obteve-se deste modo um tempo de retenção entre 16-18 minutos para a porfirina **35** e tempo de retenção entre 20-22 minutos para a porfirina **36**. Relativamente às condições de purificação do produto fluorado (**36**), foi usado uma coluna semi-preparativa *Phenomenex Luna C18*, 5 $\mu$ m, 10x250 mm, uma mistura de 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=6,8) e um fluxo de 5 mL/min. Nestas condições, obteve-se um tempo de retenção entre 19-20 minutos para a porfirina **35** e 23-24 minutos para a porfirina **36**.

Após optimização das condições de purificação e controlo analítico do produto por HPLC, o módulo de síntese foi configurado para que, após a síntese, fosse possível recolher a mistura reaccional directamente para um frasco colector e efectuar o controlo analítico para confirmar se ocorreu radiofluoração do precursor. Deste modo, nos frascos dos reagentes **I** a **VI** foi colocado: **I**) carbonato de potássio – 3,5 mg K<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> em



500  $\mu\text{L}$  de água; **II**) kryptofix222 - 5 mg em 1 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; **III**) precursor **35** (5 mg em 1 mL DMF) e nos frascos **IV-VI**) 0,1 mL fase móvel: 98% MeOH:2% tampão. O flúor-18 foi produzido *via* reacção nuclear ( $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ ), tendo como material de partida água enriquecida a 97%, em oxigénio-18 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ), num ciclotrão Cyclone®18/9 IBA, e distribuído directamente para o módulo de síntese, sob a forma de ião fluoreto em solução aquosa,  $[\text{F}^{18}]$ , (Figura 3.9 **A**). Cerca de 2 mL desta solução proveniente do ciclotrão passam através de uma coluna com resina de troca iónica, QMA-light Sep-Pak, para remover a água ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) (Figura 3.9 – linha vermelha). O  $[\text{F}^{18}]$  é posteriormente eluído com a solução de carbonato de potássio (**I**) e recolhido num reactor (Figura 3.9 **B** – linha verde), onde de seguida é adicionada a solução de  $\text{K}_{222}$  (**II**) (Figura 3.9 – linha azul) prosseguindo-se com a evaporação azeotrópica do solvente ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ), aquecendo o reactor a  $90^\circ\text{C}$  sob vácuo, durante 10 minutos. Depois de decorrida a secagem, o reactor é arrefecido até  $40^\circ\text{C}$ , sob fluxo de hélio, e o precursor **35** (**III**) é adicionado ao reactor (Figura 3.9 – linha castanha). A mistura é aquecida a  $100^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. Após reacção, o reactor é novamente arrefecido até  $40^\circ\text{C}$  e o produto diluído com fase móvel (**IV-VI**) (Figura 3.9 – linha amarela). Esta solução foi enviada directamente, sem passo de purificação para o frasco de recolha da amostra, sendo efectuado posteriormente o seu controlo analítico por HPLC, usando as condições previamente optimizadas: 96% MeOH: 4% tampão (formato de amónia 0,1M; pH=6,8; fluxo 2 mL/min) e o melhor resultado obtido está representado no cromatograma da Figura 3.10.

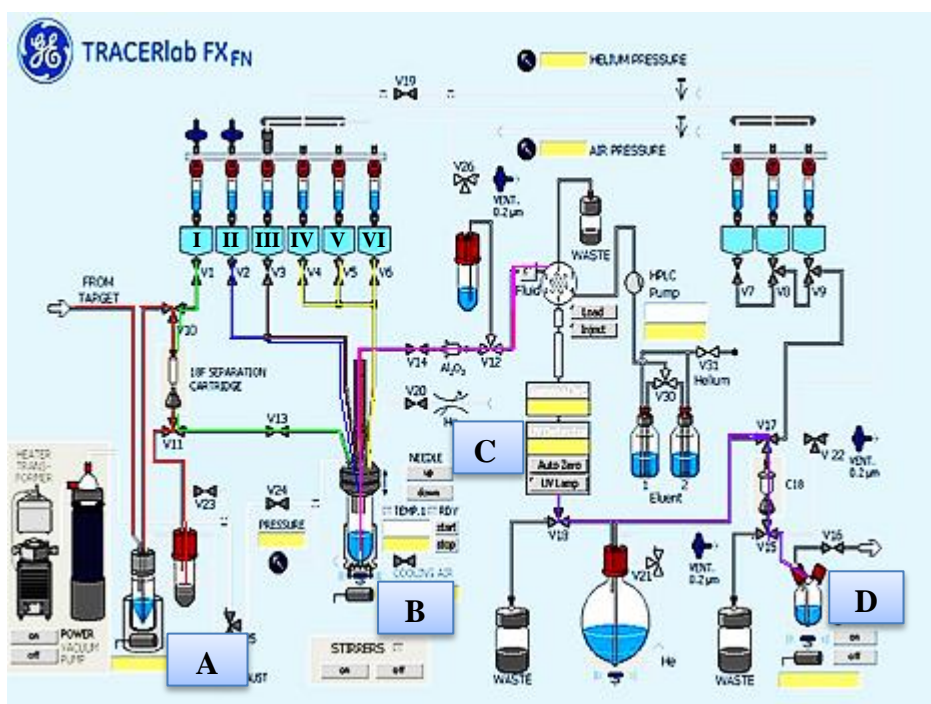


Figura 3.9. Esquema do módulo automático de síntese de compostos marcados com flúor-18 e configuração adoptada para a radiofluoração.

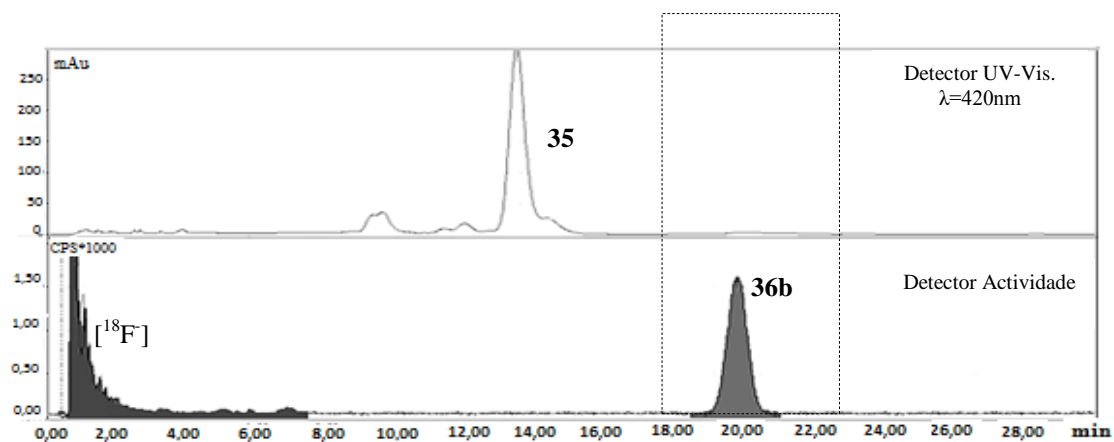


Figura 3.10. Cromatograma obtido após injeção de 30µL de mistura reaccional usando HPLC com coluna analítica (96% MeOH: 4% tampão formato de amónia 0,1M; pH= 6,8; fluxo 2 mL/min).

Pela análise da Figura 3.10 observamos, no cromatograma referente à actividade da mistura reaccional, o pico correspondente à formação 5-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **36b** (t.r=19-21minutos), com um rendimento de porfirina

marcada com flúor-18 de aproximadamente 30%. Observa-se também, entre 1,5-3 minutos, o pico do fluoreto livre que não reagiu. Desta forma, e uma vez que já tínhamos evidências de marcação do precursor com flúor-18 optimizámos a síntese no módulo, configurando neste caso a adição do passo de purificação do produto da reacção e posterior recolha da amostra. Assim, repetimos todo o processo anterior, desde a formação de flúor-18, em solução aquosa, até ao arrefecimento do reactor após síntese (Figura 3.9 de **A** a **B** – linha vermelha a rosa). Seguidamente, o produto obtido foi encaminhado para a coluna semi-preparativa do HPLC do módulo de síntese, usando como eluente a mistura de 98% MeOH: 2% tampão (formato de amónia 0,1M; pH= 6,8) e fluxo de 5mL/min (Figura 3.9 **C** – linha rosa). A porfirina **36b** marcada com flúor-18 foi separada do precursor (t.r.=16-18 min) e recolhida (t.r.=21-22 min) sendo esta fracção imediatamente enviada para o frasco **D** para posterior controlo analítico no HPLC (Figura 3.9 – linha roxa). Foi usada uma coluna analítica diferente do processo de optimização das condições de separação, ou seja, foi usada uma *Halo* C18 4.6x100mm 2.7 $\mu$ m. Com as novas condições de separação obtidas após optimização usou-se como eluente apenas acetonitrilo e um fluxo de 1,5mL/min, obtendo-se desta forma um tempo de retenção entre 6-7 minutos para a porfirina precursora **35** e um tempo de retenção entre 5-5,5 minutos para a porfirina **36**. O melhor resultado obtido para a síntese e purificação da porfirina **36b** encontra-se no cromatograma da Figura 3.11, estando o respectivo controlo analítico apresentado na Figura 3.12.

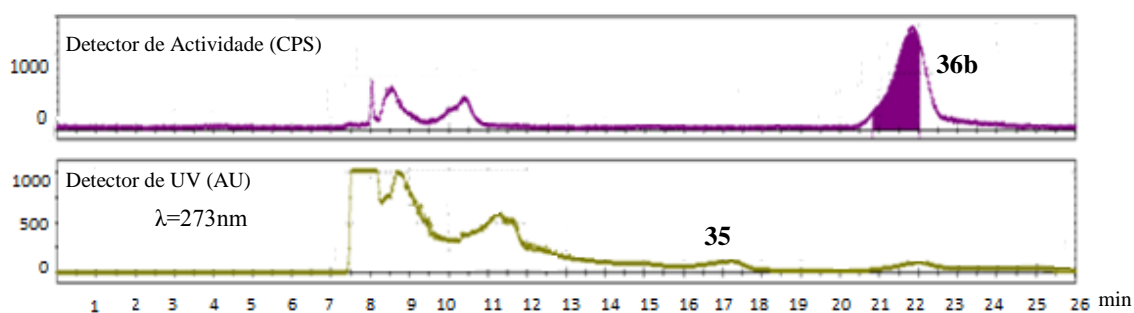


Figura 3.11. Cromatograma obtido na purificação da porfirina **36b**, usando HPLC com coluna semi-preparativa (98% MeOH: 2% tampão; fluxo 5 mL/min)

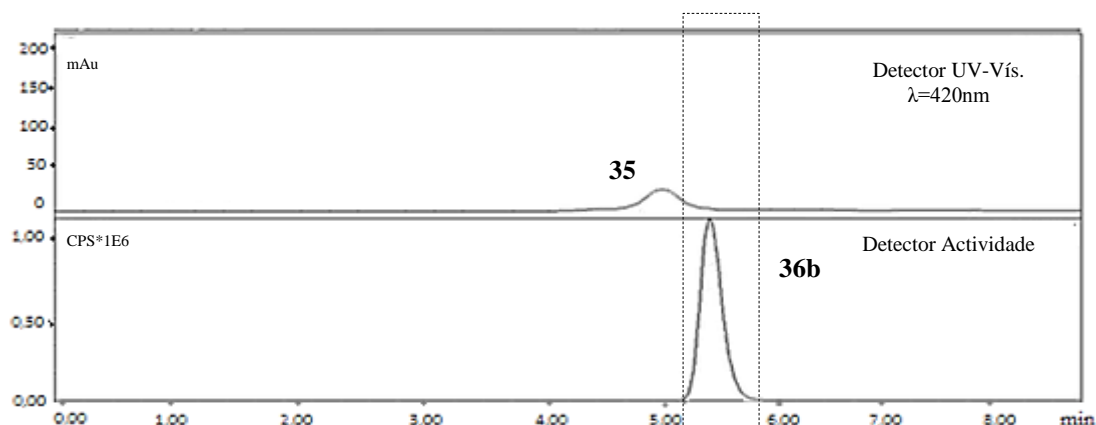


Figura 3.12. Cromatograma após purificação da porfirina **36b**, usando HPLC com coluna analítica (eluente: 100% CH<sub>3</sub>CN, fluxo de 1,5 mL/min).

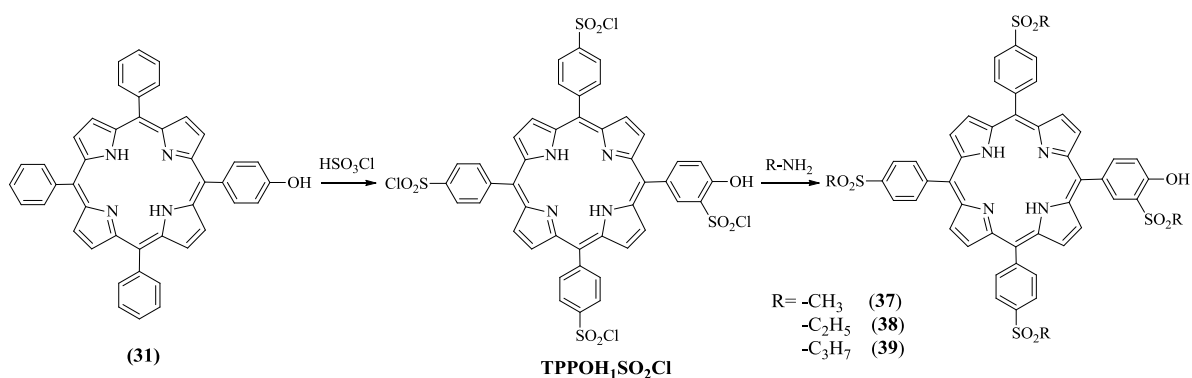
Através da análise do cromatograma da Figura 3.12 observamos o pico de actividade correspondente à porfirina marcada com flúor-18 **36b** (t.r =5,5-6 min) com pureza radioquímica superior a 95%.

Salientamos com estes estudos que foi possível não só criar uma estratégia de síntese de porfirinas radioactivas marcadas com flúor-18, como também um método de separação eficaz, tanto em módulo automático, como usando o método de síntese mais convencional.

### 3.4. Síntese de porfirinas anfifílicas precursoras da reacção de fluoração (reacção “fria”)

Uma vez que já tínhamos evidências de que macrociclos tetrapirrólicos, derivatizados com diferentes grupos sulfonamida, são capazes de atravessar membranas celulares e acumular preferencialmente em células tumorais, idealizámos a funcionalização da porfirina **31** com estes grupos anfifílicos e tal como foi descrito anteriormente no Capítulo 2, a introdução destes é possível *via* reacção de clorossulfonação. No entanto, a clorossulfonação da porfirina **31** requer condições diferentes das usadas anteriormente, uma vez que um dos anéis contém um grupo hidroxilo com carácter doador de electrões. Assim, para clorossulfonar a porfirina, utilizou-se um excesso de ácido clorossulfónico (1:20), deixando-se a mistura reagir à

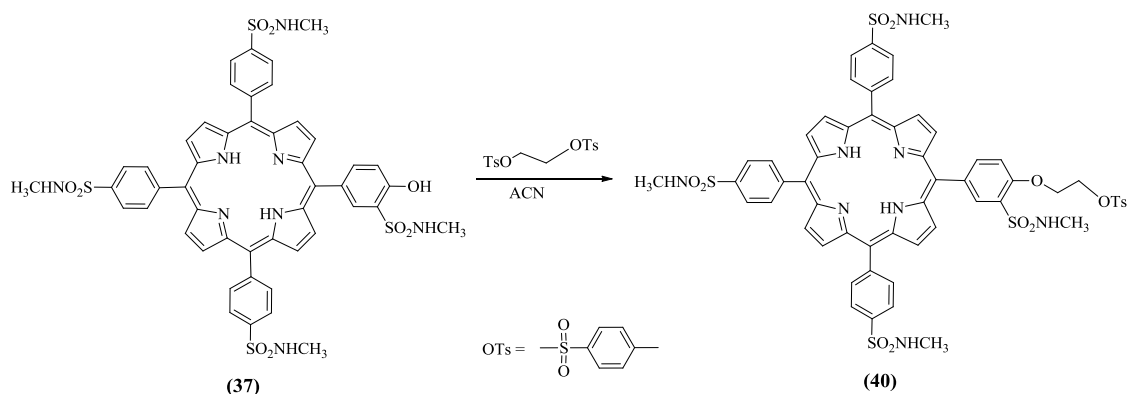
temperatura ambiente, durante duas horas. A lavagem e tratamento do produto seguiu o procedimento anteriormente descrito no Capítulo 2, secção 2.1.1. Dado que cloretos de arilsulfonilos são, em geral, de difícil purificação e muito sensíveis à humidade podendo levar à sua decomposição, após obtenção da porfirina clorossulfonada, procedemos directamente à derivatização desta com diferentes aminas, para obtenção das respectivas sulfonamidas. Numa experiência tipo, e seguindo o procedimento já descrito no Capítulo 2, à 5-(4-hidroxi-3-clorossulfonilfenil)-10,15,20-(4-clorossulfonil)trifenilporfirina (**TPPOH<sub>1</sub>SO<sub>2</sub>Cl**), dissolvida em diclorometano, foi adicionado um excesso da metilamina (1:40), e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, com agitação contínua durante 3 horas e controlada por tlc. De seguida, lavou-se o produto obtido com uma solução de ácido clorídrico 0,1M, uma solução aquosa, saturada, de bicarbonato de sódio e posteriormente com água. Recolheu-se a fase orgânica, secou-se e procedeu-se a uma cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente acetato de etilo. Após evaporação do solvente, obteve-se a 5-[(3-*N*-metilsulfamoíl-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina (**37**), com um rendimento de 48%. Deste modo, variando a amina, usando nomeadamente a etilamina e a propilamina, foi possível também obter a 5-[(3-*N*-etilsulfamoíl-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-etilsulfamoíl)trifenilporfirina (**38**) e a 5-[(3-*N*-propilsulfamoíl-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-propilsulfamoíl)trifenilporfirina (**39**) (Esquema 3.8), estando toda a caracterização espectroscópica destes novos compostos completamente descrita no Capítulo 4.



| Porfirina | Rendimento (%) | $\log P_{\text{octanol/água}}$ |
|-----------|----------------|--------------------------------|
| <b>31</b> | 9              | 3,01                           |
| <b>37</b> | 48             | 2,48                           |
| <b>38</b> | 47             | 2,27                           |
| <b>39</b> | 59             | 1,43                           |

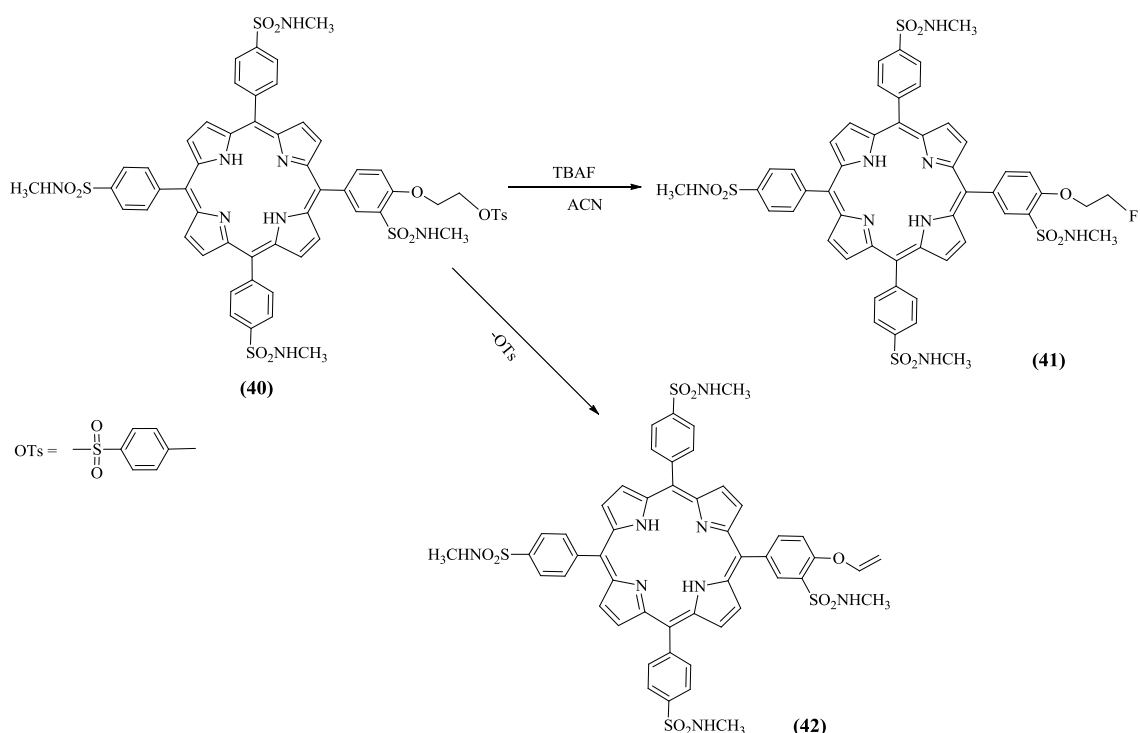
Esquema 3.8. Síntese de porfirinas hidroxiladas anfifílicas, rendimentos de reacção e  $\log P_{\text{octanol/água}}$ .

De acordo com o procedimento descrito no Capítulo 2 e para prever a lipofilia dos novos compostos anfifílicos sintetizados, foram também determinados os coeficientes de partição octanol/água ( $\log P_{\text{octanol/água}}$ ), recorrendo a espectroscopia por emissão de fluorescência obtendo-se valores entre 1,43 e 3,01 (Esquema 3.8). Compostos com esta gama de valores estão descritos na literatura como apropriados para administração intravenosa e/ou percutânea, para distribuição de fármacos com potencial penetração em tecidos cerebrais e/ou em tecidos cancerígenos.<sup>10-16</sup> Desta forma, abrimos novas perspectivas para a obtenção de porfirinas hidroxiladas derivatizadas com grupos sulfonamida, com bons rendimentos e funcionalidade apropriada para prosseguir com a reacção de tosilacção e por fim, com os estudos de fluoração. Assim prosseguimos o trabalho escolhendo a porfirina sulfonamida **37** como modelo, uma vez que derivados porfirínicos com estrutura semelhante eram capazes de atravessar membranas celulares e acumular preferencialmente em células tumorais.<sup>17-21</sup> Assim, a uma solução de porfirina **37**, em acetonitrilo, foi adicionado um excesso do derivado **34** (10 equivalentes) e carbonato de cézio (5 equivalentes). A mistura foi colocada a 100°C, durante 1 hora. Após evaporação do solvente, redissolveu-se o crude em diclorometano, lavou-se sucessivamente com água e uma solução aquosa, saturada, de bicarbonato de sódio e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Após filtração e evaporação do solvente foi possível obter a 5-[(3-*N*-metilsulfamoíl-4-(2-(4-metil benzenossulfonato))etoxifenil)]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina **40**, com um rendimento de 33% (Esquema 3.9). O produto foi caracterizado por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H e espectrometria de Massa, estando os resultados descritos no Capítulo 4.



Esquema 3.9. Síntese da porfirina precursora **40**, via reacção de tosilacção.

Após a síntese, purificação e isolamento da porfirina **40**, prosseguimos com a reacção de fluoreacção, *via* substituição nucleofílica. Assim numa experiência tipo, à porfirina **40** dissolvida em acetonitrilo, adicionou-se TBAF em solução de THF (2 M) (1:5). Deixou-se a mistura em agitação à temperatura de 100°C, durante 30 minutos. A reacção foi seguida por tlc, com aparecimento de duas manchas com tempos de retenção diferentes do material de partida. Após evaporação do solvente e redissolver em diclorometano, a mistura foi lavada com água e hidrogenocarbonato de sódio e separada em coluna de gel de sílica, usando como eluente diclorometano/acetato de etilo (1:2), recolhendo-se 2 fracções durante a cromatografia. Após evaporação do solvente e análise por espectrometria de Massa (ESI-TOF) e RMN <sup>1</sup>H (caracterização completa no Capítulo 4), foi possível identificar o produto fluorado, 5-[3-*N*-metilsulfamoíl-4-(2-fluoroetoxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina **41** e, por espectrometria de Massa (ESI-TOF), o produto de eliminação, a 5-[3-*N*-metilsulfamoíl-4-(viniloxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina **42** (Esquema 3.10). O rendimento da porfirina fluorada foi inferior a 10%, o que nos levou a concluir que a maior parte do composto sofreu decomposição durante o processo cromatográfico e que um dos produtos predominantes é o da reacção de eliminação (Esquema 3.10).

Esquema 3.10. Reacção de fluoração da porfirina **40**.

Após síntese do precursor anfílico contendo um grupo tosilo como grupo abandonante (porfirina **40**) e posterior fluoração do mesmo (porfirina **41**), foi necessário otimizar das condições de purificação e separação dos produtos, por HPLC, como efectuado anteriormente na secção 3.2 (Tabela 3.3 e 3.4). Iniciámos as experiências de optimização da separação por HPLC analítico, injectando 20-30  $\mu\text{L}$  de cada porfirina (**40** e **41**), dissolvidas em acetonitrilo. Usando uma mistura de 80% acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e 20% de uma solução aquosa de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$ ) (0,1M - pH=10) e 1 mL/min de fluxo, obteve-se uma eficiente separação entre a porfirina **40** e **41**. No entanto, por evidência das experiências de radiofluoração anteriores, dado que o pico do ião fluoreto livre ( $[\text{}^{18}\text{F}^-]$ ) tem um tempo de retenção bastante baixo (entre 1-3min), estas condições não permitiriam a eficiente separação do produto marcado com flúor-18 (t.r=1,5-2 min) do pico do  $[\text{}^{18}\text{F}^-]$  livre. Desta forma, diminuámos a quantidade de acetonitrilo para 70:30, aumentando o tempo de retenção da porfirina fluorada **41** (t.r=3-4 min). No entanto, estas novas condições ainda não eram as ideais, pretendíamos aumentar o tempo de retenção do produto fluorado, para termos a certeza que não iria



ocorrer sobreposição de picos com o íon fluoreto livre ( $[^{18}\text{F}]$ ). Notou-se que, à medida que aumentamos a quantidade de  $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$ , mantendo o fluxo a 1 mL/min, observou-se um arrastamento das bandas e, apenas com a proporção de eluentes de 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 60%  $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$  e 3 mL/min de fluxo, se obteve um tempo de retenção entre 6-8 minutos para a porfirina fluorada **41** e entre os 12-14 minutos para a porfirina precursora **40** (Tabela 3.4 e Figura 3.13).

Tabela 3.4. Otimização da separação das porfirinas **40** e **41**, por HPLC com coluna analítica.

|          | Eluente                       |  | Fluxo<br>(mL/min) | t.r. (min)          |                     |
|----------|-------------------------------|--|-------------------|---------------------|---------------------|
|          | $\text{CH}_3\text{CN}$<br>(%) | $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$ (%)<br>pH=10 |                   | Porfirina <b>40</b> | Porfirina <b>41</b> |
| <b>1</b> | 80                            | 20   | 1                 | 13-14               | 1,5-2               |
| <b>2</b> | 70                            | 30   |                   | 17-20               | 3-4                 |
| <b>3</b> | 40                            | 60   | 3                 | 12-14               | 6-8                 |

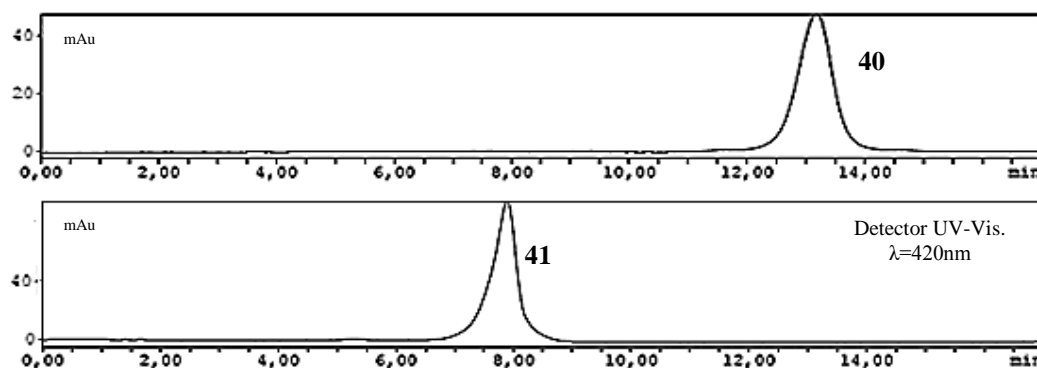


Figura 3.13. Cromatogramas obtidos para a porfirina **40** e **41** usando as condições de HPLC analítico: eluente - 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 60%  $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$  e 1 mL/min de fluxo.

Após otimização do controlo analítico do produto fluorado, por HPLC, era necessário proceder de igual modo para a purificação usando coluna semi-preparativa. Foram testadas diferentes misturas de solvente e variações de fluxo, injectando 50-100  $\mu\text{L}$  da porfirina pretendida. Os resultados apresentam-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Otimização das condições de separação da porfirina **40** e o produto fluorado **41**, por HPLC com coluna semi-preparativa.

|          | Eluente                   |  | Fluxo<br>(mL/min) | t.r. (min)          |                     |
|----------|---------------------------|--|-------------------|---------------------|---------------------|
|          | CH <sub>3</sub> CN<br>(%) | Et <sub>3</sub> N <sub>aq</sub> (%)<br>pH=10 |                   | Porfirina <b>40</b> | Porfirina <b>41</b> |
|          | <b>1</b>                  | 80   | 20                | 4                   | 2-4                 |
| <b>2</b> | 80                        | 20   | 3                 | 4-6                 | 3-4                 |
| <b>3</b> | 70                        | 30   | 4                 | 6-8                 | 5-6                 |
| <b>4</b> | 40                        | 60   | 5                 | 8-10                | 4-6                 |

Pela análise da Tabela 3.5, salientamos a entrada **4**, com as condições que consideramos ideais para a separação eficaz entre o composto precursor (porfirina **40**) e o composto referência (porfirina fluorada **41**), com tempos de retenção entre os 8-10 minutos (525-600 segundos) e 4-6 minutos (250-350 segundos), respectivamente (Figura 3.14).

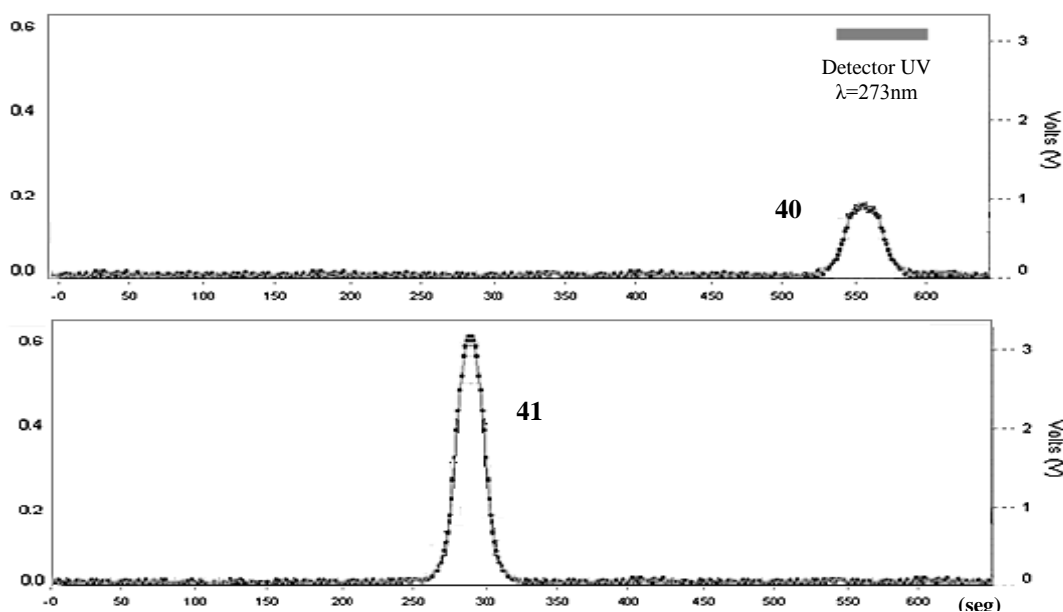
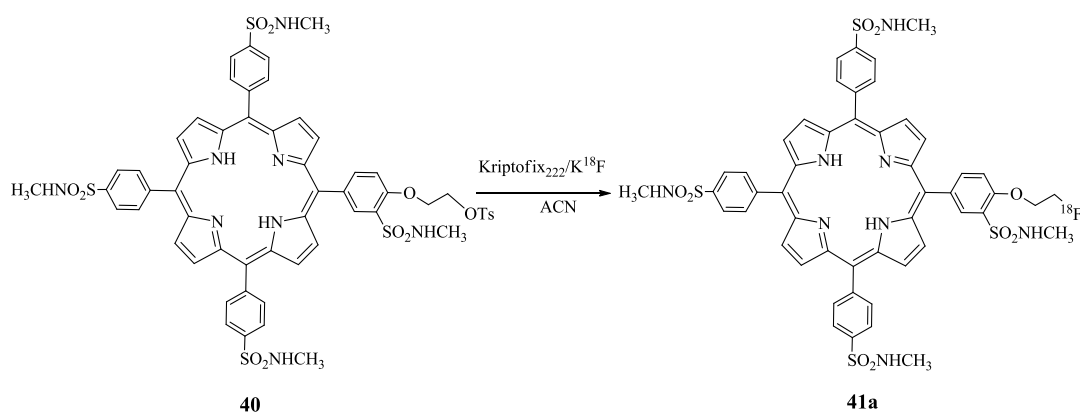


Figura 3.14. Cromatogramas obtidos para as porfirinas **40** e **41** usando as condições de HPLC semi-preparativo: 40% CH<sub>3</sub>CN: 60% Et<sub>3</sub>N<sub>aq</sub>, fluxo 5 mL/min.

Com estes resultados, considerámos reunidas as condições para prosseguir com as experiências de marcação, respectivo controlo analítico, separação e purificação do produto marcado.

### 3.5. Marcação de porfirinas anfifílicas com flúor-18 (reacção “quente”)

Tal como descrito na secção 3.3, a marcação radioactiva de uma porfirina sulfonamida com flúor-18, a partir do seu precursor, inicia-se com a produção de flúor radioactivo, por reacção nuclear, a partir de água enriquecida ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ), no ciclotrão, na forma de ião fluoreto radioactivo [ $^{18}\text{F}^-$ ] em solução que é aprisionado numa coluna de troca iónica. Após eluição com solução de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  contendo carbonato de potássio:kryptofix<sub>222</sub>, recolha e secagem azeotrópica, a esta mistura foi adicionada porfirina precursora **40** (2 mg), dissolvida em 1 mL de acetonitrilo anidro, e a mistura foi colocada em agitação à temperatura de 100°C, durante 20-30 minutos (Esquema 3.11). Seguidamente, e antes de proceder à purificação, foi efectuado o controlo analítico da mistura reaccional, usando as condições optimizadas na secção 3.5, injectando 20  $\mu\text{L}$  da mistura reaccional, de forma a confirmar a obtenção do produto radioactivo. Foram efectuadas várias sínteses e o melhor resultado obtido, relativamente à eficiência da marcação com flúor-18, encontra-se na Figura 3.15.



Esquema 3.11. Síntese da porfirina **41a** marcada com flúor-18.

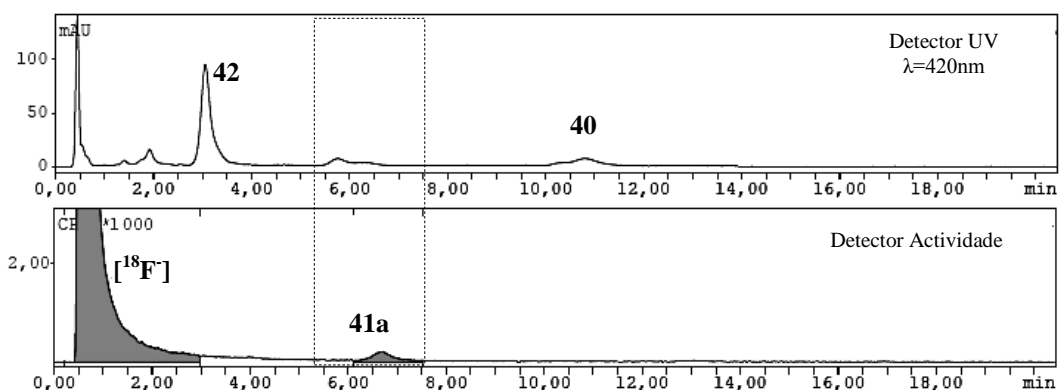


Figura 3.15. Cromatograma da mistura reaccional após fluoreção com flúor-18, obtido por HPLC analítico - 40% CH<sub>3</sub>CN: 60% Et<sub>3</sub>N<sub>aq</sub>, fluxo de 3 mL/min.

Através da análise da Figura 3.15 observou-se, no cromatograma referente à actividade da amostra injectada, o pico correspondente à formação da 5-[3-*N*-metilsulfamoíl-4-(2-fluoroetoxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina **41a** ( $t_r=6-7$  minutos), com um rendimento de porfirina marcada com flúor-18 de cerca de 0,1%, e ainda, entre 1,5-3 minutos, o pico do fluoreto livre que não reagiu. No cromatograma UV-Visível, é possível observar, entre 10-12 minutos, o pico correspondente ao material de partida (porfirina precursora **40**), e um outro pico mais intenso que, por co-injecção com a amostra “fria”, nos certificámos que se tratava do produto de eliminação, porfirina **42**, identificada anteriormente como um dos produtos da reacção de síntese da porfirina fluorada **41**. Mesmo com actividade de produto marcado muito baixa, após o controlo analítico da mistura reaccional, procedemos à tentativa de separação e purificação do produto da reacção marcado com flúor-18, injectando cerca de 1 mL da mistura reaccional e usando as condições optimizadas para o HPLC semi-preparativo: 40% CH<sub>3</sub>CN: 60% Et<sub>3</sub>N<sub>aq</sub> e fluxo de 5 mL/min (Figura 3.16).

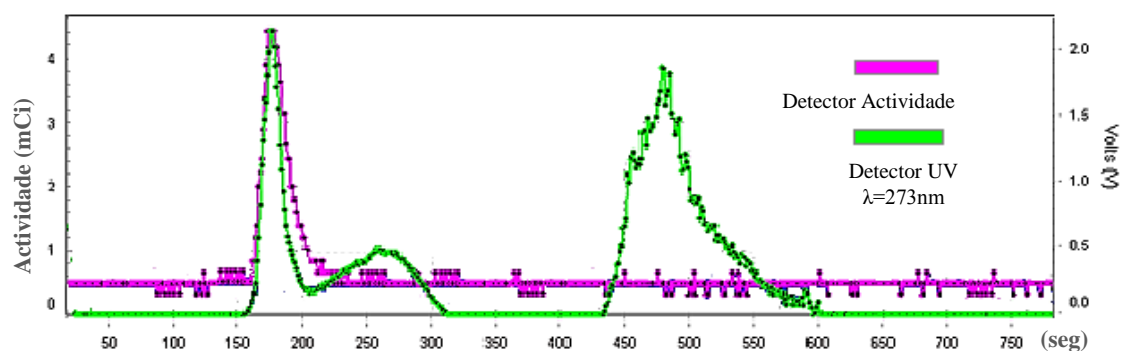


Figura 3.16. Cromatograma obtido durante a purificação da porfirina **41a** marcada com flúor-18, usando o HPLC com coluna semi-preparativa.

Seguindo o sinal de actividade da amostra, é possível observar entre os 150-200 segundos o pico intenso do flúor-18 livre e constatar que a actividade restante é muito baixa. No entanto, sabendo o tempo de retenção esperado para o produto fluorado, recolheu-se uma fracção entre os 250-300 segundos, procedendo-se em seguida a um novo controlo analítico e pela análise do cromatograma obtido (Figura 3.17), observa-se que a fracção recolhida não correspondia ao produto marcado esperado, o que se pode dever ao baixo rendimento da marcação deste e conseqüente insuficiente actividade para se conseguir detectar no HPLC com coluna semi-preparativa. Salienta-se que, aquando da injeção da fracção recolhida para controlo analítico, foi possível observar um pico de absorção no UV-Visível correspondente ao produto de eliminação, porfirina **42** e detectada a actividade apenas do ião fluoreto livre ( $[^{18}\text{F}]$ ).

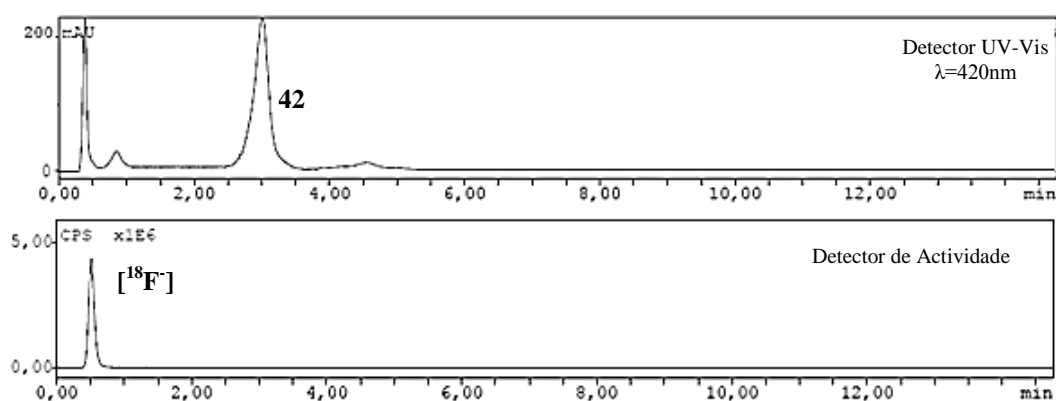


Figura 3.17. Cromatograma obtido em HPLC com coluna analítica, após purificação, usando 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 60%  $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$  e fluxo de 3 mL/min.

Com estes resultados, seguindo estas condições reaccionais, era de esperar concluir que estaríamos a favorecer a formação do produto de eliminação em vez do produto de substituição esperado. Decidimos diminuir a temperatura da reacção e quando repetimos a síntese a 80°C em vez de 100°C usados nas experiências de síntese anteriores, não obtivemos qualquer produto marcado, no entanto, foi detectado o sinal de actividade do [ $^{18}\text{F}$ ] livre, absorção no UV-Visível correspondente ao material de partida (porfirina **45**) e o produto de eliminação, porfirina **42** (Figura 3.18).

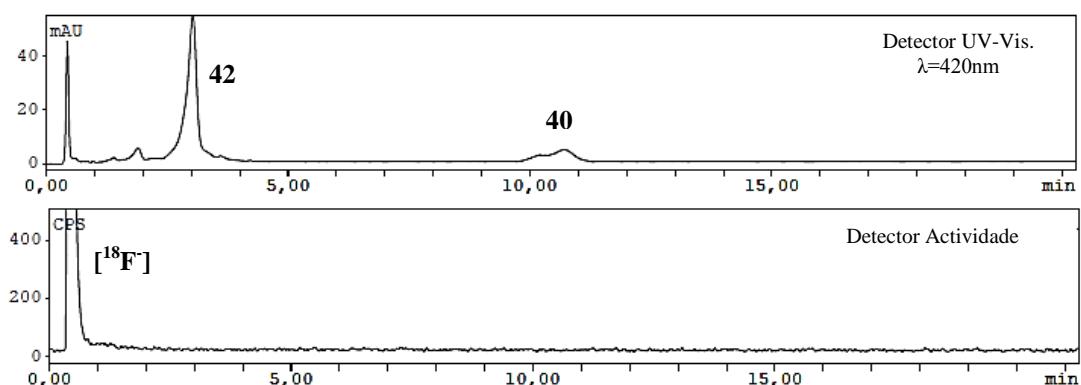


Figura 3.18. Cromatograma, obtido por HPLC analítico, da mistura reaccional após reacção com flúor-18, usando como temperatura 80°C - 40%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 60%  $\text{Et}_3\text{N}_{\text{aq}}$ , fluxo 3 mL/min

Resumindo, nesta secção foram optimizadas condições de síntese e purificação/separação por HPLC de *meso*-arilporfirinas não simétricas, em laboratório, precursoras da marcação radioactiva com flúor-18, desenvolvidas no ICNAS. Foram então sintetizadas a porfirinas marcadas **36a** e **36b**, esta última em módulo automático de síntese, com rendimentos entre 30-40% e pureza química superior a 95%. Estudos *in vivo* e *in vitro* foram efectuados demonstrando enorme potencial como agente de diagnóstico usando PET.

A derivatização com grupos sulfonamida foi efectuada eficientemente, com rendimentos superiores a 40%. A síntese do precursor com grupo tosilo na sua constituição, correspondente porfirina fluorada e a optimização da purificação/separação destes compostos por HPLC foi efectuada, no entanto a marcação

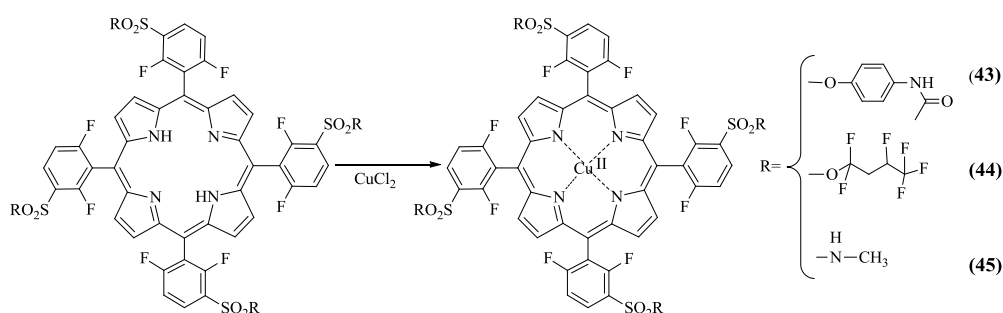
com flúor-18 demonstrou ser mais complexa, com formação predominante do produto de eliminação em vez da substituição com flúor-18.

### 3.6. Estudos preliminares de síntese de complexos de cobre (II) de porfirinas anfifílicas

Uma outra estratégia como alternativa à marcação com flúor-18, é a marcação radioactiva de porfirinas com radionuclídeos metálicos, nomeadamente o cobre-64, com um tempo de semi-vida de 768 minutos, de particular interesse já que permite seguir processos cinéticos mais longos do que os habitualmente estudados com os emissores de positrões mais comuns, como o carbono-11 ou o flúor-18 (tempo de semi-vida de 20 minutos e 110 minutos, respectivamente). A química de coordenação do cobre tornou-se interessante na marcação, tanto de pequenas moléculas, como de anticorpos, proteínas e nanopartículas. No ICNAS, o cobre-64 é produzido num ciclotrão IBA Cyclone 18/9, através da reacção nuclear  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ , em alvo de níquel-64. Após o bombardeamento, o cobre-64 é separado por intermédio de uma resina Eichrom e disponibilizado em solução acídica para posterior processamento.

Estando bem estabelecido que porfirinas formam facilmente complexos metálicos estáveis, em particular, com cobre (II), apenas misturando a porfirina com o sal deste metal, foram sintetizadas porfirinas anfifílicas complexadas com cobre (II), para servirem como modelo para estudos de marcação com cobre-64, para potencial aplicação destes novos compostos em imagiologia médica, nomeadamente, usando a técnica de PET. Deste modo, foram escolhidas porfirinas derivatizadas com grupos éster sulfónico, a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil]porfirina **16** e a *5,10,15,20-tetraquis*[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofeniloxissulfonil)fenil]porfirina **22** e a porfirina com grupos sulfonamida, a *5,10,15,20-tetraquis*(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirina **7**, sintetizadas anteriormente no Capítulo 2. Assim, numa experiência tipo, à porfirina **7**, dissolvida em DMF, foi adicionado cloreto de cobre (II) (1:5), deixando a mistura em agitação, à temperatura de 150°C, seguindo o evoluir da reacção por espectroscopia de UV-Visível. Após uma hora de reacção, o produto foi lavado com água (2x) e extraído com diclorometano. A fase orgânica foi

seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, purificando-se o crude por coluna de gel de sílica, usando como eluente acetato de etilo, obtendo-se no fim a 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirinato de cobre (II) **45**, com um rendimento de 95%. Desta forma foram também sintetizadas a 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutóxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) **44** e a 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenilóxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) **43**, com rendimentos de 90 e 94%, respectivamente (Esquema 3.12).



| Porfirina | Rendimento (%) |
|-----------|----------------|
| <b>43</b> | 94             |
| <b>44</b> | 90             |
| <b>45</b> | 95             |

Esquema 3.12. Síntese de complexos porfirínicos de cobre (II) e respectivos rendimentos de produto isolado.

Pela análise da tabela do Esquema 3.12 observa-se a eficiência na obtenção de complexos de cobre de porfirinas anfífilas, com rendimentos de produto isolado acima dos 90%. Estes resultados preliminares são indicativos de que porfirinas anfífilas desenvolvidas neste trabalho poderão ser usadas como precursoras para a formação de complexos de cobre-64, para posterior utilização como agentes de diagnóstico usando PET.



### 3.7. Conclusão

Neste Capítulo, foram sintetizados novos macrociclos tetrapirrólicos não simétricos de forma eficiente, alguns deles derivatizados com grupos anfifílicos. A estratégia de tosilação para desenvolver precursores para a marcação com flúor radioactivo, usando o grupo tosilo como bom grupo abandonante para a reacção de substituição nucleofílica, demonstrou ser um método eficaz para a obtenção de porfirinas marcadas com flúor-18.

Antes de se proceder à marcação das porfirinas foram efectuados estudos de optimização da reacção de fluoração “fria”, tendo-se obtido a porfirina fluorada **36**, a 5-(2-fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina com um rendimento de 85%. Após optimização dos métodos analíticos foi realizada a marcação radioquímica usando um método manual desenvolvido no laboratório do ICNAS e um módulo automático do centro CIC-bioMAGUNE de San Sebastian. Em ambos os casos foi possível obter um método de síntese eficiente para marcar a tosil-porfirina **35**, com rendimentos entre 30-40% de produto marcado com flúor-18 (5-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **36a**) e uma pureza radioquímica superior a 95% (calculado por HPLC). Esta porfirina **36a** foi utilizada em estudos *in vivo*, tendo sido observada uma biodistribuição rápida, com muito pouca captação nos tecidos cerebrais, pulmonares e musculares, e que a principal via de excreção é a hepática. Foram também realizados testes preliminares de captação em células de cancro da bexiga indiciando uma fase de captação crescente ao longo dos primeiros 45 minutos. Os resultados são promissores mas são necessários estudos adicionais *in vivo* para confirmar se esta captação ocorre em condições fisiológicas.

Salienta-se que os estudos da marcação radioactiva com flúor-18 de porfirinas não simétricas anfifílicas, contendo grupos sulfonamida na sua constituição, não conduziram aos resultados esperados uma vez que se obteve sempre um rendimento de produto “frio” e mesmo marcado muito baixo. Este resultado foi fundamentado com base na formação preferencial do produto de eliminação em detrimento do de substituição. Como alternativa a este método de marcação radioquímica de compostos anfifílicos, foram sintetizados em laboratório complexos de cobre (II) de algumas das porfirinas

contendo grupos sulfonamida ou éster sulfónico, desenvolvidas no Capítulo 2 (5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirinato de cobre (II) **45**, 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutóxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) **44** e 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamido fenilóxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) **43**) com rendimentos superiores a 90%. Estes resultados preliminares de síntese de complexos de cobre “*frios*” são altamente promissores para promover a posterior marcação deste tipo de moléculas com cobre-64 com potencial utilização em Imagiologia por PET. Este tema está em continuação num projecto de colaboração entre o ICNAS e o grupo de Catálise & Química Fina do departamento de química da UC.

## Bibliografia

- <sup>1</sup> Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Mendonça A. F., Pegado I. N., Duarte R. Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 3878.
- <sup>2</sup> Kim D. W., Jeong H.-J., Lim S. T., Sohn M.-H., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 432.
- <sup>3</sup> Kim D. W., Ahn D.-S., Oh Y.-H., Lee S., Kil H. S., Oh S. J., Lee S. L., Kim J. S., Ryu J. S., Moon D. H., Chi D. Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 16394.
- <sup>4</sup> Yu S., *Biomed. Imaging Interv. J.*, **2006**, 2, 57.
- <sup>5</sup> Kim D. W., Jeong H.-J., Lim S. T., Sohn M.-H., Katzenellenbogen J. A., Chi D. Y., *J. Org., Chem.*, **2008**, 73, 957.
- <sup>6</sup> Ouchi M., Inoue Y., Liu Y., Nagamune S., Nakamura S., Wada K., Hakushi T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 1260.
- <sup>7</sup> Das B., Reddy V. S., Reddy R. M., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 6717.
- <sup>8</sup> Kazemi F., Massah A. R., Javaherian M., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 5083.
- <sup>9</sup> Hoogenboom R., Fijten M. W. M., Kickelbick G., Schubert U. S., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2010**, 6, 773.
- <sup>10</sup> Pajouhesh H., Lenz G. R., *Neurotherapeutics*, **2005**, 2, 541.
- <sup>11</sup> Mitragotri S., *J. Pharm. Sci.*, **2007**, 96, 1832.
- <sup>12</sup> Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J., *J. Comb. Chem.*, **1999**, 1, 55.
- <sup>13</sup> Lombardo F., Shalaeva M. Y., Tupper K. A., Gao F., *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 2490.
- <sup>14</sup> Pereira D. G., *Quim. Nova*, **2007**, 30, 171.
- <sup>15</sup> Hawkins G. S., *J. Pharm. Sci.*, **1986**, 75, 378.
- <sup>16</sup> Guy R. H., Hadgraft J., *Pharma. Res.*, **1988**, 5, 753.
- <sup>17</sup> Sobral A. J. F. N., Eléouet S., Rousset N., Gonsalves A. M. R., Le Meur O., Bourré L., Patrice T., *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2002**, 6, 456.
- <sup>18</sup> Monteiro C. J. P., Pereira M. M., Pinto S. M. A., Simoes A. V. C., Sá G. F. F., Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Wyatt M. F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 5132.
- <sup>19</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões A. V. C., Pinto S. M. A., Abreu A. R., Sá G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L. B., Dabrowski J. M., Formosinho S. J., Simões S., Arnaut L. G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545.

<sup>20</sup> Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões A. V. C., Pinto S. M. A., Arnaut L. G., Sá G. F. F., Silva E. F. F., Rocha L. B., Simões S., Formosinho S. J., *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2009**, 13, 567.

<sup>21</sup> Dabrowski J. M, Arnaut L. G., Pereira M. M., Urbanska K., Stochel G., *Med. Chem. Commun.*, **2012**, 3, 502.

# **Capítulo 4**

## **Parte Experimental**



Este capítulo encontra-se dividido em três secções. Na primeira, secção 4.1, está descrita a instrumentação, os reagentes e solventes utilizados nos Capítulos 2 e 3; na segunda secção, secção 4.2 está descrita a síntese e caracterização de todos os compostos sintetizados no Capítulo 2. A terceira secção, 4.3, refere-se aos compostos sintetizados e apresentados no Capítulo 3.

## 4.1. Instrumentação

### I. Pontos de fusão

Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados num microscópio de capilar *Electrothermal-Melting Point Apparatus*, do Departamento de Química da Universidade de Coimbra. De salientar que nenhum dos compostos da família das porfirinas fundiu a temperaturas inferiores a 250°C.

### II. Análise Elementar

A análise de carbono, hidrogénio e azoto foi efetuada num analisador *Thermo Finnigan modelo Flash 1112*, da Unidade de Análisis Elemental da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

### III. Espectrometria de Massa

Os espectros de massa foram adquiridos num espectrómetro *Bruker Daltonics flexAnalysis Spectrometer* pertencente à Unidade de Masas e Proteómica da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Como técnicas de ionização, utilizou-se MALDI-TOF (recorrendo à matriz 2-[(2E)-3-(4-*tert*-butilfenil)-2-metilprop-2-enilidene]malononitrilo (DCTB)), e no caso de massas exactas, utilizou-se a técnica de ESI-TOF.

#### IV. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton ( $^1\text{H}$ ) foram obtidos num espectrómetro Bruker 400 MHz e o padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de flúor ( $^{19}\text{F}$ ) foram obtidos num espectrómetro Bruker 376,5 MHz, do Departamento de Química de Coimbra. Foi usado como referência TFA a  $\delta = -76,2$  ppm. Os desvios químicos atribuídos para cada composto foram obtidos, consoante a solubilidade dos compostos em clorofórmio ou metanol deuterado.

#### V. Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível

Os espectros de UV-Visível para controlo directo das reacções e determinação de  $\epsilon$  foram obtidos num espectrofotómetro Hitachi U-2001, do Departamento de Química, usando células de vidro com 1 cm de percurso óptico.

#### VI. Fluorescência

Os estudos de Fluorescência para determinação de coeficientes de partição octanol/água foram realizados num espectrofluorímetro *Jobin Yvon-Spex-Fluorolog 3-2.2*, usando células de quartzo de 4 faces e percurso óptico de 1 cm. Os espectros de emissão de fluorescência foram traçados usando intervalos de medição e de tempo de 1 nm por 1s de integração.

#### VII. Cromatografia em camada fina

O controlo das reacções foi feito por cromatografia em camada fina (tlc, do inglês “*thin layer chromatography*”), usando placas de sílica 60 (Merk), com indicador de



fluorescência UV<sub>254</sub>. A escolha do eluente (fase móvel) depende do composto em causa e encontra-se descrito na respectiva secção experimental.

## VIII. Cromatografia em coluna

A purificação de todos os compostos sintetizados foi realizada por cromatografia em coluna. Esta cromatografia foi efetuada em gel de sílica 60 (Merck) usando como eluente o solvente apresentado, em cada exemplo, na respectiva secção experimental.

## IX. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram obtidas num cromatógrafo *Agilent 1100 series*, equipado com um detector *Agilent 1100 series*, a comprimento de onda variável dependendo da experiência. Foi usado como fase estacionária uma coluna *Agilent Technologies Zorbax ODS, 5 μm, 4.6 x250 nm*, a fluxo e fase móvel variável dependendo do material injectável. O volume da amostra injectado foi de 20 μL ( $V_{m\acute{a}x}=30 \mu\text{L}$ ). As medições foram repetidas pelo menos 3 vezes para fiabilidade do resultado.

## X. Ultrassons

Com o objectivo de facilitar a dissolução dos compostos foi utilizado um banho de ultrassons *Bandelin Sonorex TK52*, do Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

## XI. Módulo automático de síntese com flúor-18

A marcação com flúor-18, em módulo automático, foi realizada, no centro CICbioMAGUNE, em San Sebastian-Espanha, equipado com um ciclotrão IBA Cyclone 18/9 e um módulo automático de síntese TracerLab FX-FN, com um detector

UV (254 nm) KNAUER-200, uma coluna cromatográfica *Phenomenex Luna C18*, 5 $\mu$ m, 10x250mm. O controlo analítico do produto da reacção de marcação foi realizado num HPLC *Agilent Technologies 1200 series*, com detector UV-Visível *Agilent Technologies 1200 series*, um detector de actividade Raytest Gabi Star e uma coluna cromatográfica *Halo C18*, 5 $\mu$ m, 4.6x100mm.

Os reagentes foram utilizados directamente tal como fornecidos pela Sigma-Aldrich, Fluka e/ou Acros Organics. Solventes, tais como, ácido acético glacial, ácido clorídrico comercial (37%) foram fornecidos pela *José M. Vaz Pereira*; nitrobenzeno e ácido clorossulfónico, foram usados tal como foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Solventes usados nas colunas cromatográficas e solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD) utilizados nos espectros de ressonância magnética de protão e flúor, foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Clorofórmio, diclorometano, DMF, trietilamina, THF, foram destilados e/ou secos, de acordo com o procedimento descrito na literatura<sup>1</sup>, devido à presença de impurezas que poderiam prejudicar o processo de síntese e/ou as medições espectroscópicas.

## 4.2 Secção Experimental referente ao Capítulo 2. Síntese e caracterização estrutural

### 4.2.1. Síntese de *meso-tetraquisporfirinas* fluoradas

#### (A) Procedimento geral de síntese *via* método do nitrobenzeno

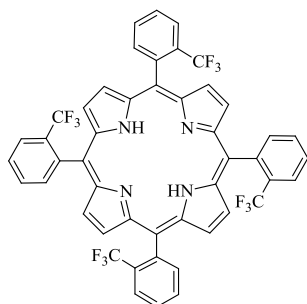
Este método de síntese de *meso-tetraquisarilporfirinas*, desenvolvido por Pereira *et al*<sup>2</sup> foi o escolhido para a síntese das porfirinas base. Assim, a uma mistura de ácido acético glacial (140 mL) e nitrobenzeno (70 mL) foi adicionado o arilaldeído pretendido (43 mmol). Aqueceu-se a mistura até 120° C e adicionou-se lentamente o pirrol (43 mmol). Deixou-se em agitação durante uma hora. Após arrefecimento até à temperatura

ambiente, e para maximizar a precipitação do produto, adicionou-se cerca de 50 mL de metanol, deixando-se em repouso durante 24 horas. O precipitado foi filtrado e lavado com metanol, secando-se os cristais de porfirina obtidos na estufa. Para as porfirinas que não precipitam no meio reaccional foi necessário evaporar, a pressão reduzida, o nitrobenzeno e o ácido acético, purificando-se de seguida por cromatografia em coluna de gel de sílica, iniciando-se a eluição com éter de petróleo, seguido de uma mistura de diclorometano:éter de petróleo (1:1) e terminando com diclorometano.

Nesta secção, as porfirinas *5,10,15,20-tetraquis(2-fluorofenil)porfirina 1* e *5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluorofenil)porfirina 2* foram sintetizadas segundo o método do nitrobenzeno. A sua purificação, caracterização e rendimentos obtidos encontram-se de acordo com a literatura.<sup>3,4</sup>

### *5,10,15,20-tetraquis(2-trifluorometilfenil)porfirina (3)*

Usando 7,49g de 2-trifluorometilbenzaldeído e pirrol 2,20 mL, obtiveram-se 307 mg de cristais da porfirina **3**, com um rendimento de 13%.



**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,51 (s, 8H,  $\beta$ -H); 8,16-8,11 (m, 8H, Ar-H); 7,93-7,79 (m, 8H, Ar-H); -2,72 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -57,47 a -57,60 (m, 12F)

**E.Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtido: 887,2022;

$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda$ máx) (tolueno): 1,6x10<sup>5</sup> (415 nm); 2,1x10<sup>4</sup> (508 nm); 3,2x10<sup>3</sup> (539 nm); 6,2x10<sup>3</sup> (586 nm); 1,9x10<sup>3</sup> (654 nm)

## 4.2.2. Derivatização de *meso-tetraquisarilporfirinas fluoradas*

As *meso-tetraquisarilporfirinas* fluoradas foram derivatizadas *via* clorossulfonação com ácido clorossulfónico, pelo método descrito por Pereira *et al*.<sup>3,5</sup> resultando a *5,10,15,20-tetraquis(2-fluoro-5-clorossulfonilfenil)porfirina 4* e a

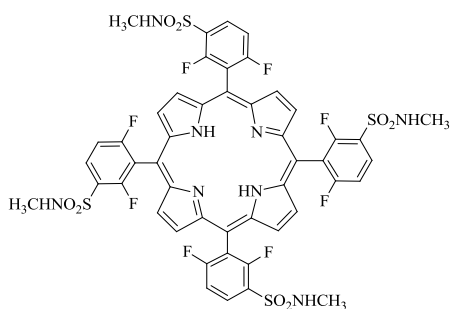
5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-5-clorossulfonilfenil)porfirina **5**, para posterior reacção com os nucleófilos pretendidos.

### (B) Procedimento geral de síntese de sulfonamidas<sup>3,6</sup>

A uma amostra de porfirina clorossulfonada, previamente dissolvida em 100 mL de diclorometano, adicionou-se a amina de interesse (40 equivalentes.). A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 3 horas (a reacção foi controlada por tlc). Após o término da reacção, lavou-se o produto com uma solução de ácido clorídrico 1M (3x), com uma solução de bicarbonato de sódio (2x) e de seguida com água (2x). Recolheu-se a fase orgânica e secou-se com sulfato de sódio anidro durante 1 hora. Depois de filtrar e evaporar o solvente o crude foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente uma mistura de diclorometano e acetato de etilo, com a proporção adequada a cada uma das porfirinas resultantes. A porfirina 5,10,15,20-tetraquis(2-fluoro-5-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirina **6** foi sintetizada segundo este método e a sua purificação, total caracterização e rendimento de reacção encontra-se de acordo com o descrito na literatura.<sup>3</sup>

### 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)porfirina (**7**)

Adicionou-se metilamina (0,6 ml; 1,2 mmol) em solução de THF (2M) à porfirina **5** (100 mg; 0,1 mmol). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente diclorometano:acetato de etilo (2:1). Obteve-se assim 72 mg da porfirina **7**, com um rendimento de 71%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,83 (s, 8H, β-H); 8,44-8,38 (m, 4H, Ar-H); 7,54-7,43 (m, 4H, Ar-H); 4,76 (s, 4H, NHCH<sub>3</sub>); 2,89-2,83 (m, 12H, -CH<sub>3</sub>); -2,86 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -98,50 a -98,54 (m, 4F); -104,12 a -104,18 (m, 4F)

**E. Massa** (MALDI-TOF) [M]<sup>+</sup>, m/z: 1130,1

(C<sub>48</sub>H<sub>34</sub>F<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S<sub>4</sub>): calculado (%): C 48,65; H 3,20; N 9,45. Obtido (%): C 48,42; H 2,94; N 9,29

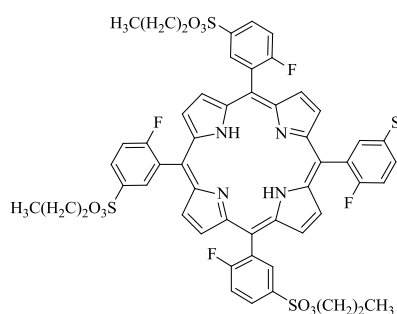
$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (tolueno): 1,7x10<sup>5</sup> (416 nm); 1,3x10<sup>4</sup> (509 nm); 2,1x10<sup>3</sup> (540 nm); 3,9x10<sup>3</sup> (586 nm); 9,4x10<sup>2</sup> (648 nm)

### (C) Procedimento geral de síntese de ésteres sulfônicos

A uma mistura previamente preparada num balão, em banho de gelo, com o álcool pretendido (40 equivalentes) dissolvido em 2 mL de THF, uma solução de NaOH (8 equivalentes) em H<sub>2</sub>O (2 mL), previamente em agitação durante 15-20 minutos, é adicionada a porfirina clorossulfonada (1 equivalente), dissolvida em 4 mL de THF seco. Deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 1 hora, sendo a reacção controlada por tlc. O produto foi colocado em cerca de 50 mL de diclorometano, lavado com água destilada (3x) e seco com sulfato de sódio anidro. Após filtração, o solvente foi concentrado por evaporação e o produto obtido purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e diclorometano como eluente.

#### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(3-propoxissulfonil)fenil]porfirina (8)

À mistura de 1-propanol (0,3mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol), adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 102 mg de porfirina **8**, com um rendimento de 94%.



**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , ppm: 8,81 (s, 8H,  $\beta$ -H); 8,76-8,70 (m, 4H, Ar-H); 8,45-8,41 (m, 4H, Ar-H); 7,76-7,72 (m, 4H, Ar-H); 4,29 (t,  $J=6,4$ Hz, 8H, -OCH<sub>2</sub>); 1,88-1,79 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>); 1,02 (t, 12H,  $J=7,6$ Hz, CH<sub>3</sub>); -2,84 (s, 2H, -NH)

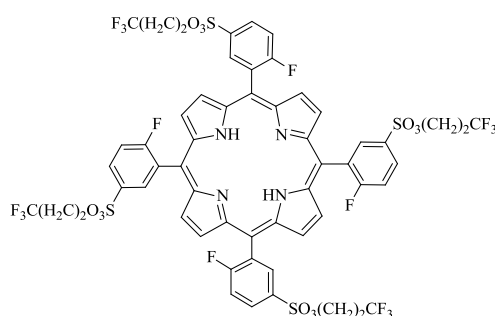
**RMN** <sup>19</sup>F (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , ppm: -100,09 a -100,20 (m, 4F)

**E. Massa HRMS-ESI-TOF** [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 175,2281; calculada para [C<sub>56</sub>H<sub>52</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>]: 1175,2244

$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol): 2,2x10<sup>5</sup> (418 nm); 1,3x10<sup>4</sup> (511 nm); 2,4x10<sup>3</sup> (542 nm); 3,8x10<sup>3</sup> (587 nm); 5,9x10<sup>2</sup> (644 nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(3,3,3-trifluoropropoxissulfonil)fenil]porfirina (9)**

À mistura de 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (0,3mL; 4 mmol) dissolvido em THF e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol), adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 124 mg da porfirina **9**, com um rendimento de 96%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,80 (s, 8H,  $\beta$ -H); 8,76-8,72 (m, 4H, Ar-H); 8,45-8,43 (m, 4H, Ar-H); 7,80-7,75 (m, 4H, Ar-H); 4,51 (t,  $J=6.0$ Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>); 2,69-2,63 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>); -2,85 (s, 2H, -NH)

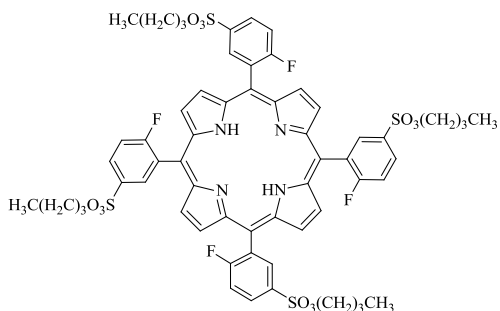
**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -63,73 (s, 12F, -CF<sub>3</sub>); -98,94 a -99,05 (m, 4F, Ar-F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 1391,1186; calculada para [C<sub>56</sub>H<sub>40</sub>F<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>] 1391,1114

$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol): 2,8x10<sup>5</sup> (418 nm); 1,7x10<sup>4</sup> (510,5 nm); 3,5x10<sup>3</sup> (542 nm); 5,4x10<sup>3</sup> (586,5 nm); 7,3x10<sup>2</sup> (642,5 nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(3-butoxissulfonil)fenil]porfirina (10)**

À mistura de butan-1-ol (0,3mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 102 mg de porfirina **10**, com um rendimento de 89%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,80-8,72 (m, 8H,  $\beta$ -H + 4H, Ar-H); 8,44-8,41 (m, 4H, Ar-H); 7,76-7,72 (m, 4H, Ar-H); 3,76-3,73 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>); 1,87-1,76 (m, 20H, -CH<sub>2</sub>- + -CH<sub>3</sub>); -2,84 (s, 2H, NH)

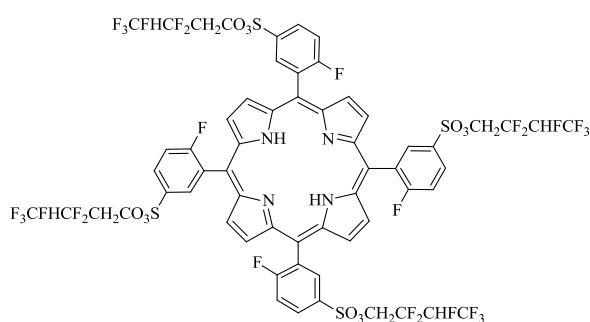
**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -100,09 a -100,21 (m, 4F, Ar-F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[M+H]^+$ , m/z obtida:1230,2750; calculada para  $[C_{60}H_{59}F_4N_4O_{12}S_4]$  1230,2870

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $1,1 \times 10^5$  (415 nm);  $2,8 \times 10^4$  (508 nm);  $3,1 \times 10^3$  (539 nm);  $6,6 \times 10^3$  (586 nm);  $1,8 \times 10^3$  (654 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil]porfirina (11)

À mistura de 2,2,3,4,4,4-hexafluorobutan-1-ol (0,5mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 130 mg de porfirina **11**, com um rendimento de 84%.



**RMN  $^1H$**  (400 MHz) ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,78-8,74 (m, 8H,  $\beta$ -H + 4H, Ar-H); 8,47-8,45 (m, 4H, Ar-H); 7,82-7,78 (m, 4H, Ar-H); 5,10-4,96 (m, 4H,  $CH_2$ -F); 4,70-4,55 (m, 8H, -OCH $_2$ ); -2,85 (s, 2H, NH)

**RMN  $^{19}F$**  (376,5 MHz) ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , ppm: -73,89 a -73,99 (m, 12F,  $CF_3$ ); -97,77 a

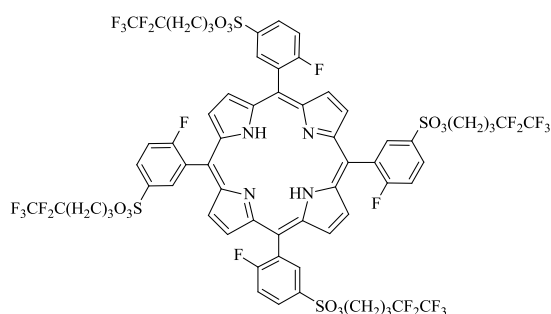
-97,87 (m, 4F, Ar-F); -113,02 a -119,64 (m, 12F,  $CF_2$ ); -211,10 a -211,20 (m, 4F, CFH)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[M+H]^+$ , m/z obtida: 1663,0679; calculada para  $[C_{60}H_{36}F_{28}N_4O_{12}S_4]$ : 1663,0609

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $2,8 \times 10^5$  (417,5 nm);  $1,7 \times 10^4$  (510 nm);  $3,4 \times 10^3$  (541,5 nm);  $5,4 \times 10^3$  (586 nm);  $7,3 \times 10^2$  (642,5 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloxisulfonil)fenil]porfirina (12)

À mistura de 4,4,5,5,5-pentafluoropentan-1-ol (0,5mL, 4 mmol), dissolvido em THF e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 145 mg de porfirina **12**, com um rendimento de 95%



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,79 (s, 8H, β-H); 8,75-8,69 (m, 4H, Ar-H); 8,46-8,42 (m, 4H, Ar-H); 7,77 (t, *J*=8Hz, 4H, Ar-H); 4,39 (t, *J*=5,6Hz, 8H, -OCH<sub>2</sub>); 2,30-2,20 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>); 2,16-2,11 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); -2,84 (s, 2H, NH)

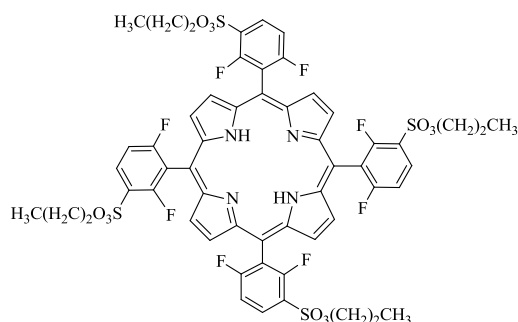
**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -84,31 (s, 12F, CF<sub>3</sub>); -99,27 a -99,47 (m, 4F, Ar-F); -116,99 (s, 8F, CF<sub>2</sub>)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtido: 1647,1533; calculada para [C<sub>64</sub>H<sub>48</sub>F<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>] 1647,1612

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 3,1x10<sup>5</sup> (418 nm); 1,9x10<sup>4</sup> (511 nm); 4,0x10<sup>3</sup> (543 nm); 5,9x10<sup>3</sup> (587 nm); 1,2x10<sup>3</sup> (644 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(3-propoxissulfonyl)fenil]porfirina (13)

À mistura de propan-1-ol (0,30 mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 90 mg de porfirina **13** de 78%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,85 (s, 8H, β-H); 8,49 (q, *J*=7,6Hz, 4H, Ar-H); 7,58 (t, *J*=6,4Hz, 4H, Ar-H); 4,38-4,34 (m, 8H, -OCH<sub>2</sub>); 1,85-1,76 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>); 0,97 (t, *J*=7,6Hz, 12H, -CH<sub>3</sub>); -2,83 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -94,66 a -95,82 (m, 4F); -98,88 a -99,57 (m, 4F)

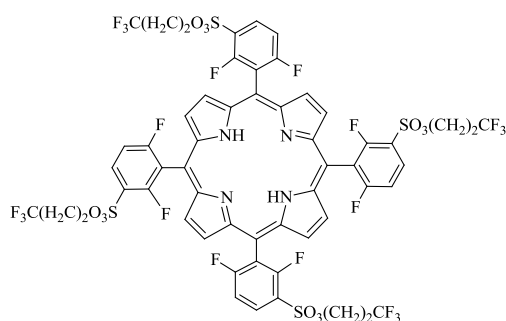
**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 1247,1957; calculada para [C<sub>56</sub>H<sub>48</sub>F<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>]: 1247,1940.

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 2,2x10<sup>5</sup> (417 nm); 1,6x10<sup>4</sup> (509 nm); 2,7x10<sup>3</sup> (541,5 nm); 5,0x10<sup>3</sup> (585,5 nm); 1,7x10<sup>3</sup> (645,5 nm)



### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(3,3,3-trifluoropropoxissulfonil)fenil]porfirina (14)

À mistura 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (0,31mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 98 mg de porfirina **14**, com um rendimento de 85%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,84 (s, 8H, β-H); 8,50 (m, 4H, Ar-H); 7,61 (t, *J*=8Hz, 4H, Ar-H); 4,58 (t, *J*=6Hz, 8H, -OCH<sub>2</sub>); 2,67-2,57 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>); -2,84 (s, 2H, NH)

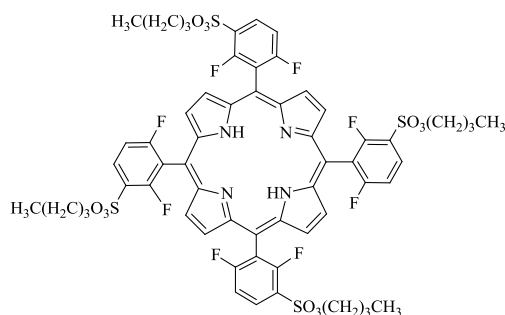
**RMN <sup>19</sup>F** (376.5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -63,83 a -63,86 (m, 12F, CF<sub>3</sub>); -93,69 a -94,22 (m, 4F, Ar-F), -98,78 a -98,94 (m, 4F, Ar-F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* obtida: 1463,0828; calculada para [C<sub>56</sub>H<sub>36</sub>F<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>]: 1463,0737

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 2,2x10<sup>5</sup> (417 nm); 1,3x10<sup>4</sup> (509 nm); 3,5x10<sup>3</sup> (541,5 nm); 3,8x10<sup>3</sup> (585 nm); 1,3x10<sup>3</sup> (648 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(3-butoxissulfonil)fenil]porfirina (15)

À mistura de butan-1-ol (0,32mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 93 mg de porfirina **15**, com um rendimento de 82%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,89 (s, 8H, β-H); 8,59-8,54 (m, 4H, Ar-H); 7,67-7,64 (m, 4H, Ar-H); 3,77-3,74 (m, 8H, -OCH<sub>2</sub>); 2,18-2,16 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 1,87-1,84 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-), 1,27-1,25 (m, 12H, -CH<sub>3</sub>); -2,82 (s, 2H, -NH)

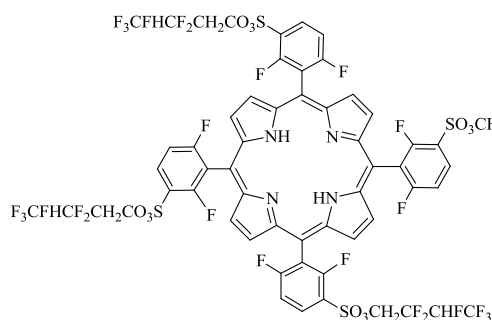
**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -90,74 a -91,14 (m, 4F), -97,15 a -97,48 (m, 4F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[M+H]^+$  m/z obtida: 1303,2483; calculada para  $[C_{60}H_{56}F_8N_4O_{12}S_4]$ : 1303,2493

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $3,2 \times 10^5$  (418 nm);  $1,2 \times 10^4$  (508 nm);  $3,5 \times 10^3$  (542 nm);  $3,8 \times 10^3$  (585 nm);  $1,3 \times 10^3$  (648 nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil] porfirina (16)**

À mistura de 2,2,3,4,4,4-hexafluorobutan-1-ol (0,1mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em água, adicionou-se porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 93 mg de porfirina **16**, com um rendimento de 81%.



**RMN  $^1H$**  (400 MHz) ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , ppm:  
8,81 (s, 8H,  $\beta$ -H); 8,52-8,49 (m, 4H, Ar-H);  
7,67-7,50 (m, 4H, Ar-H); 5,01-4,87 (m,  
4H, -CHF); 4,72-4,63 (m, 8H,  $CH_2$ ); -2,80  
(s, 2H, NH)

**RMN  $^{19}F$**  (376,5 MHz) ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , ppm  
-72,91 a -74,13 (m, 12F,  $CF_3$ ); -92,47 a

-93,43 (m, 4F, Ar-F); -98,73 a -99,88 (m, 4F, Ar-F); -113,19 a -120,32 (m, 8F,  $CF_2$ ); -211,19  
(s, 4F, CF-H)

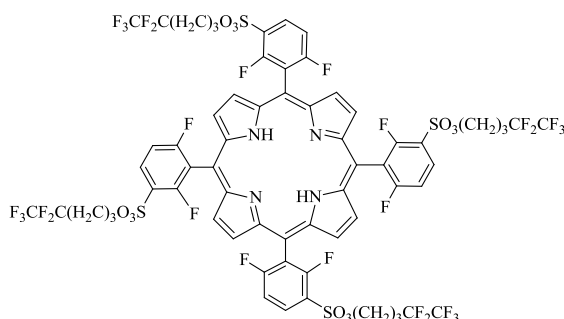
**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[M+H]^+$  m/z obtida: 1734,9030; calculada para  $[C_{60}H_{31}F_{32}N_4O_{12}S_4]$ : 1734,0232.

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $2,3 \times 10^5$  (416 nm);  $1,6 \times 10^4$  (509 nm);  $2,6 \times 10^3$  (542,5 nm);  $5,0 \times 10^3$  (586,5 nm);  $8,0 \times 10^2$  (648 nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloxisulfonil)fenil] porfirina (17)**

À mistura de 4,4,5,5,5-pentafluoropentan-1-ol (0,46 mL; 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mol) em água, deixando-se em

agitação durante 30 minutos, adicionou-se porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol). Obteve-se 94 mg de porfirina **17**, com um rendimento de 82%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,79 (sl, 8H, β-H); 8,50-8,43 (m, 4H, Ar-H), 7,57-7,54 (m, 4H, Ar-H); 4,39 (s, 4H, -OCH<sub>2</sub>); 2,14-1,93 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub> + 8H, -CH<sub>2</sub>-); -2,90 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -84,33 a -84,46 (m, 12F, -CF<sub>3</sub>); -91,08 a -91,30 (m, 4F, Ar-F); -98,99 a -99,39 (m,

4F, Ar-F); -117,00 a -117,19 (m, 8F, CF<sub>2</sub>)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> m/z obtida: 1718,2811; calculada para [C<sub>64</sub>H<sub>43</sub>F<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>] 1718,1235

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 3,0x10<sup>5</sup> (417 nm); 2,0x10<sup>4</sup> (509 nm); 3,1x10<sup>3</sup> (541 nm); 4,3x10<sup>3</sup> (586 nm); 1,2x10<sup>3</sup> (650 nm)

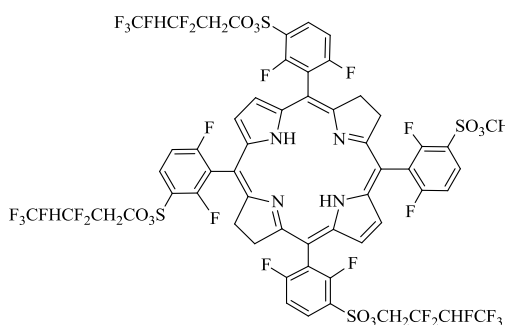
### 4.2.3. Síntese de *meso-tetraquis*arilbacterioclorinas e clorinas fluoradas

#### (D) Procedimento geral de síntese de bacterioclorinas pelo método sem solvente<sup>7</sup>

Misturou-se a porfirina fluorada desejada com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (30 equivalentes) até formar um fino pó. Introduziu-se o pó num reactor de aço e manteve-se em atmosfera inerte durante cerca de 1 hora. Posteriormente, aqueceu-se a mistura a 140°C durante 10 minutos. Depois de completa a reacção, deixou-se o reactor arrefecer até atingir a temperatura ambiente. O resíduo sólido obtido foi posteriormente purificado por coluna de gel de sílica usando como eluente o apropriado para cada uma das bacterioclorinas sintetizadas.

#### **5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil] bacterioclorina (18)**

Uma mistura, em pó, de porfirina **16** (15 mg; 0,01 mmol) com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (58 mg; 0,30 mmol) foi introduzida no reator. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente, primeiro diclorometano/éter de petróleo (1:3), e depois apenas diclorometano para recolher o produto. Obteve-se 13 mg da bacterioclorina **18**, com um rendimento de 84%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm:  
 8,34-8,31 (m, 4H, β-H); 8,00 (s 1, 4H, Ar-H); 7,52-7,50 (m, 4H, Ar-H); 5,01-4,86 (m, 4H, -CHF); 4,60-4,40 (m, 8H, β-H); 4,15-4,03 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); -1,33 (s, 2H, NH)  
**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm  
 -72,96 a -74,45 (m, 12F, CF<sub>3</sub>); -94,52 a -95,41 (m, 4F, Ar-F); -100,52 a -102,66

-100,52 a -102,66 (m, 4F, Ar-F); -114,21 (m, 8F, CF<sub>2</sub>); -211,19 (s, 4F, CF-H)

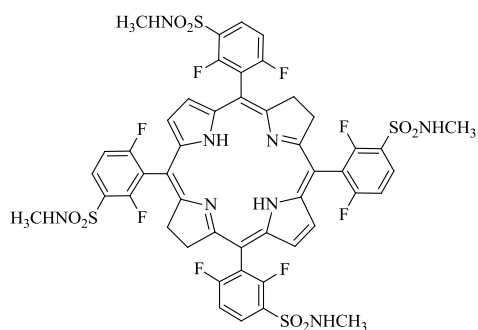
**E. Massa** (MALDI-TOF) [M]<sup>+</sup> 1738,063

(C<sub>60</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>F<sub>32</sub>S<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O):calculado (%) C 36,86; H 2,99; N 2,87; S 5,56; Obtido (%): C 37,93; H 3,38; N 2,66; S 6,26

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 6,4x10<sup>4</sup> (345,5 nm); 6,6x10<sup>4</sup> (372,5 nm); 2,8x10<sup>4</sup> (505 nm); 5,6x10<sup>4</sup> (745 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoílfenil)bacterioclorina (**19**)

Uma mistura, em pó, de porfirina **7** (15 mg; 0,01 mmol) com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (58 mg; 0,30 mmol) foi introduzida no reator. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente, primeiro diclorometano, e depois éter de petróleo/acetato de etilo (1:2) para recolher o produto. Obteve-se 12 mg de bacterioclorina **19**, com um rendimento de 86%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,32-8,26 (m, 4H, Ar-H); 8,04 (s 1, 4H,  $\beta$ -H); 7,45-7,41 (m, 4H, Ar-H); 4,67-4,65 (m, 4H, -NHCH<sub>3</sub>); 4,07 (s, 8H,  $\beta$ -H); 2,85 (s 1, 12H, -NHCH<sub>3</sub>); -1,36 (s, 2H, NH).

**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: -100,33 a -100,41 (m, 4F); -106,09 a -106,23 (m, 4F)

**E. Massa** (ESI-TOF)  $[\text{M}]^+$ , m/z: 1134,1

( $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{F}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ ): calculado (%): C 49,23; H 3,61; N 9,57; obtido (%): C 49,38; H 3,83; N 11,47

$\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol):  $7,5 \times 10^4$  (350 nm);  $8,1 \times 10^4$  (374,5 nm);  $3,3 \times 10^4$  (515 nm);  $7,8 \times 10^4$  (742,5 nm)

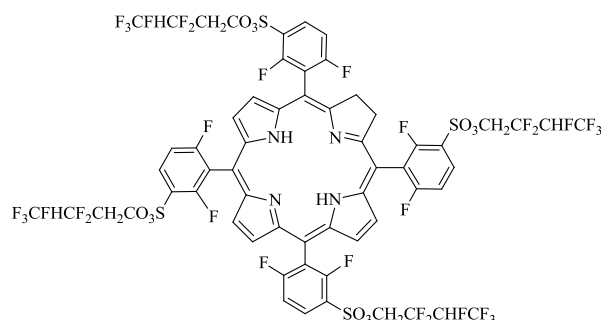
### (E) Procedimento geral de síntese de clorinas<sup>8</sup>

A síntese de clorinas foi efectuada em duas partes distintas. A primeira, redução com *p*-toluenossulfonil-hidrazida, foi efectuada segundo alterações ao método sem solvente, anteriormente descrito para a síntese de bacterioclorinas. A segunda parte, consistiu na oxidação do excesso de bacterioclorina obtido como sub-produto no primeiro passo, utilizando  $\text{FeCl}_3$  como catalisador e  $\text{H}_2\text{O}_2$  como oxidante. Assim, a porfirina com a estrutura pretendida e *p*-toluenossulfonil-hidrazida (15 equivalentes) foram misturadas num almofariz, tendo-se obtido um pó fino. Este foi introduzido num tubo de Schlenk que foi mantido sob vácuo (0.1Torr) durante 1 hora. O tubo foi aquecido a  $150^\circ\text{C}$  e mantido em agitação durante 10 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente o sólido resultante foi dissolvido e purificado por coluna de gel de sílica, usando o eluente apropriado. O composto obtido foi dissolvido em 10mL de DME, adicionou-se  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 equivalente) e a reacção foi mantida em agitação, à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se alíquotas de uma solução de peróxido de hidrogénio (3%), até se detectar, por espectroscopia de absorção UV-Vis, o total desaparecimento da banda de absorção característica da bacterioclorina (~750 nm). Nessa altura, o solvente é evaporado, o sólido redissolvido em acetato de etilo e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (4x) e água

destilada (2x). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e após filtração e evaporação do solvente, o crude foi purificado por coluna de gel de sílica usando o eluente apropriado.

### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxisulfonil)fenil]clorina (20)

Após reacção de redução parcial da porfirina **16**, sua purificação e isolamento, adicionou-se um total de 12mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio (3%). O produto foi purificado por coluna de gel de sílica usando como eleuente diclorometano. Obteve-se 6 mg de clorina **20**, com um rendimento de 63%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm:  
8,52 (s 1, 2H, β-H); 8,37-8,29 (m, 4H, Ar-H); 8,18 (s 1, 2H, β-H); 7,65 (s 1, 2H, β-H); 7,50-7,45 (m, 4H, Ar-H); 4,94-4,79 (m, 4H, β-H); 4,58-4,55 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 4,24-4,13 (m, 4H, -CH-); -1,53 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm:  
-72,94 (s, 12F, CF<sub>3</sub>); -93,00 a -94,87 (m, 4F, Ar-F); -99,31 a -100,45 (m, 4F, Ar-F);

-113,42 a -114,17 (m, 4F, CF<sub>2</sub>); -119,36 a -120,12 (m, 4F, CF<sub>2</sub>); -211,22 (s, 4F, CF)

**E. Massa** (MALDI-TOF) [M]<sup>+</sup> m/z: 1737,011

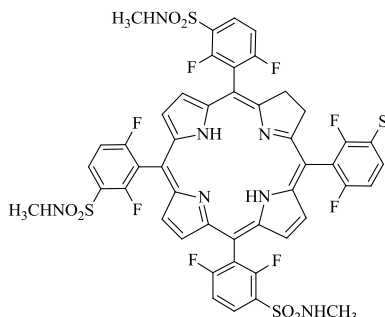
(C<sub>60</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>F<sub>32</sub>S<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O): calculado (%): C: 41,48; H: 1,86; N: 3,23; S: 7,38; Obtido (%): C: 39,83; H: 2,23; N: 3,10; S: 7,09

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 6,9x10<sup>4</sup> (406 nm); 7,1x10<sup>4</sup> (504,5 nm); 2,3x10<sup>3</sup> (600,5 nm); 2,1x10<sup>4</sup> (654,5 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-N-metilsulfamoílfenil)clorina (21)

Após reacção de redução parcial da porfirina **7**, sua purificação e isolamento, adicionou-se um total de 15mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio (3%). O produto foi purificado por coluna de gel de sílica usando como eluente uma mistura

de diclorometano:acetato de etilo (1:2). Obteve-se 8 mg de clorina **21**, com um rendimento de 72%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,57-8,55 (m, 2H, β-H); 8,33-8,21 (m, 4H, β-H + 4H, Ar-H); 7,41-7,36 (m, 4H, Ar-H); 4,81-4,79 (m, 4H, NH); 4,22-4,19 (m, 4H, β-H); 2,82-2,68 (m, 12H, -CH<sub>3</sub>); -1,49 (s, 2H, -NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -98,95 a -100,29 (m, 4F); -104,49 a -105,87 (m, 4F)

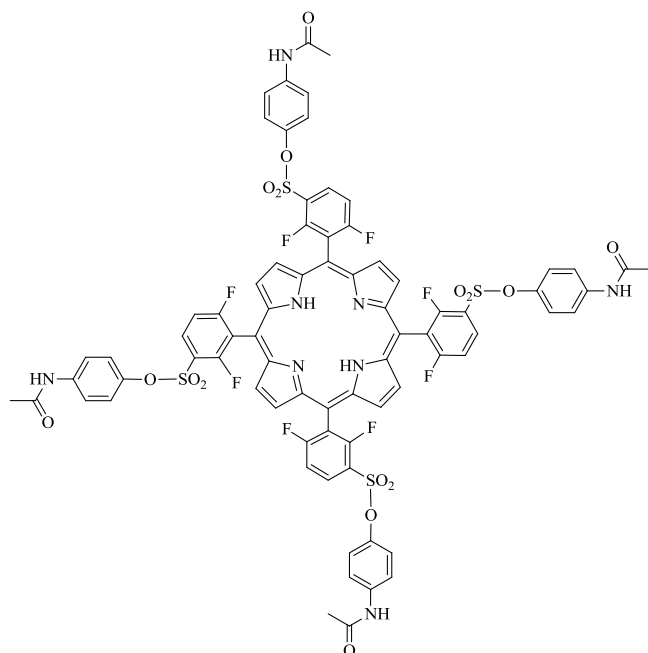
**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z: 1133,1453; calculado para [C<sub>48</sub>H<sub>37</sub>F<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>S<sub>4</sub>]: 1133,1484

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol)<sup>9</sup>:** 1,7x10<sup>5</sup> (408 nm); 1,6x10<sup>4</sup> (505 nm); 4,7x10<sup>3</sup> (600 nm); 4,4x10<sup>4</sup> (654 nm)

#### 4.2.4. Síntese de conjugados contendo macrociclos tetrapirrólicos

##### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonil)fenil]porfirina (**22**)

À mistura de paracetamol (acetamidofeno) (600 mg, 4 mmol), dissolvido em THF, e uma solução concentrada de NaOH (32 mg; 0,8 mmol) em 2 mL de água, previamente em agitação durante 30 minutos, adicionou-se a porfirina clorossulfonada **5** (115 mg; 0,1 mmol), dissolvida em 4 mL de THF seco. Deixou-se a reagir durante 1 hora e após reacção lavou-se o crude com água destilada (3x) e extraiu-se o produto com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e purificada por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente acetato de etilo. Obteve-se 137 mg de porfirina **22**, com um rendimento de 85%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: 9,03-8,92 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,51-8,47 (m, 4H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ); 7,74-7,70 (m, 12H, Ar- $\underline{\text{H}}$ + Ar- $\underline{\text{H}}$ <sub>paracet</sub>); 7,28 (d,  $J=7,1\text{Hz}$ , 8H, Ar- $\underline{\text{H}}$ <sub>paracet</sub>); 3,22-3,16 (m, 4H, -NH-CO); 2,11 (s, 12H, -CH<sub>3</sub>)

**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376.5 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: -96,22 (m, 4F, Ar- $\underline{\text{F}}$ ); -100,41 a -100,66 (m, 4F, Ar- $\underline{\text{F}}$ );

**E. Massa** (MALDI-TOF)  $[\text{M}]^+$  1611,202

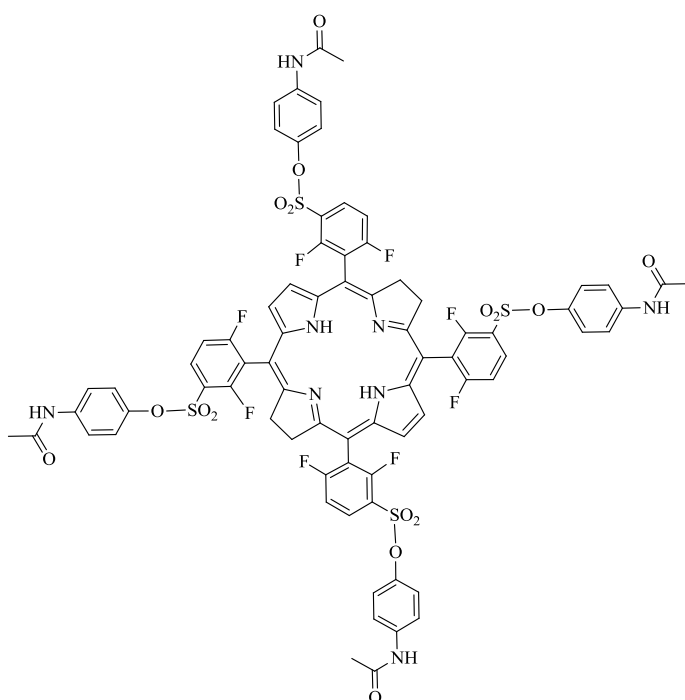
(C<sub>76</sub>H<sub>50</sub>F<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) calculado (%): C: 55,40; H: 3,30; N: 6,80; S: 7,78. Obtido (%): C: 55,64; H: 3,39; N: 6,33; S: 7,04

$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol): 2,2x10<sup>5</sup> (410 nm); 1,4x10<sup>4</sup> (504,5 nm); 1,9x10<sup>3</sup> (534,5 nm); 4,5x10<sup>3</sup> (582 nm); 6,8x10<sup>2</sup> (640 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofeniloxisulfonil)fenil]bacterioclorina (23)

Uma mistura, em pó, de porfirina **21** (15 mg; 0,01 mmol) com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (58 mg; 0,30 mmol) é introduzida no reactor e mantida em atmosfera inerte durante 1 hora. Seguidamente, a mistura é aquecida a 140°C, durante 10 minutos. O produto foi purificado, após arrefecimento do reactor até à temperatura ambiente, por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente primeiro diclorometano, e depois acetato de etilo para recolher o produto. Obteve-se 12 mg de bacterioclorina **23**, com um rendimento de 82%.





**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: 8,32 (s 1, 4H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,12-8,00 (m, 4H, Ar-H); 7,75-7,65 (m, 12H, Ar-H + Ar-H<sub>paracet</sub>); 7,25 (d,  $J=7,1\text{Hz}$ , 8H, Ar-H<sub>paracet</sub>); 3,69-3,60 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 3,54-3,50 (m, 4H, -N-H); 2,11 (s 1; 12H, CH<sub>3</sub>); -1,38 (s, 2H, NH)

**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376.5 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: -97.29 a -98.69 (m, 4F); -102.07 a -102.49 (m, 4F)

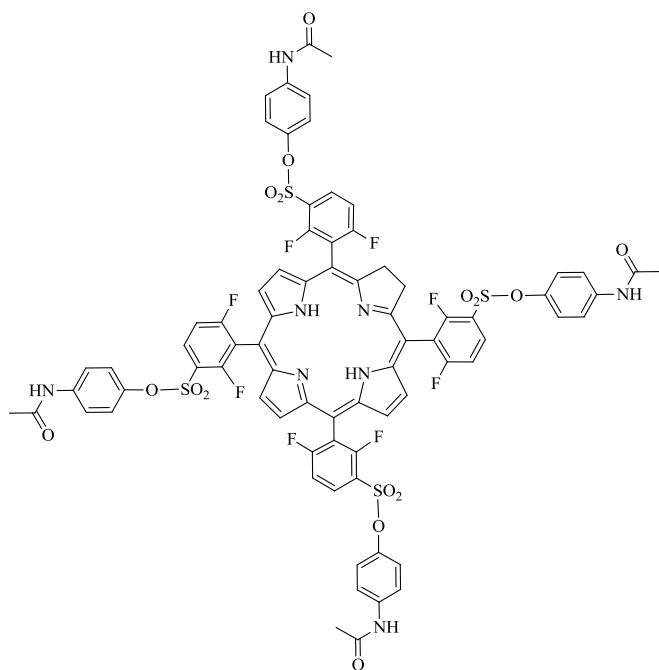
**E. Massa** (MALDI-TOF)  $[\text{M}]^+$  1615.256

( $\text{C}_{76}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{F}_8\text{S}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) calculado(%) C, 50,83; H, 4,15; N, 6,24; S, 7,14; obtido (%): C: 49,93; H, 4,01; N, 6,46; S, 7,20

$\epsilon$  ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol):  $6,2 \times 10^4$  (346 nm);  $6,6 \times 10^4$  (373,5 nm);  $2,8 \times 10^4$  (504,5 nm);  $5,2 \times 10^4$  (746,5 nm)

#### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonil)fenil]clorina (**24**)

Após reacção de redução parcial da porfirina **21**, sua purificação e isolamento, adicionou-se um total de 10mL de uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio (3%). O produto foi purificado em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo. Obteve-se 7 mg de clorina **24**, com um rendimento de 60%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: 8,83-8,70 (m, 2H,  $\beta$ -H); 8,50-8,36 (m, 8H,  $\beta$ -H+Ar-H); 7,67-7,63 (m, 12H, Ar-H+Ar-H<sub>paracet</sub>); 7,24-7,20 (m, 8H, Ar-H<sub>paracet</sub>); 3,65-3,62 (m, 4H, -N-H); 3,51-3,46 (m, 4H,  $\beta$ -H); 2,09 (s l, 12H, CH<sub>3</sub>)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (MeOD),  $\delta$ , ppm: -96,54 a -97,76 (m, 4F); -101,04 a -102,21 (m, 4F)

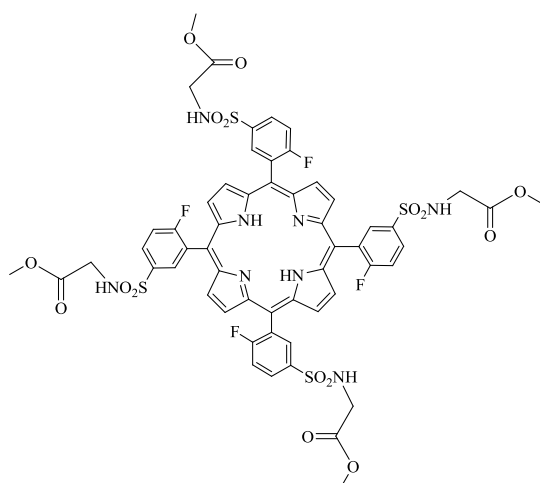
**E. Massa** (MALDI-TOF) [M]<sup>+</sup> 1613,191

(C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>F<sub>8</sub>S<sub>4</sub>.14H<sub>2</sub>O): calculado (%): C: 48,93; H: 4,32; N: 6,01; S: 6,87 Obtido (%): C: 48,92; H: 4,38; N: 5,66; S: 6,20

$\epsilon$  (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) ( $\lambda$ <sub>máx</sub>) (etanol): 5,7x10<sup>5</sup> (405,5 nm); 5,2x10<sup>4</sup> (505 nm); 1,9x10<sup>3</sup> (530 nm); 1,7x10<sup>3</sup> (598 nm); 1,2x10<sup>4</sup> (653,5 nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-N-((2-metoxi-2-oxoetil)sulfamóil)fenil]porfirina (25)

Adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol) ao hidrocloreto do glicinato de metilo (151 mg; 1,2 mmol), previamente dissolvido em 50 ml de THF e trietilamina (0,3 mL; 1,5 mmol). A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Após o término da reação, lavou-se o produto com água (2x) e extraiu-se com diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Depois de filtrar e evaporar o solvente o crude foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente acetato de etilo. Obteve-se 65 mg de porfirina **25**, com um rendimento de 52%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,82 (s, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,66-8,63 (m, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 8,27 (s 1, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 7,58-7,54 (m, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 5,45-5,42 (m, 4H, - $\text{NH}$ ); 3,97-3,92 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 3,84-3,57 (m, 12H, O- $\text{CH}_3$ ); -2,89 (s, 2H,  $\text{NH}$ )

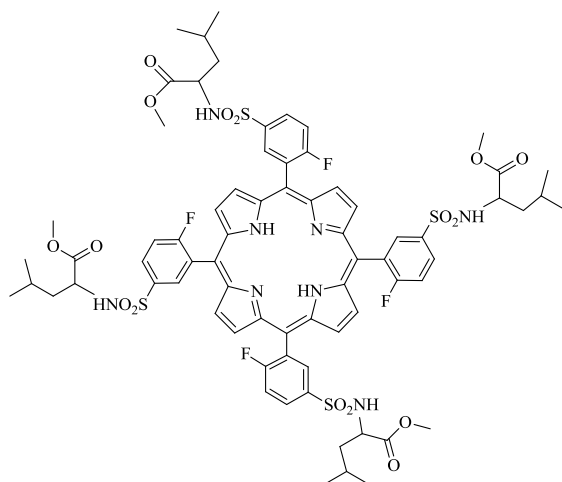
**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376.5 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: -101,76 a -101,95 (m, 4F)

**E. Massa** (ESI-TOF)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , m/z obtida: 1291,1887; calculada  $[\text{C}_{56}\text{H}_{47}\text{F}_4\text{N}_8\text{O}_{16}\text{S}_4]$ : 1291,2621

$\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (etanol):  $4,0 \times 10^5$  (413 nm);  $2,1 \times 10^4$  (508,5 nm);  $4,0 \times 10^3$  (539,5 nm);  $6,1 \times 10^3$  (584,5 nm);  $1,1 \times 10^3$  (641nm)

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-(S)-N-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentil)sulfamoil)fenil]porfirina (26)

Adicionou-se a porfirina clorossulfonada **4** (100 mg; 0,1 mmol) ao hidrocloreto do leucinato de metilo (218 mg; 1,2 mol), previamente dissolvido em 50 ml de THF e trietilamina (0,20 mL; 1,5 mmol). Após o término da reação, lavou-se o produto com água (2x) e extraiu-se com diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e hora. depois de filtrar e evaporar o solvente o crude foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente uma mistura de diclorometano:acetato de etilo (1:2). Obteve-se 83 mg de porfirina **25**, com um rendimento de 55%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,95-8,79 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,67 (s 1, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 8,30 (s 1, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 7,63 (s 1, 4H, Ar- $\text{H}$ ); 5,29-5,27 (m, 4H, - $\text{NH-C}$ ); 4,22-4,18 (m, 4H, - $\text{N-CH}$ ); 3,65 (s, 12H, O- $\text{CH}_3$ ); 1,92-1,87 (m, 4H, C- $\text{CH}$ ); 1,60 (s 1, 8H, - $\text{CH}_2$ ); 0,96-0,94 (m, 24H, - $(\text{CH}_3)_2$ ); -2,85 (s, 2H,  $\text{NH}$ )

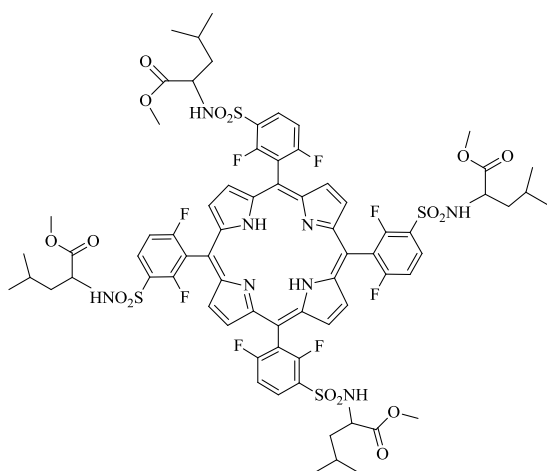
**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: -101,61 a -101,86 (m, 4F)

**E.Massa** (ESI-TOF)  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  obtida: 1515,4380; calculada  $[C_{68}H_{71}F_4N_8O_{16}S_4]$ : 1515,3729

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $4,2 \times 10^5$  (412 nm);  $1,1 \times 10^4$  (509 nm);  $3,0 \times 10^3$  (538 nm);  $7,1 \times 10^3$  (585 nm);  $1,3 \times 10^3$  (640nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-N-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentilsulfamoil)fenil]porfirina (27)**

Adicionou-se a porfirina clorossulfonada **5** (100 mg; 0,1 mmol) ao hidrocloreto de leucinato de metilo (216 mg; 1,2 mol), previamente dissolvido em 50 ml de THF e trietilamina (0,20 mL; 1,5 mmol). Após o término da reação, lavou-se o produto com água (2x) e extraiu-se com diclorometano. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e hora. depois de filtrar e evaporar o solvente o crude foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente uma mistura de diclorometano:acetato de etilo (1:2). Obteve-se 83 mg de porfirina **27**, com um rendimento de 68%.



**RMN  $^1H$**  (400 MHz) ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ , ppm: 9,14-8,82 (m, 8H,  $\beta$ -H); 8,39-8,35 (m, 4H, Ar-H); 7,49-7,45 (m, 4H, Ar-H); 5,34-5,30 (m, 4H, -NH-); 4,34-4,28 (m, 4H, -N-CH-); 3,57-3,40 (m, 12H, -OCH<sub>3</sub>-); 1,90-1,86 (m, 4H, -C-CH-); 1,56 (s 1, 8H -CH<sub>2</sub>-); 1,26 (s, 24H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); -2,86 (s, 2H, NH)

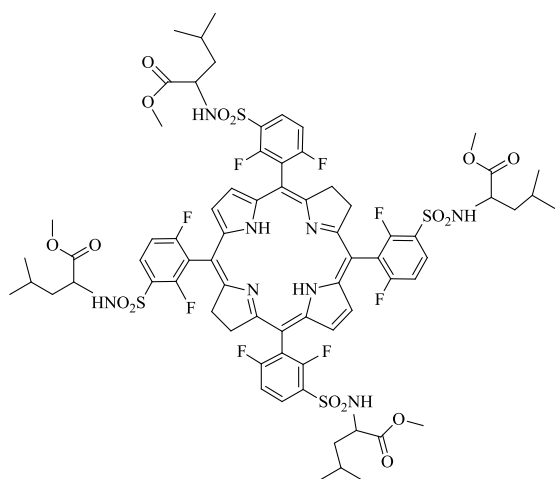
**RMN  $^{19}F$**  (376,5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ , ppm: -100,44 a -101,18 (m, 4F); -103,50 a -104,03 (m, 4F)

**E.Massa:** HRMS-ESI-FIA-TOF  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  obtida: 1587,4051; calculada para  $[C_{72}H_{75}F_8N_8O_{16}S_4]$ : 1587,3978

$\epsilon$  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) (etanol):  $5,0 \times 10^5$  (412,5 nm);  $2,5 \times 10^4$  (508 nm);  $5,1 \times 10^3$  (539 nm);  $4,1 \times 10^3$  (584 nm);  $1,9 \times 10^3$  (642nm)

**5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-N-((1-metoxi-1-oxo-4-metil-2-pentilsulfamoil)fenil] bacterioclorina (30)**

Uma mistura, em pó, de porfirina **27** (15 mg; 0,01 mmol) com *p*-toluenossulfonil-hidrazida (58 mg; 0,30 mmol) é introduzida no reactor e mantida em atmosfera inerte. Seguidamente, a mistura é aquecida a 150°C, durante 15 minutos. O produto foi purificado, após arrefecimento do reactor até à temperatura ambiente, por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente, primeiro diclorometano, e posteriormente com uma mistura de diclorometano:acetato de etilo (1:2), para recolher o produto, resultando 12 mg de bacterioclorina **30**, com um rendimento de 80%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,30 (s 1, 2H, β-H); 8,21-8,18 (m, 4H, Ar-H); 8,05 (s 1, 2H, β-H); 7,41-7,35 (m, 4H, Ar-H); 4,70 (s 1, 4H, -NH-); 4,29-4,23 (m, 8H, β-H); 4,06-3,99 (m, 4H, -N-CH); 3,58-3,31 (m, 12H, -OCH<sub>3</sub>-); 2,43 (s 1, 8H, -CH<sub>2</sub>-); 1,88-1,84 (s 1, 4H, -CH); 0,95-0,88 (m, 24H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); -1,36 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -99,28 a -99,91 (m, 4F); -102,29 a -102,89 (m, 4F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> m/z obtida 1591,4364; calculada para [C<sub>72</sub>H<sub>79</sub>F<sub>8</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S<sub>4</sub>]: 1591,4291

**ε (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (λ<sub>máx</sub>) (etanol):** 5,2x10<sup>4</sup> (345 nm); 7,6x10<sup>4</sup> (373 nm); 2,2x10<sup>4</sup> (504 nm); 5,2x10<sup>4</sup> (746 nm)

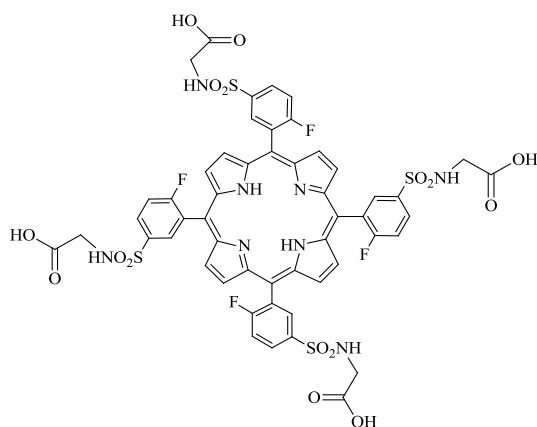
**(F) Procedimento geral para a hidrólise dos ésteres metílicos de aminoácidos**

À porfirina sulfonamida pretendida (50 mg) adicionou-se 30 mL uma solução de hidróxido de sódio (0,1 M) deixando-se refluxar durante uma hora. Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e acidificou-se até pH 1, com uma solução concentrada de HCl (1,0 M). Extraiu-se o produto com éter etílico (2x 25 mL). Secou-se a fase orgânica

com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente obtendo-se desta forma a desproteção dos grupos aminoácido das porfirinas sulfonamida.

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-N-((carboximetil)sulfamoil)fenil]porfirina (28)

À porfirina **25** foram adicionados 30 mL de solução de hidróxido de sódio (0,1 M). Após isolamento, obteve-se 39 mg de porfirina **28**, com um rendimento de 80%.



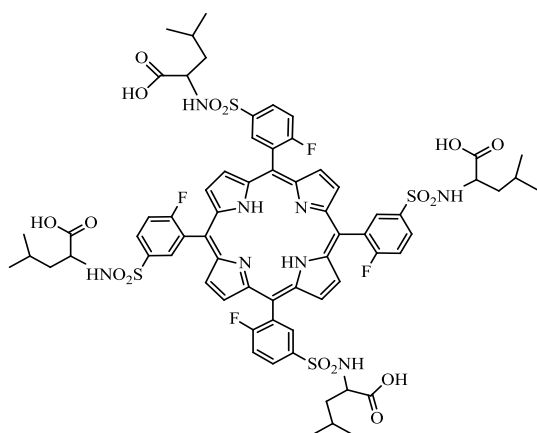
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: 9,03-8,92 (m, 8H, β-H); 8,70 (m, 4H, Ar-H); 8,41 (s 1, 4H, Ar-H); 7,81-7,77 (m, 4H, Ar-H); 4,95 (s 1, 4H, -NH); 3,99 (s 1, 8H, CH<sub>2</sub>)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: -105,82 a -106,02 (m, 4F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 1235,1277; calculada para [C<sub>52</sub>H<sub>39</sub>F<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S<sub>4</sub>]: 1235,1225

### 5,10,15,20-tetraquis[2-fluoro-5-N-((1-carboxi-4-metil-2-pentil)-sulfamoil)fenil]porfirina (29)

À porfirina **26** foram adicionados 30mL de solução de hidróxido de sódio (0.1 M). Após isolamento, obteve-se 38 mg de porfirina **29**, com um rendimento de 82%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: 9,01-8,98 (m, 8H, β-H); 8,67 (s 1, 4H, Ar-H); 8,38 (s 1, 4H, Ar-H); 7,79-7,75 (m, 4H, Ar-H); 4,95 (s 1, 4H, -NH); 4,31-4,28 (m, 4H, -N-CH); 1,92 (s 1, 4H, C-CH); 1,63 (s 1, 8H, -CH<sub>2</sub>); 0,99-0,90 (m, 24H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: -105,94 (s, 4F)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 1459,3773; calculada para [C<sub>68</sub>H<sub>71</sub>F<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>16</sub>S<sub>4</sub>]: 1459,3729

## 4.3 Secção Experimental referente ao Capítulo 3. Síntese e funcionalização de macrociclos tetrapirrólicos para potencial aplicação em PET

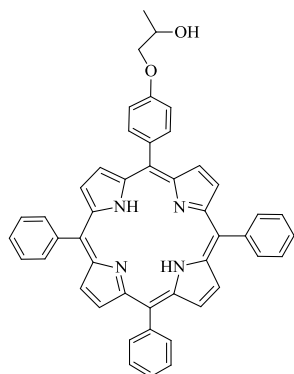
### 4.3.1 Síntese e derivatização de porfirinas hidroxiladas

Os estudos iniciaram-se com a preparação da porfirina hidroxilada de partida, a 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **31**, recorrendo ao método do nitrobenzeno, já descrito na secção anterior (secção 4.2.1. A). A sua purificação, caracterização e rendimento obtido encontra-se de acordo com a literatura.<sup>10,11</sup>

(A) Derivatização *via* reacção com epóxido

#### 5-[4-(propoxi-2-ol)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (**32**)

À porfirina hidroxilada **31** (100 mg; 0,15 mmol), dissolvida em DMF seco, adicionou-se carbonato de céσιο (190 mg; 0,6 mmol) e colocou-se a mistura em agitação, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. De seguida, adicionou-se o 1,2-epoxipropano (35 mg; 0,6 mmol) e a reacção permaneceu a 60°C durante 24 horas. Lavou-se o produto com água (2x) e extraiu-se com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. Após cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano, obteve-se 69 mg de porfirina **32**, com um rendimento de 67%.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: 8,87-8,84 (m, 8H, β-H); 8,22 (d, *J*=6.4Hz, 6H, Ar-H); 8,13 (d, *J*=8.4Hz, 2H, Ar-H); 7,79-7,73 (m, 6H, Ar-H + 3H, Ar-H); 7,30 (d, *J*=8.4Hz, 2H, Ar-H); 4,41-4,24 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 4,14-4,88 (m, 1H, -CH-); 2,51 (s, 1H, -OH); 1,44 (d, *J*= 6,4Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); -2,77 (s, 2H, NH)

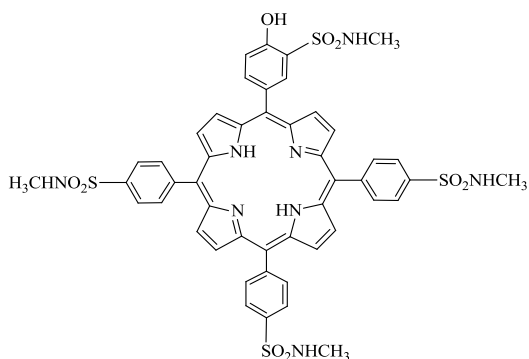
**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup>, m/z obtida: 689,2918; calculada [C<sub>47</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]: 689,2911

(B) Derivatização *via* clorossulfonação e reacção com aminas

A porfirina **31** foi derivatizada *via* clorossulfonação com ácido clorossulfónico, resultando na 5-(4-hidroxi-3-clorossulfonilfenil)-10,15,20-(4-clorossulfonil)trifenilporfirina (TPPOH<sub>1</sub>SO<sub>2</sub>Cl) que posteriormente, por reacção com as aminas pretendidas e seguindo o procedimento já descrito na secção anterior (secção 4.2.2. B), possibilitou a obtenção das porfirinas sulfonamida correspondentes.

**5-[(3-*N*-metilsulfamoíl-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenilporfirina (37)**

Adicionou-se uma solução de metilamina (2 mL; 4 mmol) em THF (2 M) à TPPOH<sub>1</sub>SO<sub>2</sub>Cl (102 mg; 0,1 mmol). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo. Obteve-se 51 mg de porfirina **37** com um rendimento de 48%.



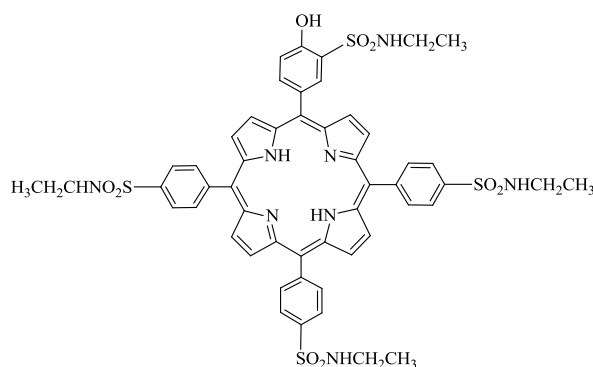
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,88-8,61 (m, 8H, β-H); 8,48 (s 1, 1H, Ar-H); 8,32-8,21 (m, 12H, Ar-H); 8,03-7,98 (s 1, 1H, Ar-H); 7,48 (d, *J*=8,4Hz, 1H, Ar-H); 4,89 (s 1, 1H, -NH-); 4,70-4,66 (m, 3H, -NH-); 2,99-2,92 (m, 12H, CH<sub>3</sub>); -2,89 (2H, NH)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> m/z obtida: 1003,2011; calculada para [C<sub>48</sub>H<sub>43</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>S<sub>4</sub>]: 1003,1958

**5-[(3-*N*-etilsulfamoíl-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-etilsulfamoíl)trifenilporfirina (38)**

Adicionou-se uma solução de etilamina (2 mL; 4 mmol) em THF (2M) à TPPOH<sub>1</sub>SO<sub>2</sub>Cl (102 mg; 0,1 mmol). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo:diclorometano (1:1). Obteve-se 47 mg de **38** com um rendimento de 45%.



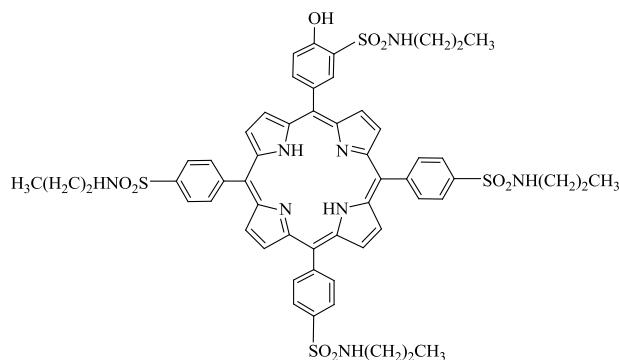


**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,80-8,58 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,41 (s 1, 1H, Ar-H); 8,27-8,19 (m, 12H, Ar-H); 8,00-7,95 (m, 1H, Ar-H); 7,39 (d,  $J=8,0\text{Hz}$ , 1H, Ar-H); 4,78 (s 1, 1H, NH); 4,61-4,58 (m, 3H, NH); 3,32-3,21 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 1,30-1,24 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -2,95 (s, 2H, NH)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z obtida: 1059,2636; calculada para  $[\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_4]$ : 1059,2584

### 5-[(3-*N*-propilsulfamoil-4-hidroxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-propilsulfamoil)trifenilporfirina (39)

Adicionou-se uma solução de propilamina (2 mL; 4 mmol) em THF (2 M) à  $\text{TPPOH}_1\text{SO}_2\text{Cl}$  (102 mg; 0,1 mmol). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente acetato de etilo:diclorometano (1:2). Obteve-se 59 mg de porfirina **39**, com um rendimento de 54%.



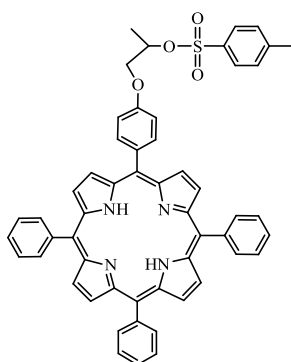
**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,87-8,53 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$  + 1H, Ar-H); 8,31-8,06 (m, 12H, Ar-H); 7,74 (s 1, 1H, Ar-H); 7,46 (d,  $J=8,4\text{Hz}$ , 1H, Ar-H); 5,06 (s 1, 1H, -NH-); 4,84-4,79 (m, 1H, -NH-); 3,30-3,17 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 1,75-1,64 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ); 1,08-0,98 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ); -2,94 (2H, NH)

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z obtida: 1115,3248; calculada para  $[\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_4]$ : 1115,3210

### 4.3.2. Síntese dos precursores contendo um grupo tosilo

#### 5-[4-(propoxi-2-(4-metilbenzenosulfonato))fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (33)

À porfirina hidroxilada **32** (100 mg; 0,15 mmol) dissolvida em 10 mL de acetonitrilo, foi adicionado cloreto de tosilo (570 mg; 3 mmol) e carbonato de céσιο (244 mg; 0,75mmol), deixando-se a mistura reaccional em refluxo, durante 24 horas. O solvente foi evaporado e o produto redissolvido em diclorometano. De seguida, lavou-se com água, uma solução de hidrogenocarbonato de sódio e solução salina de cloreto de sódio. Procedeu-se à purificação por coluna de gel de sílica usando como eluente, primeiro diclorometano e depois uma mistura diclorometano:éter de petróleo:acetato de etilo (1:3:0.5) para recolher o produto puro. Obteve-se **32** mg de porfirina tosilada **33**, com um rendimento de 25%



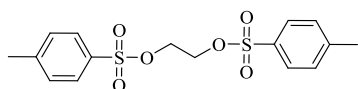
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CD<sub>3</sub>OD), δ, ppm: 8,85 (s, 8H, β-H); 8,22 (d, *J*=6,4Hz, 6H, Ar-H); 8,08 (d, *J*=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,96 (d, *J*=8,2Hz, 2H, Ar-H); 7,79-7,74 (m, 6H, Ar-H + 3H, Ar-H); 7,42 (d, *J*=8,0Hz, 2H, Ar-H); 7,08 (d, *J*=8,4Hz, 2H, Ar-H); 5,13-5,05 (m, 1H, -CH-); 4,33-4,19 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 2,47 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,60 (d, *J*=6,5Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>); -2,76 (s, 2H, NH)

**E. Massa** (HRMS -ESI-TOF) [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* obtida: 843,2972; calculada para [C<sub>54</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S]: 843,3000

#### 1,2-diil bis(4-metilbenzenosulfonato)etano (34)

A uma solução de etilenoglicol (0,3 mL; 5 mmol) e trietialmina (0,9 mL; 6 mmol) em diclorometano seco (30 mL) adicionou-se, lentamente, cloreto de tosilo (23x10<sup>3</sup> mg, 1,25 mmol) em diclorometano (100 mL), e deixada em agitação, durante 24 horas, sob atmosfera inerte. Subsequentemente, adicionar 6 mL de etanolamina para reagir com o excesso de cloreto de tosilo. A mistura resultante foi lavada com com água (200 mL) e a fase orgânica foi extraída com diclorometano. Posteriormente, esta fase foi lavada com uma solução de HCl 1 M e uma solução salina. Depois de secar com sulfato de sódio

anidro e filtrar, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.<sup>12</sup> A recristalização do produto com etanol permitiu obter  $9 \times 10^3$  mg de **34**, um pó branco, com um rendimento de 48% de acordo com o obtido na literatura.



**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , ppm: 7,73 (d,  $J=8,1$ Hz, 4H, Ar-H); 7,34 (d,  $J=8,2$ Hz, 4H, Ar-H); 4,18 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>); 2,45 (s, 6H, CH<sub>3</sub>)

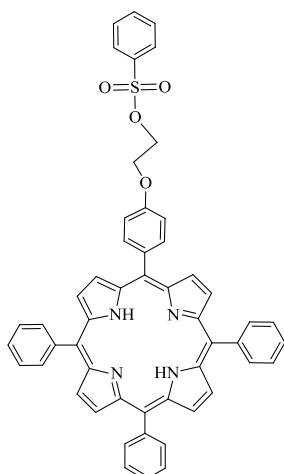
**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF [M+Na]<sup>+</sup> m/z obtida: 393,0433; calculada para [C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>]: 393,0437

### (C) Procedimento geral de síntese de tosil-porfirinas

Uma mistura de porfirina hidroxilada **31** (0,1 mmol), composto **34** (1 mmol) e carbonato de céσιο (0,5 mmol) em 10 mL de acetonitrilo, foi deixada a refluxar durante 24h. O solvente foi evaporado e o resíduo redissolvido em diclorometano e lavado sucessivamente com água, uma solução saturada de bicarbonato de sódio e por último uma solução salina. Após secar com sulfato de sódio anidro, o solvente foi novamente removido. O sólido resultante foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente uma mistura de diclorometano e acetato de etilo nas proporções adequadas para cada uma das porfirinas sintetizadas.

#### 5-[4-(2-(4-metilbenzenosulfonato))etoxifenil]-10,15,20-trifenilporfirina (**35**)

À porfirina **31** (63 mg), dissolvida em 10 mL de acetonitrilo, adicionou-se 392 mg de **34** e 162 mg de carbonato de céσιο. Após reação e tratamento do produto, este foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente diclorometano, obtendo-se 39 mg de porfirina **35**, com um rendimento de 48%.

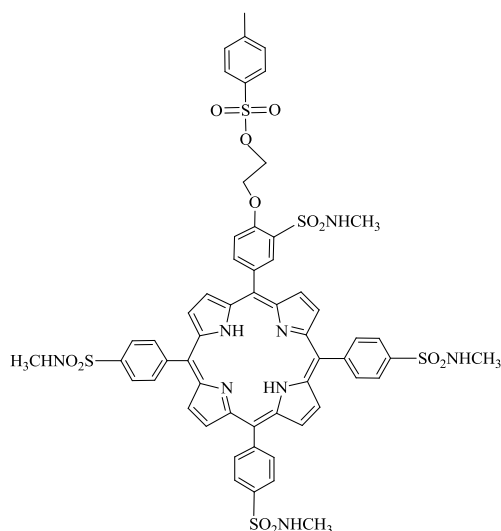


**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,85 (s, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,22 (d,  $J=6,3\text{Hz}$ , 6H, Ar-H), 8,09 (d,  $J=8,3\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 7,95 (d,  $J=8,1\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 7,79-7,74 (m, 6H, Ar-H + 3H, Ar-H); 7,43 (d,  $J=8,0\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 7,15 (d,  $J=8,3\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 4,56 (t,  $J=4,0\text{Hz}$ , 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 4,43 (t,  $J=4,0\text{Hz}$ , 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); -2,76 (s, 2H,  $\text{NH}$ ).

**E. Massa:** HRMS-ESI-TOF  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z obtida: 829,2827; calculada para  $[\text{C}_{53}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}]$ : 829,2843

#### 5-[3-*N*-metilsulfamoil-4-(2-(4-metilbenzenosulfonato)etoxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoil)trifenilporfirina (40)

À porfirina **37** (100 mg) dissolvida em 20 mL de acetonitrilo, adicionou-se 392 mg de composto **34** e 162 mg de carbonato de céσιο. Após reacção e tratamento do produto, este foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente diclorometano, para retirar excesso de ditosilo, e de seguida, acetato de etilo, resultando 40 mg de porfirina **40**, com um rendimento de 33%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,83-8,77 (m, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,67 (s, 1H, Ar-H); 8,37-8,24 (m, 12H, Ar-H + 1H, Ar-H); 7,86 (d,  $J=7,9\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 7,62-7,59 (m, 1H, Ar-H); 7,39 (d,  $J=8,0\text{Hz}$ , 2H, Ar-H); 4,67-4,55 (m, 4H,  $-\text{NH}-$ ); 4,33 (t,  $J=4,0\text{Hz}$ , 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 3,67 (t,  $J=5,2\text{Hz}$ , 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 3,11-2,97 (m, 12H,  $\text{NH}-\text{CH}_3$ ); 2,44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); -2,86 (s, 2H,  $-\text{NH}$ )

**E. Massa:** ESI-TOF  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z obtida: 1227,2535; calculada para  $[\text{C}_{57}\text{H}_{53}\text{N}_8\text{NaO}_{12}\text{S}_5]$ : 1227,2513

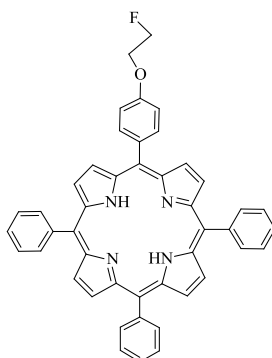
### 4.3.3. Síntese de porfirinas fluoradas *via* reacção de substituição nucleofílica

#### (D) Procedimento geral

À tosil-porfirina pretendida (0,05 mmol), dissolvida em 5 mL de acetonitrilo, adicionou-se TBAF (fluoreto de tetra-*n*-butilamónio) (0,25 mmol). Deixou-se reagir a 100°C, durante 30 minutos. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente o apropriado de acordo com a porfirina fluorada obtida.

#### 5-(2-fluoroetoxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (36)

À porfirina **35** (40 mg), dissolvida em 5mL de acetonitrilo, foi adicionado TBAF (0,15 mL) em solução de THF (2 M). O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como eluente, diclorometano. Obteve-se 33 mg de porfirina **36**, com um rendimento de 82%.



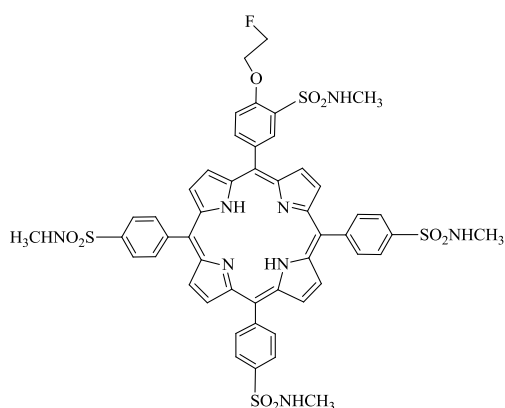
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: 8,84 (s 1, 8H, β-H); 8,22 (d, *J*=6,4Hz, 6H, Ar-H); 8,13 (d, *J*=8,4Hz, 2H, Ar-H); 7,78-7,73 (m, 9H, Ar-H); 7,30 (d, *J*=8,4Hz, 2H, Ar-H); 5,01-4,88 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 4,55-4,46 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); -2,77 (s, 2H, NH)

**RMN <sup>19</sup>F** (376,5 MHz) (CDCl<sub>3</sub>), δ, ppm: -222,56 (s, 1F)

**E. Massa:** HRMS- ESI-TOF [M+H]<sup>+</sup> *m/z* obtida: 677,2721; calculada [C<sub>46</sub>H<sub>34</sub>FN<sub>4</sub>O]: 677,2638

#### 5-[3-*N*-metilsulfamoíl-4-(2-fluoroetoxi)fenil]-10,15,20-(4-*N*-metilsulfamoíl)trifenil porfirina (41)

TBAF (0.10 mL) em solução de THF (2 M) foi adicionado à porfirina **40** (60 mg) dissolvida em 5 mL de acetonitrilo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluente acetato de etilo, obtendo-se a porfirina **41** com um rendimento inferior a 10%.



**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 8,78 (s 1, 8H,  $\beta\text{-H}$ ); 8,61-8,25 (m, 12H, Ar-H); 7,58-7,55 (m, 3H, Ar-H); 3,97 -3,90 (m, 4H -NH + 4H, -CH<sub>2</sub>-); 3,63 (s 1, 12H, CH<sub>3</sub>); -2,95 (s, 2H, NH)

**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: - 219,27 (s, 1F)

**E. Massa:** HRMS- ESI-TOF  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z obtida: 1049,2249; calculada  $[\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{FN}_8\text{O}_9\text{S}_4]$ : 1049,2255

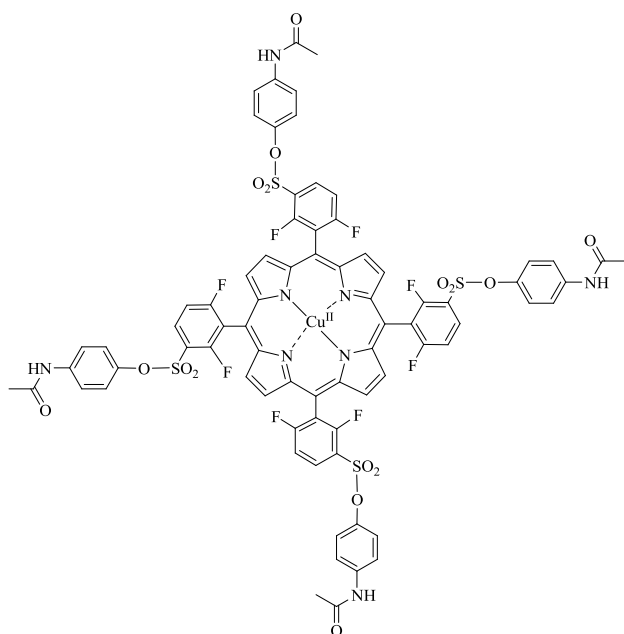
### 4.3.4. Síntese de complexos de cobre (II)

#### (E) Procedimento geral

Dissolveu-se a porfirina pretendida em 15 mL de DMF, num balão de 50 mL, a aquecer à temperatura de 150°C. A esta solução adicionou-se 5 equivalentes de cloreto de cobre. A reacção permaneceu em refluxo durante 1 hora e foi seguida por espectroscopia de absorção de UV-Visível. Uma vez terminada a reacção, adicionou-se 50 mL de diclorometano e o produto lavado com água (2x). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sendo o crude purificado por coluna de sílica gel, usando o eluente apropriado, obtendo-se desta forma cristais avermelhados de porfirinatos de cobre (II).

#### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(4-acetamidofenoxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) (43)

À porfirina **16** (10 mg; 0,01 mmol) em 15 mL de DMF, foi adicionado cloreto de cobre (6,7 mg; 0,05 mmol). O produto é purificado por cromatografia de gel de sílica usando acetato de etilo como eluente, obtendo-se 10,1 mg de **43** com um rendimento de 94%.



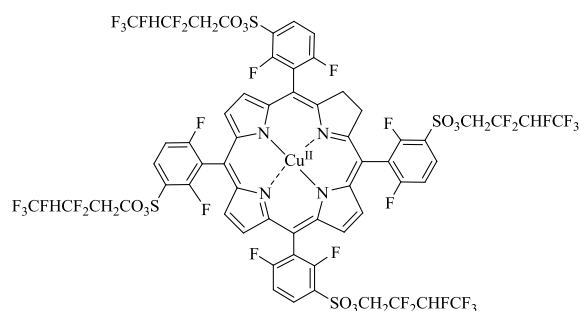
**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz) ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: -96,25 a -97,19 (4F); -100,89 a -101,66 (4F)

**E. Massa:** (MALDI-TOF)  $[\text{M}]^+$  m/z: 1673,062

**( $\text{C}_{76}\text{H}_{48}\text{CuF}_8\text{N}_8\text{O}_{16}\text{S}_4$ ):** calculado (%) C: 54,56; H: 2,89; N: 6,70; S: 7,67; obtido para  **$\text{C}_{76}\text{H}_{48}\text{CuF}_8\text{N}_8\text{O}_{16}\text{S}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$**  (%): C: 53,75; H: 3,13; N: 6,71; S: 7,43

#### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-(2,2,3,4,4,4-hexafluorobutoxissulfonil)fenil]porfirinato de cobre (II) (44)

À porfirina **22** (17 mg; 0,01 mmol) foi adicionado cloreto de cobre (6,7 mg; 0,05 mmol). O produto é purificado por cromatografia de gel de sílica usando acetato de etilo como eluente, obtendo-se 15,9 mg de porfirina **44**, com um rendimento de 90%.



**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ , ppm: -77,69 (s, 12F,  $\text{CF}_3$ ); -93,68 (s 1, 4F, Ar-F); -99,72 (s 1, 4F, Ar-F); -112,98 a -119,84 (m, 8F,  $\text{CF}_2$ ); -210,78 (s 1, 4F, CF)

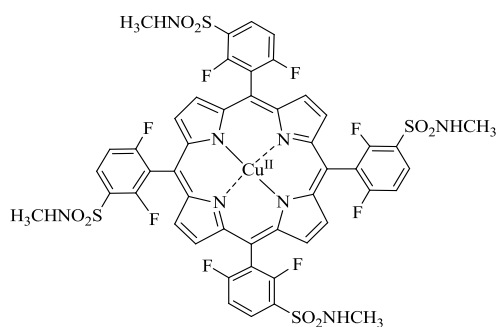
**E. Massa:** (MALDI-TOF)  $[\text{M}]^+$  m/z: 1796,881

**( $\text{C}_{60}\text{H}_{30}\text{CuF}_{32}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_4$ ):** calculado (%) C: 40,07; H: 1,68; N: 3,11; S: 7,13; obtido para **( $\text{C}_{60}\text{H}_{30}\text{CuF}_{32}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )** (%): C: 38,01; H: 2,71; N: 3,05; S: 6,88

#### 5,10,15,20-tetraquis[2,6-difluoro-3-N-metilsulfamóilfenil]porfirinato de cobre (II) (45)

Dissolver a porfirina **7** (11 mg; 0,01 mmol) em 15 mL de DMF. Colocar a mistura

num balão de 50 mL e aquecer à temperatura de 150°C. Adicionar cloreto de cobre (6,7 mg; 0,05 mmol). O produto é purificado por cromatografia de gel de sílica usando acetato de etilo como eluente. Obteve-se 11,2 mg de porfirina **45**, com um rendimento de 95%.



**RMN  $^{19}\text{F}$**  (376,5 MHz) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ , ppm: -98,24 (sl, 4F); -103,78 (s, 4F)

**E. Massa:** (MALDI-TOF)  $[\text{M}]^+$  m/z: 1190,974

**( $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{CuF}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ ):** calculado (%) C: 48,64; H: 3,00; N: 9,27; S: 10,61; obtido para

**$\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{CuF}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$**  (%): C: 40,65; H: 4,09; N: 7,66



## Bibliografia

- 
- <sup>1</sup> Burrows H. D, Pereira M. M, *Química – Síntese e Estrutura. Uma Abordagem Prática*, Escolar Editora, **2006**.
- <sup>2</sup> Johnstone R. A. W., Nunes M. L. P. G., Pereira M. M., Gonsalves A. M. D. R., Serra A. C., *Heterocycles*, **1996**, 7, 1423.
- <sup>3</sup> Monteiro C. J. P, Pereira M. M., Pinto S. M. A., Simões A. V. C., Sá G. F. F., Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Wyatt M. F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 5132.
- <sup>4</sup> Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S, Mendonça A. F., Pegado I. M., Duarte R., Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 3878.
- <sup>5</sup> Gonsalves A. M. d'A. R, Johnstone R. A.W., Pereira M. M., Santana M. P., Serra A. C., Sobral A. J. F. N., Stocks P. A., *Heterocycles*, **1996**, 43, 829.
- <sup>6</sup> Ressurreição A. S. M., Pineiro M., Arnaut L. G., Gonsalves A. M. d'A. R., *J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2007**, 11, 50.
- <sup>7</sup> Pereira M. M., Monteiro C., J., P., Simões A. V. C., Pinto S. M., Abreu A. R., Sá G. F. F., Silva E. F., Rocha L. B., Dąbrowski J. M., Formosinho S. J., Simões S., Arnaut L. G., *Tetrahedron*, **2010**, 66, 9545.
- <sup>8</sup> Dabrowski J. M., Krzykawska M., Arnaut L. G., Pereira M. M., Monteiro C. J. P., Simões S., Urbanska K., Stochel G., *Chem. Med. Chem.*, **2011**, 6, 1715.
- <sup>9</sup> Silva E. F. F., Schaberle F. A., Monteiro C. J. P., Dąbrowski J. M., Arnaut L. G., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, 12, 1187
- <sup>10</sup> Monteiro C. J. P, Pereira M. M., Pinto S. M. A., Simões A. V. C., Sá G. F. F., Arnaut L. G., Formosinho S. J., Simões S., Wyatt M. F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 5132.
- <sup>11</sup> Tomé J. P. C., Neves M. G. P. M. S., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S, Mendonça A. F., Pegado I. M., Duarte R., Valdeira M. L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 3878.
- <sup>12</sup> Hoogenboom R., Fijten M. W. M., Kickelbick G., Schubert U. S., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2010**, 6, 773.



## Anexo 1

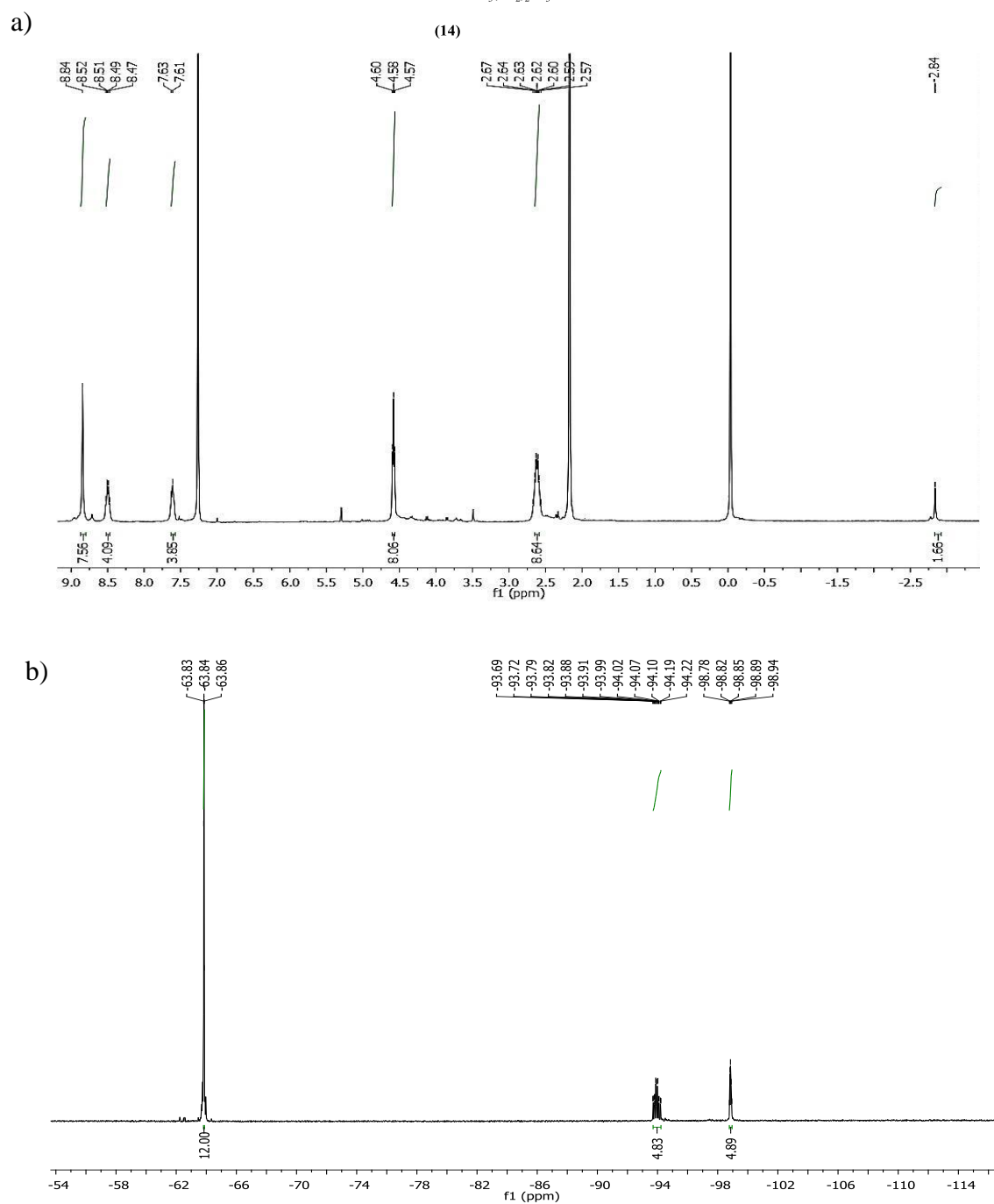
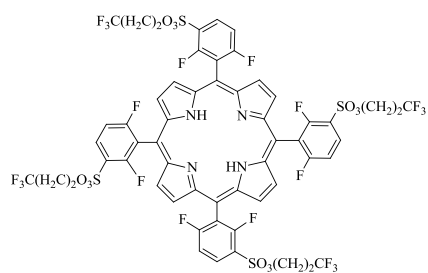


Figura A1. a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e b) espectro de RMN  $^{19}\text{F}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , correspondente à porfirina **14**

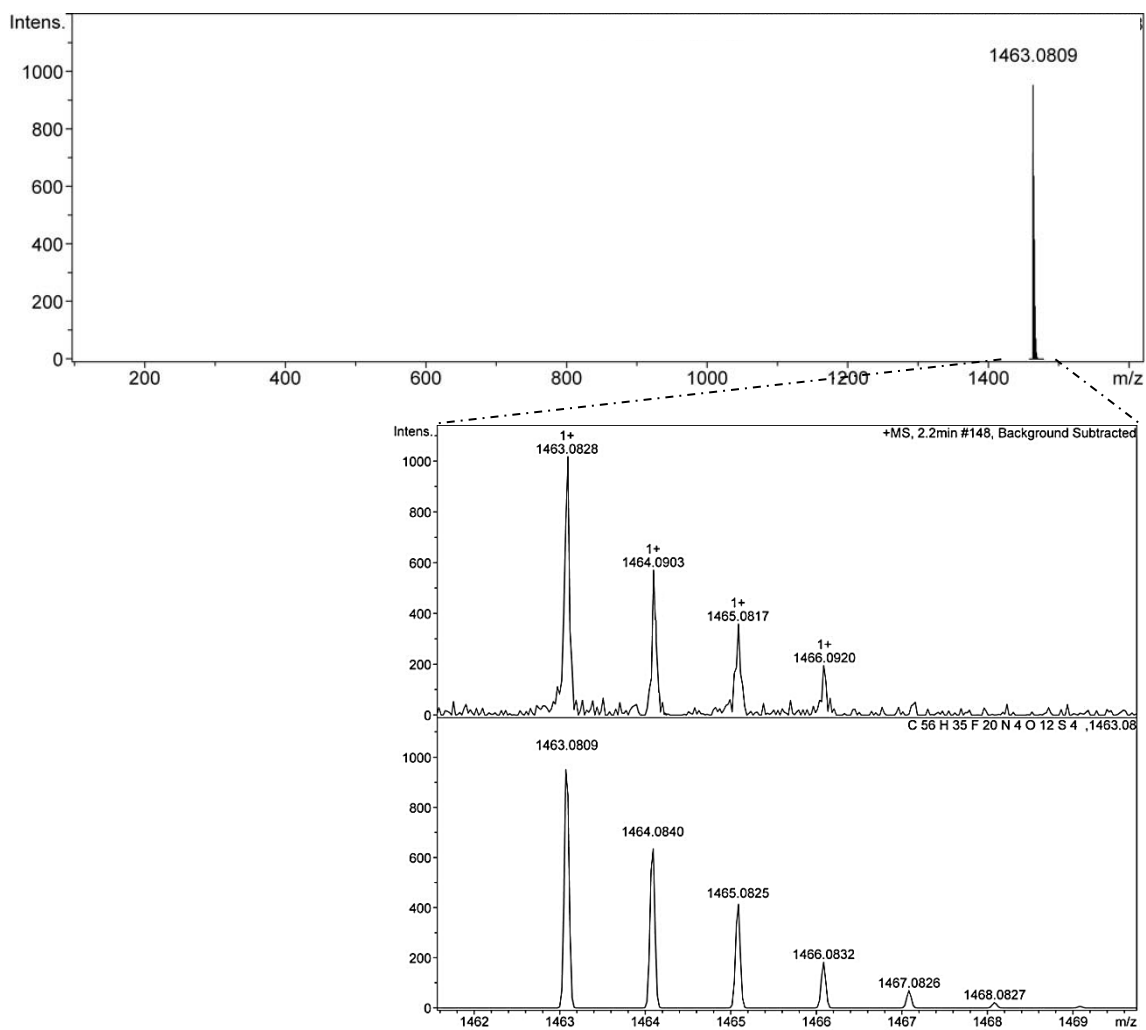


Figura A2. Espectro ESI-TOF obtido por para a porfirina **14** e comparação entre o padrão isotópico teórico e observado para o ião molecular ( $[M+H]^+$ ).

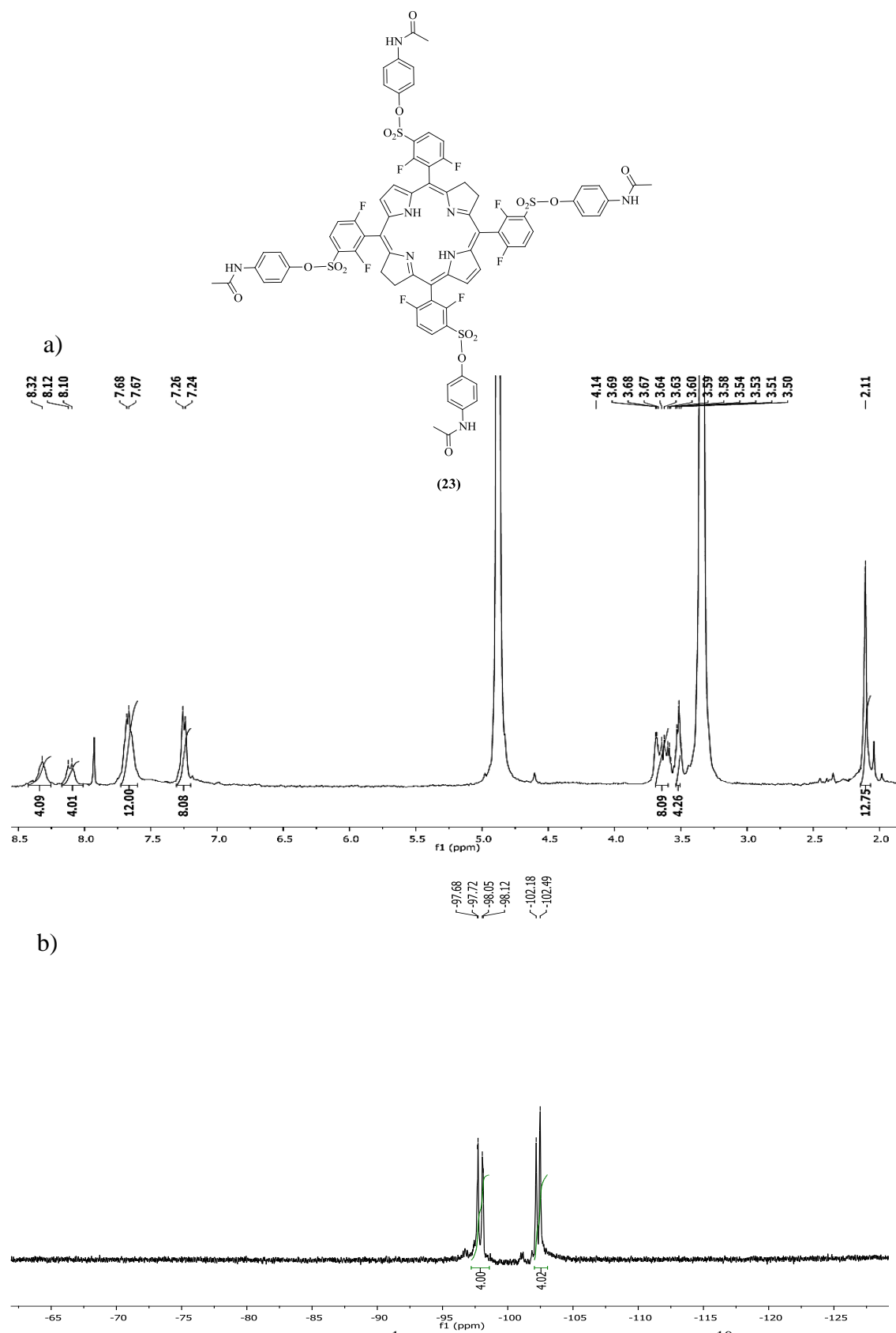


Figura A3. a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e b) espectro de RMN  $^{19}\text{F}$ , em MeOD, correspondente à bacterioclorina **23**

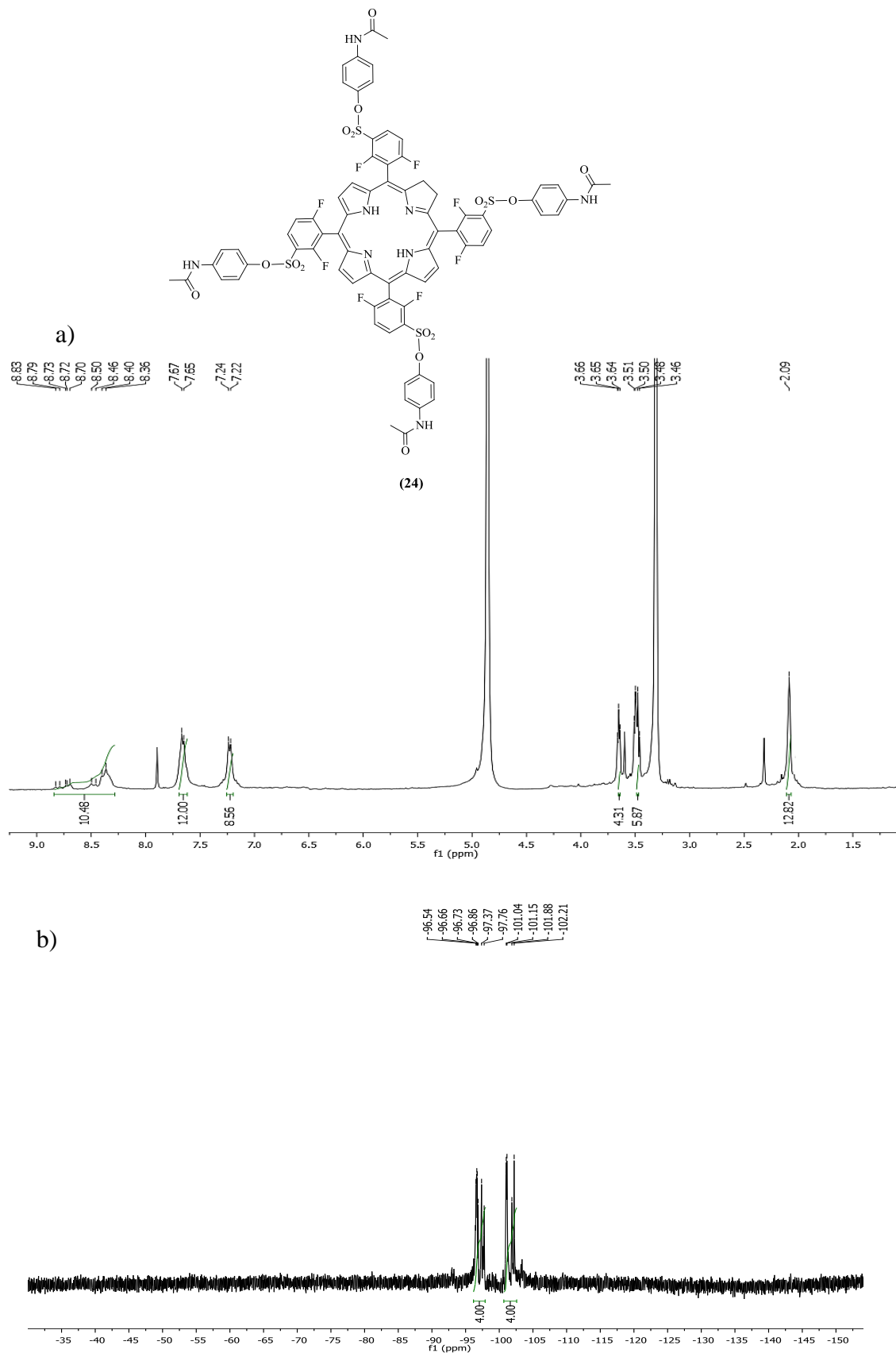


Figura A4. a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e b) espectro de RMN  $^{19}\text{F}$ , em MeOD, correspondente à clorina **24**

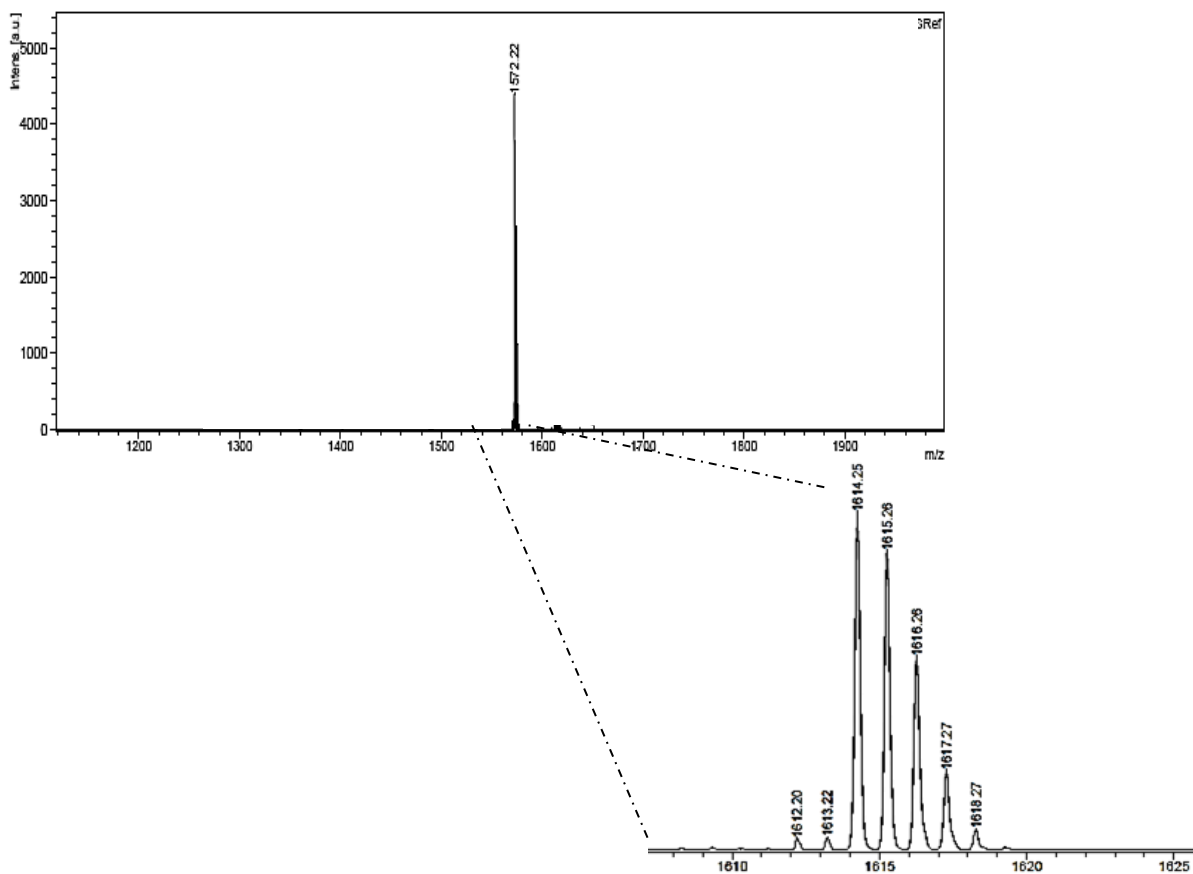


Figura A5. Espectro MALDI-TOF obtido para bacterioclorina **23** e padrão isotópico observado para íon molecular observado ( $[M]^+$ ).

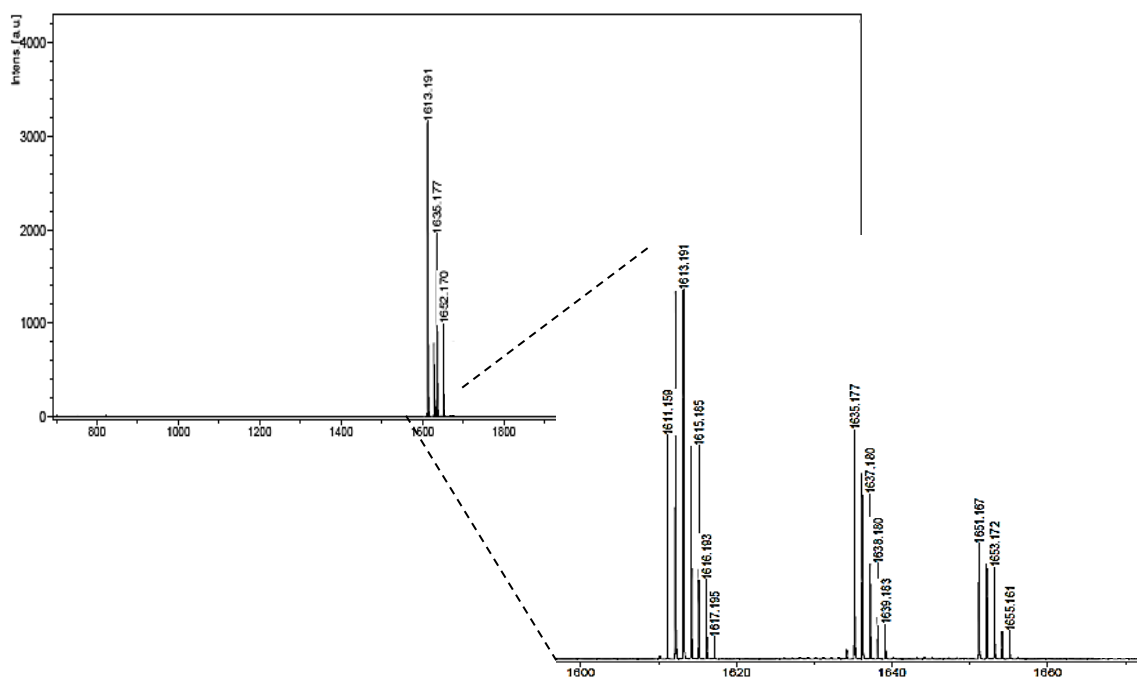


Figura A6. Espectro MALDI-TOF obtido para clorina **24** e padrão isotópico observado para íons moleculares observados ( $[M]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ ).

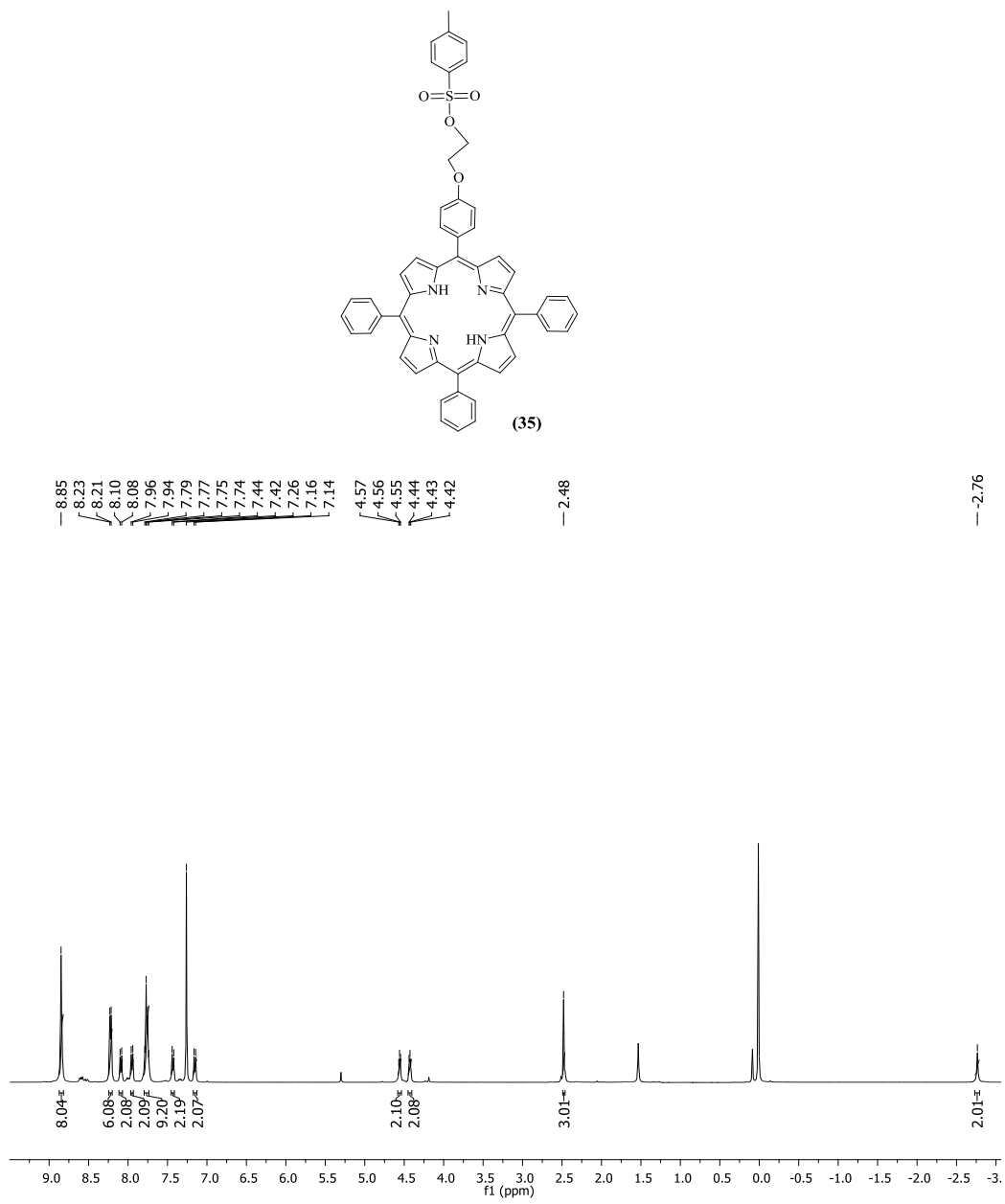


Figura A7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , correspondente à porfirina precursora **35**.



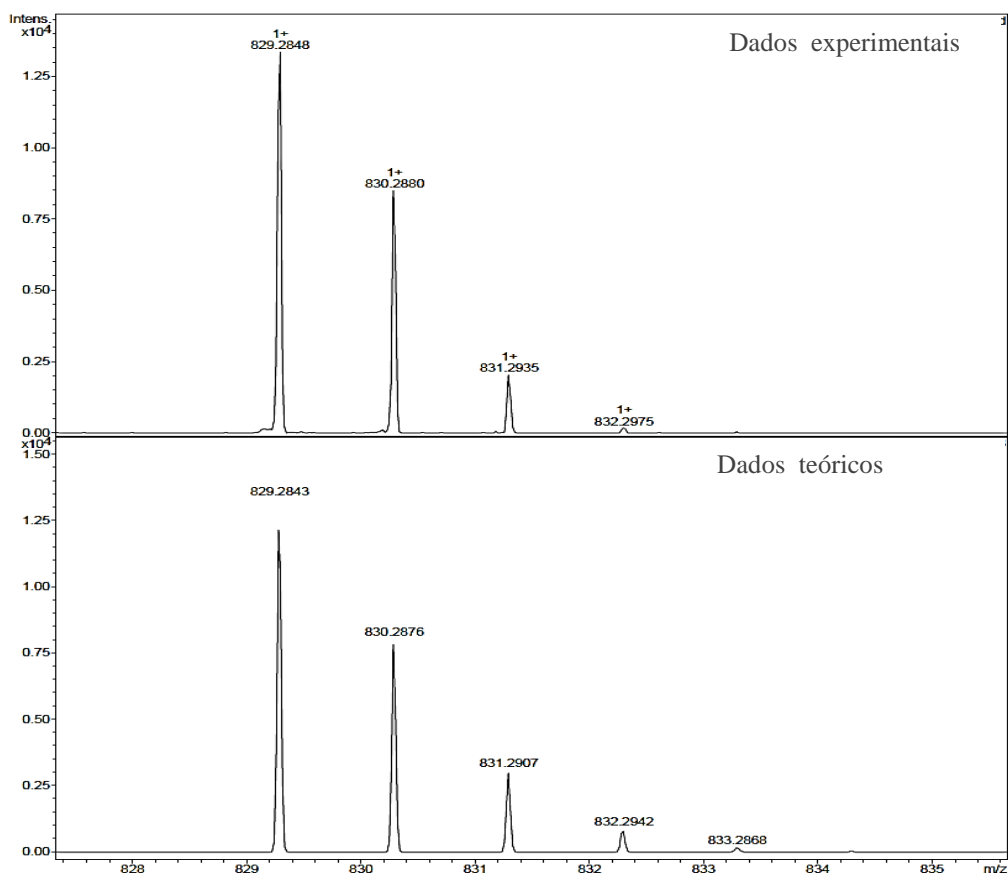
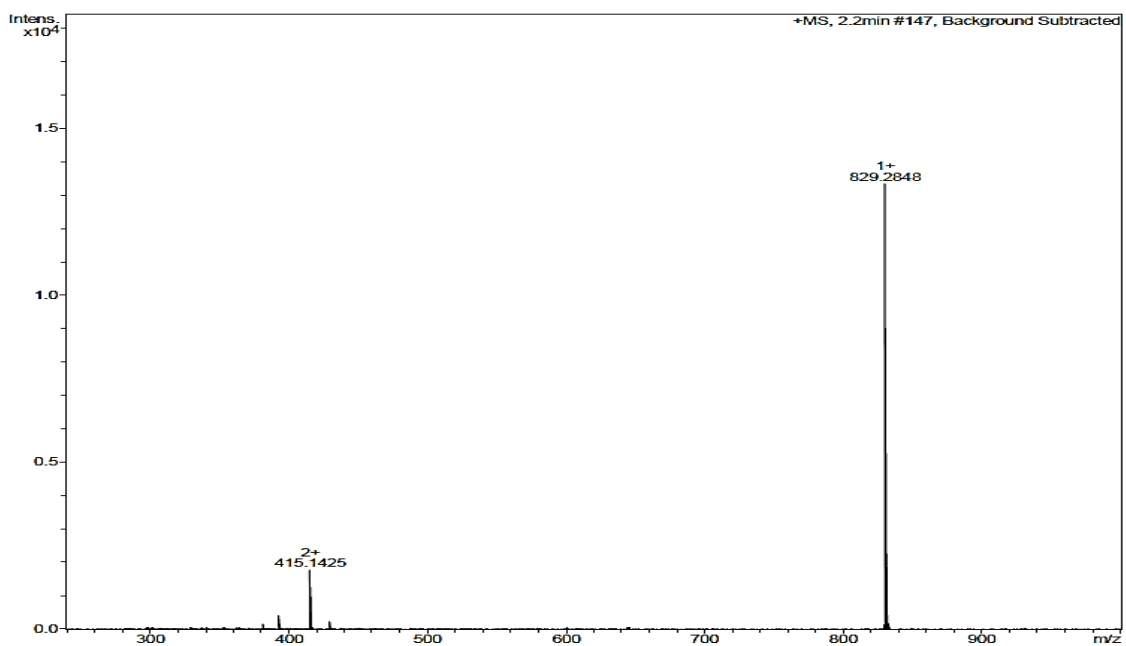


Figura A8. Espectro ESI-TOF obtido por para a porfirina **35** e comparação entre o padrão isotópico teórico e observado para o ião molecular ( $[M+H]^+$ ).

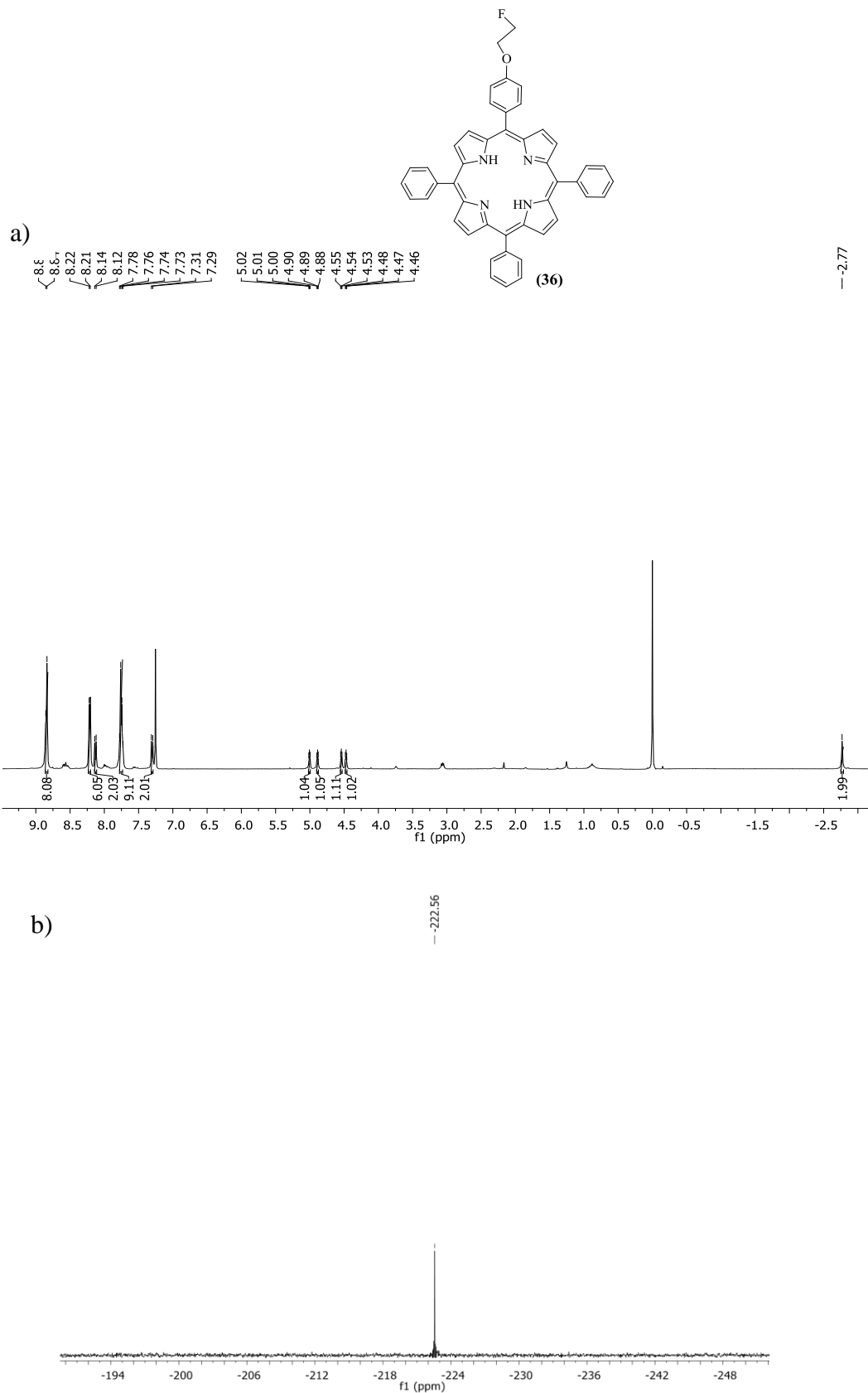


Figura A9. a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e b) espectro de RMN  $^{19}\text{F}$ , em  $\text{CDCl}_3$ , correspondente à porfirina **36**.

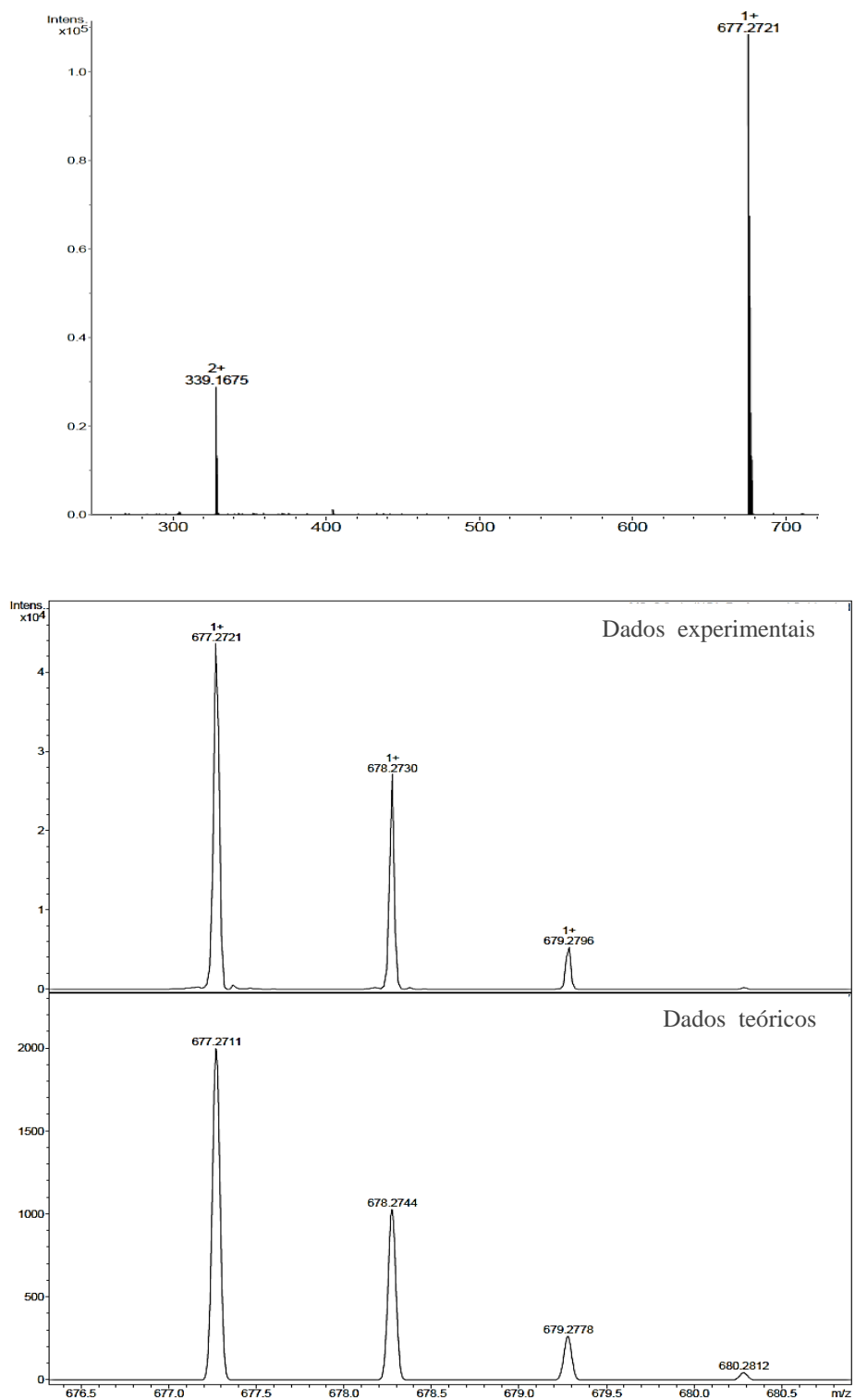


Figura A10. Espectro ESI-TOF obtido por para a porfirina **36** e comparação entre o padrão isotópico teórico e observado para o ião molecular ( $[M+H]^+$ ).

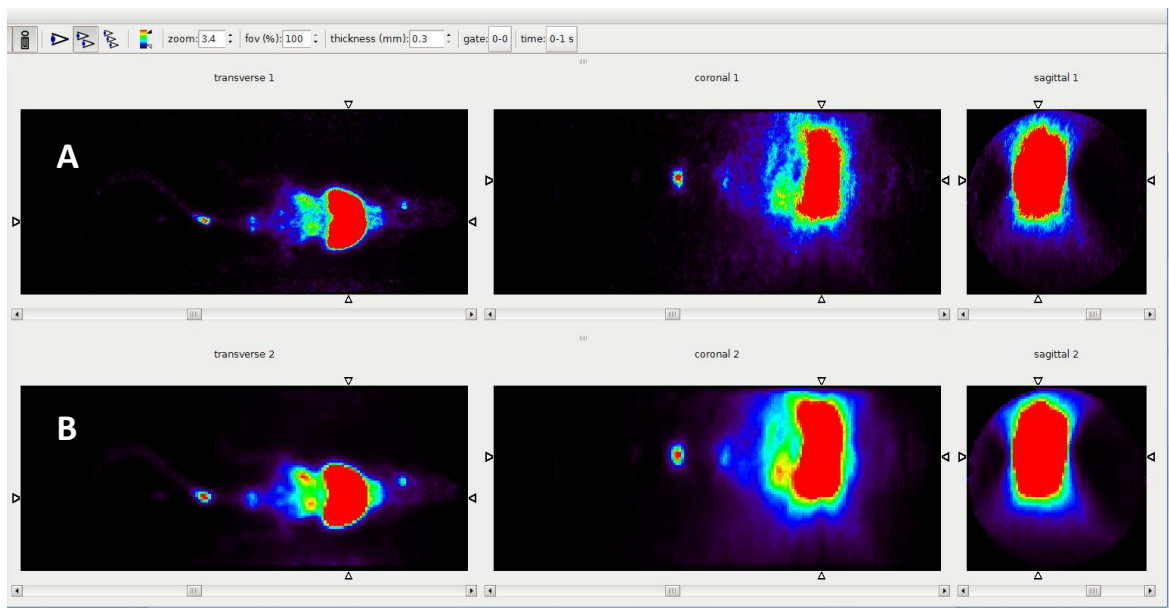


Figura A11. Estudos de micro-PET em ratinhos normais injectados com 500 kBq (**A**) e 900 kBq (**B**) da porfirina **36a**. Imagens planares, de corpo inteiro, obtidas ao fim de 1 hora, normalizadas para a actividade injectada.

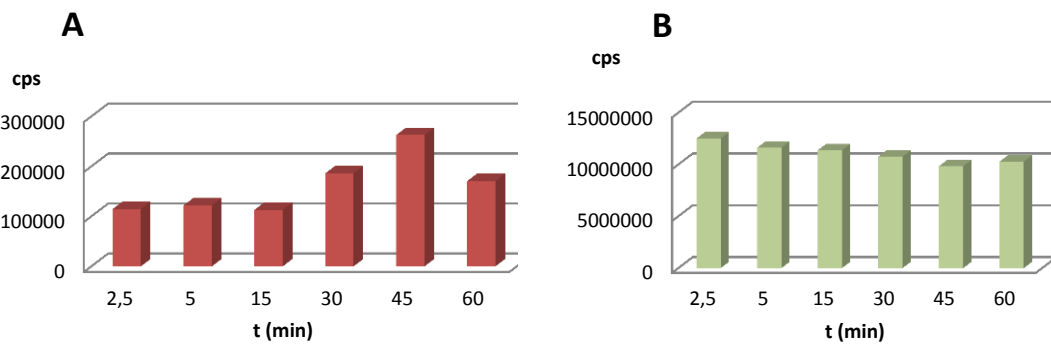


Figura A12. Testes de captação da porfirina **36a** em células de linha celular humana de cancro da bexiga (UM-UC3); **A**: actividade nas células; **B**: actividade no sobrenadante