

Carolina dos Santos Vinagreiro

SÍNTESE DE CONJUGADOS DE SULFONAMIDAS E MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO DUAL EM QUÍMIO- E FOTOTERAPIA

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Junho de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Carolina dos Santos Vinagreiro

**SÍNTESE DE CONJUGADOS DE SULFONAMIDAS E MACROCICLOS TETRAPIRRÓLICOS COM
POTENCIAL APLICAÇÃO DUAL EM QUÍMIO- E FOTOTERAPIA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Orientador: Mariette Pereira

Junho de 2015

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

O caminho percorrido ao longo deste mestrado permitiu-me adquirir conhecimentos em diversas áreas e evoluir bastante profissionalmente, além de me proporcionar um significativo crescimento e amadurecimento pessoal. No entanto, este caminho não seria possível sem a interveniência de algumas pessoas, às quais devo um sincero agradecimento.

À Doutora Mariette Pereira por todas as oportunidades que me proporcionou, por todo o apoio e pelo carinho e preocupação que sempre demonstrou para comigo e com o meu futuro. Foi um gosto desenvolver este projeto no seu grupo.

Ao Doutor Luís Arnaut por ter permitido que este fosse um projeto multidisciplinar e que eu adquirisse conhecimentos em áreas complementares à síntese. Mas mais do que isso, por acreditar em mim desde os meus primeiros passos na Química Medicinal, pelos conselhos e por me ter direcionado para o caminho correto quando necessário.

Ao Doutor Fábio Schaberle por todo o apoio nos estudos fotofísicos e por todas as nossas animadas “discussões” científicas.

À Doutora Lígia Silva por todos os ensinamentos e por todo o apoio disponibilizado.

À Doutora Maria João Moreno por me receber no seu laboratório e pela paciência comigo e com as minhas falhas.

A todos os meus colegas do laboratório de Catálise e Química Fina por todos os bons momentos que compartilhamos e pelo crescimento que adquirimos juntos. Um agradecimento especial ao Doutor Mário pelo esclarecimento de todas as dúvidas e por estar sempre disponível. À Sara por ter dito as palavras certas quando necessário. À Liliana por ser a pessoa nutritiva que é, por todos os bons momentos e pela amizade que desenvolvemos.

Às minhas colegas do grupo de Fotoquímica: Ana Mata, Joana Campos e Catarina Lobo pela convivência. Em especial à Ana Mata pela excelente pessoa que é.

O meu agradecimento à Bluepharma, S.A. e à Luzitin, S.A.

Aos meus colegas da Luzitin, onde parte deste projeto foi desenvolvido. Ao Gonçalo por ter paciência para esclarecer todas as minhas curiosidades e pelos bons momentos. Ao Nuno, a quem nunca me vou cansar de agradecer, por tudo aquilo que me ensinou experimentalmente, pelas horas da sua vida pessoal que abdicou para que eu pudesse ficar a fazer as coisas ao meu ritmo e especialmente por me ter inculido espírito crítico e capacidade de contornar os problemas diários.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida. À minha Tixa e à Neuza que estão comigo praticamente desde que me lembro de existir. Por todas as conversas, todos os desabafos, todo o apoio, por me darem força e energia positiva sempre que eu precisei mas principalmente pelo privilégio de vos ter como amigas. Mas o maior agradecimento devo à Vanessa, por estar diariamente comigo nesta luta, por todos os momentos que vivemos e por todo o apoio nas fases menos boas da vida com as quais conseguimos mudar e crescer juntas. Sabes que sem ti não era a mesma coisa!

Mas tal como dizia Isaac Newton “Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”. E estes gigantes são a minha família, que me transmitiu todos os valores, me proporcionou equilíbrio emocional e à qual amo incondicionalmente. Por isso devo um profundo agradecimento ao meu Pai, à minha mãe por aqueles nossos abraços e pela admirável pessoa que é, ao meu irmão que além de ser um irmão é um melhor amigo para a vida, à minha bebé da qual tenho muito orgulho, ao António José por me recarregar e aos meus avós maternos por todo o carinho.

Agradeço também os serviços prestados pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química, em especial ao Pedro por toda disponibilidade.

Índice

Abreviaturas.....	i
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Nomenclatura.....	ix
Capítulo 1: Introdução	1
1.1- Macrocilos tetrapirrólicos – síntese e aplicações.....	2
Síntese de meso-arilporfirinas.....	3
Síntese de hidroporfirinas.....	4
1.2- Sulfonamidas – síntese e aplicações.....	6
Síntese de sulfonamidas.....	7
1.3- Terapia fotodinâmica.....	8
1.4- Flúor em Química Medicinal.....	14
1.5- Proposta de trabalho.....	16
Referências.....	17
Capítulo 2: Síntese e caracterização de sulfonamidas derivadas da pentafluorofenilporfirina por ligação covalente	25
2.1- Síntese de precursores.....	25
Sulfonamidas.....	25
Porfirinas.....	27
2.2- Síntese de sulfonamidas derivadas da pentafluorofenilporfirina por ligação covalente.....	30
2.2.1- Caracterização química.....	36
2.3- Síntese de hidroporfirinas.....	43
2.3.1- Caracterização química.....	45
2.4- Estudos fotofísicos.....	48
2.5- Estudos preliminares em membranas e cálculo de coeficientes de partição.....	58
2.6- Estudos de citotoxicidade preliminares.....	63
2.7- Conclusão.....	66
Referências.....	69
Capítulo 3: Sistemas supramoleculares via <i>self-assembly</i> de sulfonamido-porfiratos de zinco (II) cationizados	73
3.1- Síntese de porfirinas catiónicas.....	73
3.2- Sulfonamida.....	76
3.3- Self-assembly.....	77
3.4- Conclusão.....	79

Referências.....	81
Capítulo 4: Experimental	83
4.1- Solventes e reagentes.....	83
4.2- Instrumentação.....	83
4.3- Secção experimental referente ao capítulo 2.....	85
4.3.1- Síntese de sulfonamidas.....	85
4.3.2- Síntese de porfirinas.....	86
4.3.3- Síntese de sulfonamido-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinas.....	88
4.3.4- Síntese de hidroporfirinas.....	95
4.3.5- Caracterização fotofísica e fotoquímica.....	96
4.3.6- Determinação de coeficientes de partição.....	97
4.3.7- Estudos de permeação em membranas.....	98
4.3.8- Estudos <i>in vitro</i>	99
4.4.- Secção experimental referente ao capítulo 3.....	99
4.4.1- Síntese de porfirinas.....	99
4.4.2- Metalção de porfirinas.....	101
4.4.3- Síntese de porfirinas catiónicas.....	102
Referências.....	104

Abreviaturas

ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Desvio químico
η	Índice de Refratividade
ΦF	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi \Delta$	Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês “antimicrobial photodynamic therapy”)
Ar	Arilo
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês “cyclic guanosine monophosphate”)
CIS	Cruzamento inter-sistemas
Co	Concentração na fase orgânica
Cox-II	Ciclo-oxigenase-2
Cu(II)- β NO ₂ TPFPP	2-Nitro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinato de cobre (II)
Cu(II)- β NO ₂ TPP	2-Nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II)
Cw	Concentração na fase aquosa
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-dicianobenzoquinona
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” do inglês
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”)
EET	Eficiência de transferência de energia
ESI	Ionização por “electrospray” (do inglês “electrospray ionization”)
HEPES	4-(2-hidroxietil)piperazina-1-ácido etanosulfúrico, N-(2-hidroxietil)piperazina-N’-(2-ácido etanosulfúrico)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês “human immunodeficiency virus”)

HPLC	Cromatografia líquida de elevada performance (do inglês “High performance liquid chromatography”)
HOMO	Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês “highest occupied molecular orbital”)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês “International Union of Pure and Applied Chemistry”)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K _p	Constante de partição
Log P	Logaritmo do coeficiente de partição
LUMO	Orbital molecular desocupada de menor energia (do inglês “lowest unoccupied molecular orbital”)
LUVs	Vesículas unilamelares grandes (do inglês “Large unilamellar vesicles”)
Luz11	5,10,15,20-Tetraquis(2,6-difluoro-3- <i>N</i> -metilsulfamoilfenil)bacterioclorina
MALDI	Ionização/Desorção de Matriz Assistida por Laser (do inglês “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization”)
<i>m</i>	Multiplete
[M] ⁺	Ião molecular
[M+H] ⁺	Ião molecular protonado
M _w	Radiação micro-ondas
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NaY	Zeólito de NaY
NBD-DMPE	<i>N</i> -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino-1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (do inglês “ <i>p</i> -aminobenzoic acid”)
PBS	Tampão fosfato (pH=7.4) (do inglês “phosphate buffer saline”)
PDT	Terapia fotodinâmica (do inglês “photodynamic therapy”)
pH	Potencial hidrogenóico
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
POPS	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoserina
ppm	Partes por milhão
PS	Fotossensibilizador
<i>p</i> -TSH	<i>p</i> -Toluenosulfonil-hidrazina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ^{19}F	Ressonância magnética nuclear de flúor
S	Estado eletrónico singuleto
s	Singuleto
sl	Sinal largo
SM ^o	Lípidos membranares da monocamada externa
SM ⁱ	Lípidos membranares da monocamada interna
SN ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
SW ^o	Meio aquoso extracelular
SW ⁱ	Meio aquoso intracelular
t	Tripleto
T	Estado electrónico tripleto
TCCA	Ácido triclorocianúrico
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina
TMS	Tetrametilsilano
TPFPP	5,10,15,20-tetraquis (pentafluorofenil) porfirina
TPP	<i>Meso</i> -tetrafenilporfirina
t _T (N ₂)	Tempo de vida do estado tripleto na ausência de oxigénio
t _T (O ₂)	Tempo de vida do estado tripleto na presença de oxigénio
u.a.	Unidades arbitrárias

Resumo

Nas sociedades modernas assiste-se a um aumento crescente do número de bactérias e vírus com resistência aos fármacos atualmente disponibilizados pela indústria farmacêutica. Dada a relevância da problemática mencionada, o objetivo central do trabalho apresentado nesta dissertação consiste no desenvolvimento de métodos de síntese de novas entidades químicas biocompatíveis constituídas por macrociclos tetrapirrólicos e sulfonamidas, tendo em vista a sua futura potencial aplicação dual como antibacteriano *per se* e como fotossensibilizador para inativação de bactérias recorrendo a terapia fotodinâmica. A combinação destas duas famílias de compostos pode ocorrer por ligação covalente ou via *self-assembly*, subdividindo o trabalho apresentado.

No capítulo 1 apresenta-se uma revisão crítica e selecionada da literatura subjacente aos diferentes tópicos estudados. No capítulo 2 descreve-se uma estratégia de síntese de macrociclos tetrapirrólicos e sulfonamidas unidas por ligação covalente. Neste começa-se por selecionar a a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina como porfirina base para realizar os estudos de otimização da sua derivatização com a metanosulfonamida, conseguindo-se obter com sucesso condições de síntese seletivas para a formação da 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina (composto monossustituído) ou da 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina (composto tetrassustituído) com rendimentos de 19% e 70%, respetivamente. Com o intuito de avaliar o efeito da estrutura da sulfonamida na reatividade alargaram-se os estudos utilizando como nucleófilo duas sulfonamidas previamente sintetizadas no decorrer do trabalho: *p*-toluenosulfonamida e *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida. Através deste estudo foi possível sintetizar e isolar os compostos mono e dissustituídos da família da *p*-toluenosulfonamida (5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e mistura de 5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina) e os compostos mono, di e trissustituído referentes à substituição com a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil] porfirina, mistura de 5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,10,15-tri-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina) com baixos rendimentos (0.6 a 4.5%). A título de exemplo, adotaram-se as condições otimizadas para a síntese da porfirina tetrassustituída contendo a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida como substituinte, obtendo-se a

correspondente 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]porfirina com um rendimento de 20%. Dado o nosso interesse no desenvolvimento de potenciais fotossensibilizadores com espectros de absorção na designada “janela terapêutica”, prosseguimos com estudos de redução de uma das porfirinas com hidrazina aquosa ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e cloreto de ferro(III)hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), tendo-se obtido a correspondente 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]clorina com rendimento de produto isolado elevado (65%). Para além disso com recurso ao método de redução de porfirinas com *p*-toluenosulfonilhidrazina sem solvente conseguiu-se obter a 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]bacterioclorina um rendimento de 70%.

Os compostos foram caracterizados fotofisicamente, tendo revelado possuir características bastante promissoras para aplicação como fotossensibilizadores, tais como, baixos rendimentos quânticos de fluorescência ($\phi_F \leq 0.1375$) e rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto adequados ($\phi_\Delta \geq 0.59$). Para avaliar a lipofilicidade e a interação com a membrana lipídica procedeu-se ao cálculo do coeficiente de partição das porfirinas 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina através de duas metodologias, uma delas recorrendo à mistura octanol-água e a outra a vesículas unilamelares lipídicas (LUVs). Em suma, verificou-se que o número de derivatizações com grupos metanosulfonamida é crucial para modular a anfifilicidade dos compostos, sendo que estes apresentam variações significativas nos seus coeficientes de partição octanol-água ($0.94 \leq \text{LogP} \leq 4$). Apesar destes valores díspares, ambos apresentam uma elevada afinidade para as membranas lipídicas. Por fim, realizaram-se estudos preliminares de citotoxicidade no escuro, com a linha celular 3T3, demonstrando-se que o composto não apresenta toxicidade *in vitro*.

No capítulo 3 desenvolve-se uma metodologia baseada no conceito de *self-assembly*, para a preparação de estruturas contendo porfirinas catiónicas descritas na inativação de bactérias [iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco (II) e iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II)] e a Sulfadiazina, uma sulfonamida com atividade bacteriostática comprovada.

No capítulo 4 apresenta-se detalhadamente os procedimentos experimentais referentes a todos os capítulos da tese bem como a caracterização química completa de todas as moléculas sintetizadas no decorrer do trabalho (^1H RMN, ^{19}F RMN, espectrometria de massa e absorção UV-Vis).

Abstract

Modern society is witnessing an increasing number of drug-resistant bacteria and viruses. Due to the relevance of the subject, this work presents new methods for the synthesis of biocompatible conjugates of sulfonamides and tetrapyrrolic macrocycles for dual chemo and photodynamic therapy. The combination of these two families of compounds may occur by covalent binding or by self-assembly. Therefore, the work here presented is subdivided.

The chapter 1 presents a critical and selected review of the literature underlying the different study topics. The chapter 2 describes a synthetic strategy for preparing tetrapyrrolic macrocycles substituted with sulfonamides by covalent binding. First, we selected 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as starting material to carry out the methanesulfonamide derivatization optimization studies. Selective synthesis conditions were successfully obtained for the formation of 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl]phenyl]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin (mono-substituted compound) or 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl)phenyl]porphyrin (tetra-substituted compound) in 19% and 70 % yields, respectively. In order to evaluate the effect of the sulfonamide structure in the reactivity, we extended the studies using two sulfonamides previously synthesized in this work as nucleophiles: *p*-toluenesulfonamide and *N*-methyl-*p*-toluenesulfonamide. From this study, it was possible to synthesize and isolate the mono and disubstituted compounds of the *p*-toluenesulfonamide family (5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin, mixture of 5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin and 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin) and the mono-, di- and tri-substituted compounds related to substitution with the *N*-methyl-*p*-toluenesulfonamide (5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-methyl-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin, mixture of 5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-methyl-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin and 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-methyl-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin and 5,10,15-tri-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-methyl-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]-20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin) in low yields (0.6 to 4.5%). The optimized conditions for the synthesis of tetra-substituted porphyrin were adopted using the *N*-methyl-*p*-toluenesulfonamide as nucleophile. We obtained the corresponding 5,10,15,20-tetra[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-methyl-*p*-toluenesulfamoyl)phenyl]porphyrin in 20% yield.

We proceeded with the reduction studies of one of the synthesized porphyrins, using catalytic amounts of ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and aqueous hydrazine ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), affording the corresponding 5,10,15,20-tetra [2', 3', 5', 6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl] phenyl] chlorin in high yield (65%). Furthermore, we used the solvent free synthetic methodology via reduction with *p*-toluenesulfonylhydrazide to obtain the 5,10,15,20-tetra[2', 3', 5', 6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl] phenyl] bacteriochlorin in 70% yield.

The photophysical assessment shows that the compounds have very promising characteristics to be used as photosensitizers, such as low fluorescence quantum yields ($\phi_F \leq 0.1375$) and suitable quantum yields of singlet oxygen formation ($\phi_\Delta \geq 0.59$). The lipophilicity and the interaction with the lipid membrane was evaluated by calculating the partition coefficient of 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl]phenyl]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)phenyl]porphyrin and 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-methanesulfamoyl)phenyl]porphyrin using two methods, the octanol/water partition coefficients and lipid unilamellar vesicles (LUVs). From the values obtained, we can assume that the number of metanesulfonamide fragments is crucial to modulate the amphiphilicity of the compounds. While the mono-substituted porphyrin display a $\log P_{ow} > 4$, the tetra-substituted porphyrin shows a value of $\log P_{ow} = 0.937$. Despite these distinct values, both display high lipid membrane affinity. Finally, preliminary *in vitro* tests with 3T3 fibroblast cell line show that the compound is not toxic.

In chapter 3 a methodology based on the *self-assembly* concept is developed for the preparation of structures containing cationic porphyrins described in bacteria inactivation [5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrinate zinc (II) tetraiodide, 5,10,15,20-tetrakis(1,3-dimethylimidazolium-2-yl) porphyrinate zinc (II) tetraiodide] and Sulfadiazine, a sulfonamide with proven bacteriostatic activity.

The chapter 4 presents detailed experimental procedures relating to all the chapters of this thesis, as well as complete chemical characterization of all synthesized compounds (^1H NMR, ^{19}F NMR, mass spectrometry and UV-Vis absorption).

Nomenclatura

O primeiro sistema de nomenclatura desenvolvido para macrociclos tetrapirrólicos, designa-se por nomenclatura de Fisherⁱ e baseia-se principalmente na utilização de nomes triviais combinado com um sistema de numeração. A figura Ia, representa a numeração de Fisher para porfirinas. Segundo este autor, o macrociclo tetrapirrólico conjugado toma o nome de porfirina, denominando as posições periféricas deste por posições β e as pontes metilénicas por posições *meso*. As posições β pirrólicas são numeradas de 1 a 8 e as posições *meso* são designadas pelas letras gregas α , β , δ e γ .

Este sistema rapidamente se tornou insuficiente devido ao grande crescimento da química de porfirinas levando ao aparecimento de um novo sistema de nomenclatura sistemática regulamentada pela IUPACⁱⁱ. Neste os carbonos são numerados sequencialmente de 1 a 20 e os azotos pirrólicos de 21 a 24, Figura Ib.

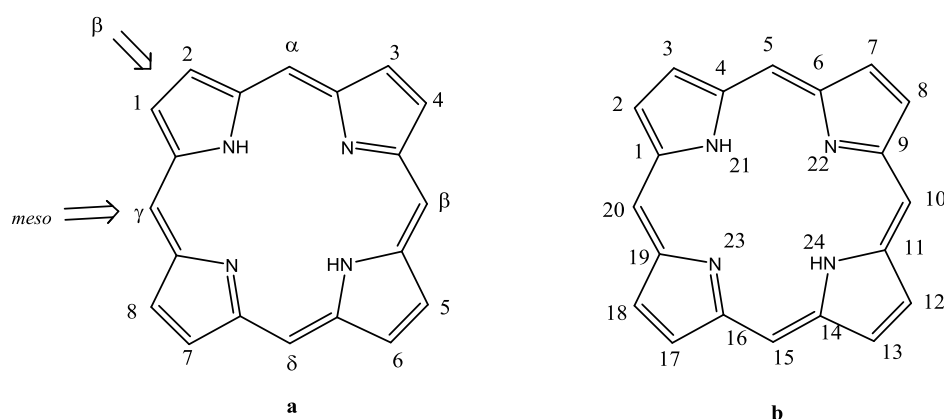


Figura I- Numeração de macrociclos tetrapirrólicos segundo Fisher **a** e a IUPAC **b**.

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 IIa). 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 IIb).

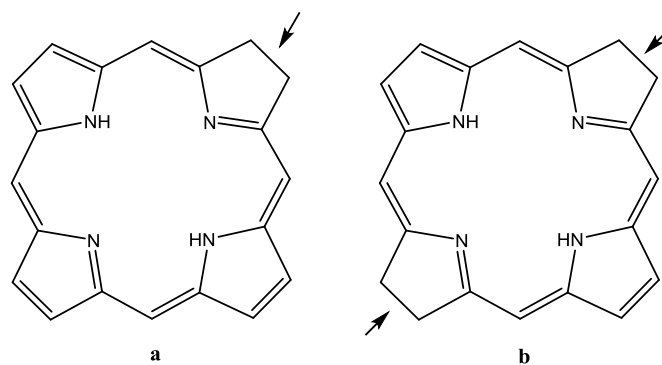


Figura II- Estruturas de macrociclos tetrapirrólicos reduzidos: clorina **a** e bacterioclorina **b**

Por uma questão de simplicidade, nesta dissertação adotaram-se as duas nomenclaturas. As porfirinas substituídas serão numeradas segundo as recomendações da IUPAC. No entanto, será também utilizada a nomenclatura de Fisher para referenciar átomos do macrociclo tetrapirrólico segundo a posição onde se encontram, nomeadamente β -pirrólica ou *meso* e para designar os derivados hidroporfíricos: clorina e bacterioclorina.

ⁱ Fischer H., Orth H., *Die Chemie des Pyrrols*, Akad. Verlagsges, Leipzig, **1934**, 1.

ⁱⁱ Moss G.P., *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779-832.

Capítulo 1

Introdução

Desde tempos imemoráveis que a Natureza é conhecida como fonte de recursos para aplicação terapêutica, nomeadamente, a descrição da utilização de plantas e poções com efeito antibacteriano remonta às civilizações antigas.^{1,2,3,4,5,6} Curiosamente, apenas em 1910 nasceu o primeiro exemplo de um fármaco antimicrobiano puramente sintético, o Salvarsan, um composto contendo arsénio desenvolvido por Ehrlich's.⁷ Ao longo das subsequentes décadas foram realizados progressos notáveis, destacando-se o isolamento da penicilina de um fungo pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming⁸ em 1928. A partir deste importante marco, diversos antibióticos foram descobertos e posteriormente modificados e otimizados surgindo diversas gerações destes.⁹ Encontrávamo-nos na “Era dos Antibióticos” e a maioria das doenças bacterianas consideravam-se aparentemente controladas.¹⁰ Contudo, rapidamente esta ilusão se desvaneceu devido ao aparecimento dos primeiros casos de resistência aos fármacos antibacterianos. Algumas das bactérias mais comuns, como estirpes de *Staphylococcus aureus*, tornaram-se resistentes às primeiras classes de fármacos em tempo recorde.¹¹ O desenvolvimento de resistência antimicrobiana é uma ameaça crescente para a saúde pública^{12,13,14,15,16} e apesar de ser um fenómeno evolutivo natural este foi notoriamente acelerado em consequência de uma utilização abusiva e incorreta dos antibióticos.¹⁷ Preocupantemente, este fenómeno é bem visível em Portugal que ocupa uma posição cimeira no ranking dos países europeus com maior consumo de antibióticos. Segundo dados da Direção Geral de Saúde, Portugal apresenta uma taxa elevada e crescente de resistência bacteriana aos antimicrobianos, estando entre os países europeus com maior taxa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e de *Escherichia coli* resistente às quinolonas.¹⁸

Salienta-se que a diminuição da investigação nesta área por parte da indústria farmacêutica, relacionada com diversos motivos estratégicos e financeiros, contribuiu também significativamente para agravar a situação referida. Urge portanto, desenvolver novas formas de tratamento que contornem o problema,¹⁹ surgindo a terapia fotodinâmica (PDT) como uma excelente solução.^{20,21,22}

Baseado neste conhecimento e como tentativa de dar algum contributo para a resolução desta problemática formulou-se a hipótese central do trabalho apresentado nesta dissertação que consiste no desenvolvimento de métodos de síntese de novas entidades químicas com dupla funcionalidade, incluindo na sua estrutura sulfonamidas, reconhecidos antibacterianos²³, e macrociclos tetrapirrólicos, eficientes fotossensibilizadores para PDT²⁴.

1.1- Macrociclos tetrapirrólicos - síntese e aplicações

Os macrociclos tetrapirrólicos são uma classe de compostos de origem natural que ocupam um papel fulcral em diversos processos essenciais à vida. Por exemplo, as porfirinas exercem uma ampla gama de funções, desde o transporte de oxigênio no sangue, levado a cabo pelo grupo prostético heme (complexo protoporfirina IX-Fe (II)) presente na hemoglobina, à catálise de reações de oxidação²⁵, nomeadamente nos citocromos e em enzimas, como a peroxidase e a catalase. Ao reduzir uma ou duas posições do anel porfirínico obtemos hidroporfirinas (figura 1.1) da família das clorinas e bacterioclorinas, compostos com propriedades físico-químicas bastante distintas. Estas têm um papel crucial, nomeadamente, na transformação de energia solar em energia química nos seres fotossintéticos.

A grande diversidade de funções biológicas desempenhadas por esta classe de compostos, demonstra que pequenas alterações na sua estrutura base podem conduzir a propriedades e aplicações distintas.

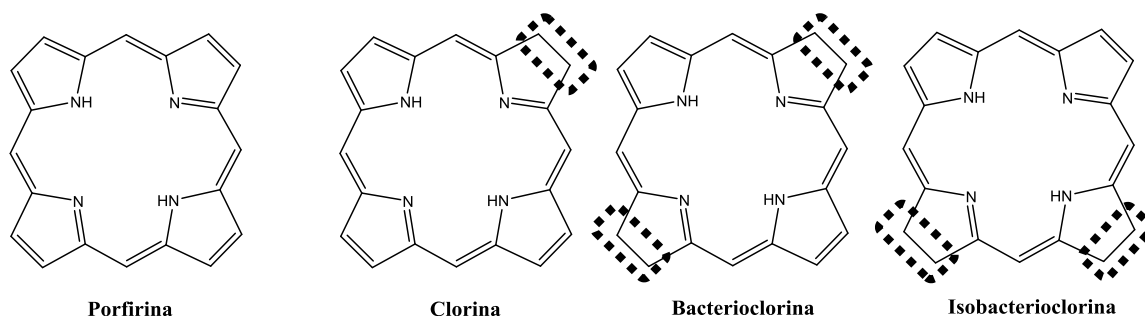


Figura 1.1- Estrutura geral de uma porfirina e seus derivados reduzidos

A consciência da importância supracitada destes compostos fomentou uma crescente exploração das suas propriedades e potenciais aplicações. Deste modo, estas têm sido utilizadas com grande sucesso como catalisadores,^{26,27} sensores químicos,²⁸ novos materiais eletrónicos,²⁹ células fotovoltaicas,³⁰ sistemas para ótica linear,³¹ entre outros. No entanto, é na medicina que têm ganho maior relevância onde intervêm como agentes de imagiologia molecular,^{32,33,34,35} no tratamento de situações oncológicas,^{36,37,38,39,40} oftalmológicas⁴¹ e na inativação de vírus e bactérias⁴² através da terapia fotodinâmica.

Nas secções seguintes apresenta-se uma seleção de métodos de síntese de macrociclos tetrapirrólicos considerados marcos relevantes neste domínio.

Síntese de *meso*-arilporfirinas

Rothemund⁴³ descreveu pela primeira vez, em 1935, a síntese de porfirinas simétricas, através da reação de condensação de pirrol com o aldeído apropriado, realizada em atmosfera inerte, à temperatura de 100 °C durante 48h e usando como solvente piridina. Mais tarde, esta reação foi modificada por Adler e Longo⁴⁴ usando ácido propiónico como solvente e exposição ao ar. Esta estratégia permitiu obter melhores rendimentos, no entanto, apresenta problemas no que diz respeito à contaminação pelas clorinas correspondentes. Posteriormente, Lindsey⁴⁵ e os seus colaboradores recorreram a um método de 2 passos. O intermediário foi sintetizado por condensação do pirrol com aldeídos aromáticos numa solução diluída de um solvente clorado (CHCl₃ ou CH₂Cl₂) à temperatura ambiente, usando um catalisador ácido forte (TFA ou BF₃EtO₂) em atmosfera inerte. A oxidação do porfirinogénio à correspondente porfirina efetuou-se usando quinonas (DDQ). Como desvantagens este apresenta a necessidade de grandes diluições no primeiro passo, a utilização de um oxidante caro e de processos de purificação difíceis e dispendiosos.

Já em 1991, foi desenvolvido em Coimbra⁴⁶ uma metodologia de síntese de porfirinas, num único passo reacional, com objetivo de colmatar as limitações que os métodos anteriores apresentavam. Este novo método de síntese conhecido, na literatura, como método do nitrobenzeno consiste na reação aeróbia de pirrol com os diferentes aldeídos, a uma temperatura de 120°C durante aproximadamente 1 hora, utilizando como solvente uma mistura de ácido acético/nitrobenzeno (7:3). Em muitos dos casos em que este método é utilizado, a porfirina cristaliza diretamente no meio reacional, após adição de metanol, com um elevado grau de pureza e com pequenas ou nenhuma contaminação com a clorina correspondente. Apesar dos rendimentos obtidos em determinados exemplos serem inferiores, comparados com os das metodologias anteriores, isto é superado pelas vantagens apresentadas. Numa tentativa de otimizar os rendimentos e sustentabilidade dos processos foi recentemente desenvolvido por Pereira e colaboradores⁴⁷ o método do NaY que tem por base o método citado anteriormente mas difere na adição de NaY, um alumino-silicato que funciona como ácido de Lewis. Segundo os dados, as reações efetuadas na presença deste catalisador conseguem duplicar os rendimentos. Além disso, o NaY é considerado um catalisador verde uma vez que pode ser recuperado por filtração e reutilizado necessitando apenas de lavagem e reativação numa estufa.

No mesmo ano, procurando métodos menos poluentes, desenvolveu-se mais uma vez no laboratório de Catálise & Química Fina de Coimbra, um método pioneiro para a síntese sustentável de porfirinas, através da exploração de características únicas da água superaquecida sob irradiação micro-ondas.⁴⁸ A água, sob irradiação micro-ondas (máximo de 300W), e a uma temperatura de 473 K, atinge pressões acima de 16 bar, sendo capaz de agir como catalisador, sem o uso de solventes

orgânicos e oxidantes, permitindo a formação de porfirinas com rendimentos elevados. Deste modo, esta metodologia é detentora de um fator E de apenas 35, batendo de longe as restantes metodologias descritas em termos de sustentabilidade (Adler e Longo – 158; Gonsalves-Pereira - 300; Lindsey - 2252).⁴⁸ Além dos benefícios ambientais referidos, esta apresenta também uma diminuição considerável do impacto económico, uma vez, que dispensa a utilização de solventes e oxidantes, geralmente de elevado custo. Os diferentes métodos de síntese encontram-se sumariados na figura 1.2.

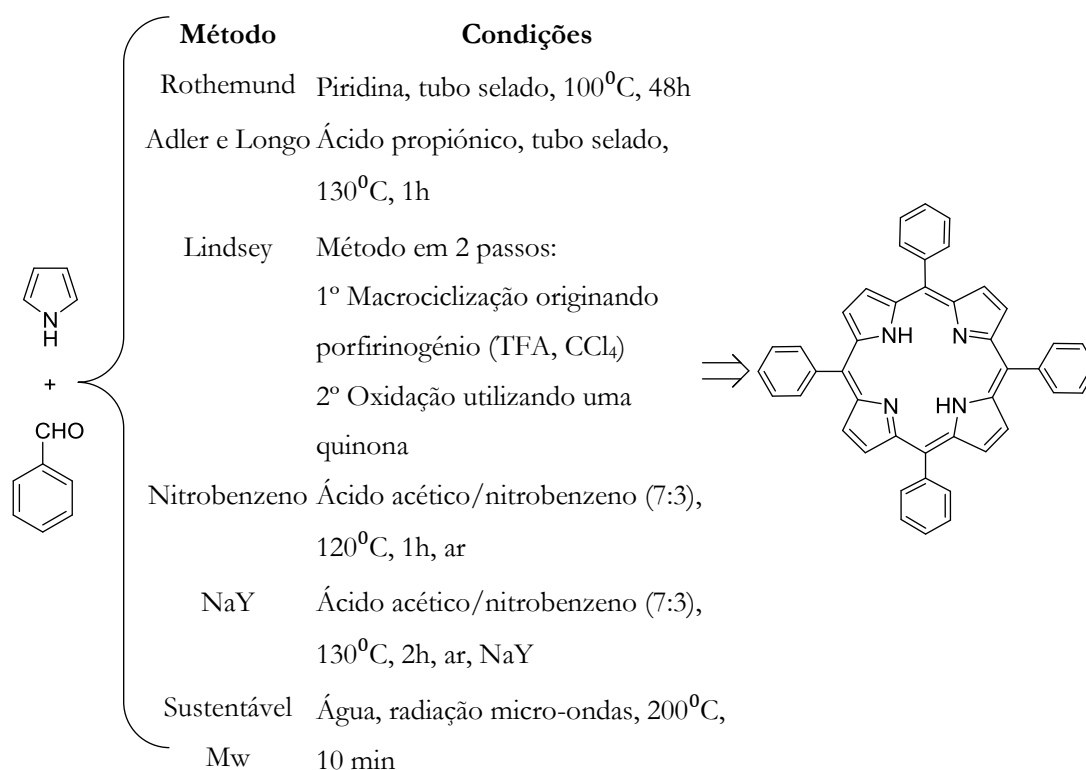


Figura 1.2- Esquema resumo dos métodos de síntese de *meso*-arilporfirinas

Síntese de hidroporfirinas

A síntese de clorinas (Figura 1.1) baseia-se tipicamente em três estratégias: a síntese total,^{49,50} a modificação de produtos naturais⁵¹ e ainda a derivatização de porfirinas.^{52,53,54,55} No âmbito do trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação, a clorina sintetizada será derivada de uma *meso*-arilporfirina pelo que apenas a última estratégia irá ser abordada com mais detalhe nesta revisão da literatura selecionada.

O método de obtenção de clorinas por redução de uma das duplas ligações carbono-carbono é o único método de derivatização de porfirinas que permite obter as clorinas correspondentes com estrutura semelhante, diferindo da estrutura do precursor apenas na posição

reduzida. Para este efeito, encontra-se descrito a utilização de condições de hidrogenação catalítica com hidrogénio e paládio⁵⁵, bem como, a utilização da *p*-toluenosulfonilhidrazida. Em 1969, Withlock⁵⁶ foi pioneiro ao desenvolver o primeiro método com recurso à *p*-toluenosulfonilhidrazida, porém, este recorria a solventes tóxicos, tais como piridina. Este método foi utilizado por Bonnet para a síntese de uma das clorinas mais conhecidas com aplicação em PDT, denominada Foscan.⁵⁷ Tendo este como ponto de partida, em 2010 foi patenteado um método mais simples e ambientalmente mais sustentável, recorrendo à redução pela diimida originada a partir do seu precursor (*p*-toluenosulfonilhidrazida), sem a adição de qualquer solvente.^{58,59,60} Para obter seletivamente a clorina é necessário um segundo passo de oxidação da bacterioclorina formada. Adicionalmente, podem também obter-se clorinas mediante a oxidação de uma das duplas ligações de porfirinas meso-substituídas, recorrendo ao tetróxido de ósmio.⁶¹ Este método encontra-se atualmente em desuso em detrimento da derivatização de porfirinas através de reações de cicloadição.⁶² As porfirinas quando detentoras dos substituintes adequados podem participar em reações de cicloadição 1,3-dipolar,⁶³ tanto como dipolarófilos como 1,3-dipolos; em reações Diels-Alder,^{64,65} quer como dienos quer dienófilos, bem como em reações queletrópicas com diazo compostos.⁶⁶ Contudo, estas estratégias originam clorinas com estruturas muito distintas das porfirinas que lhes deram origem.

Recentemente, Lamani⁶⁷ descreveu um método de redução de olefinas utilizando hidrazina aquosa ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como fonte de hidrogénio, à temperatura ambiente, e quantidades catalíticas de cloreto de ferro (III)hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Este é claramente um método mais sustentável do que os anteriormente descritos pelo que neste trabalho procedemos à prova de conceito para aplicação desta metodologia inovadora na redução de porfirinas às respetivas clorinas.

No que diz respeito aos compostos derivados de porfirinas reduzidos em duas posições, bacterioclorinas (Figura 1.1), existem na literatura três estratégias sintéticas semelhantes às descritas para a síntese de clorinas: a síntese total,⁶⁸ a modificação de produtos naturais e ainda a derivatização de porfirinas ou clorinas.^{69,70,71} Têm sido preparadas bacterioclorinas por derivatização de porfirinas recorrendo a oxidação por tetróxido de ósmio⁷² bem como através de reações de ciclo-adição, tais como Diels-Alder,^{73,74} 1,3-dipolar,⁷⁵ entre outras.⁷⁶ A síntese destes derivados reduzidos começou por enfrentar algumas dificuldades, devido à instabilidade demonstrada pela gama de compostos testados,^{77,78,79} contudo, recorrendo à introdução de grupos substituintes eletroatractores que contribuem para a estabilização eletrónica do macrociclo estas foram superadas.^{80,81,82}

Na síntese de bacterioclorinas por redução com hidrazinas salienta-se mais uma vez, o trabalho pioneiro de Withlock⁵⁶ recentemente otimizado em Coimbra, para a transformação de *meso*-arilporfirinas contendo grupos sulfonamida nas bacterioclorinas correspondentes, sem adição de solvente e/ou base.^{58,59,60} Este método foi utilizado na síntese de 5,10,15,20-tetraquis(2,6-

difluoro-3-*N*-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina o primeiro fármaco para terapia fotodinâmica do cancro desenvolvido numa universidade portuguesa em colaboração com a indústria, que já se encontra em ensaios clínicos.^{83,84}

1.2- Sulfonamidas - síntese e aplicações

A história das sulfonamidas iniciou-se com a descoberta do Prontosil, o primeiro fármaco pertencente a esta classe. Este foi desenvolvido na década de 1930 por uma equipa de investigadores dos laboratórios Bayer na Alemanha detendo atividade antibacteriana. Curiosamente apresentava atividade *in vivo* mas não *in vitro*, mistério desvendado ao descobrir que o Prontosil tinha de ser metabolizado por uma enzima intestinal para se tornar ativo tratando-se assim de um pró-fármaco onde o metabolito (Sulfanilamida) é que apresenta atividade. Em 1939 Gerhard Johannes Paul Domagk, diretor do Instituto de Patologia e Bacteriologia da Bayer foi premiado com o Nobel da Fisiologia / Medicina pelo trabalho desenvolvido na descoberta deste fármaco.⁸⁵

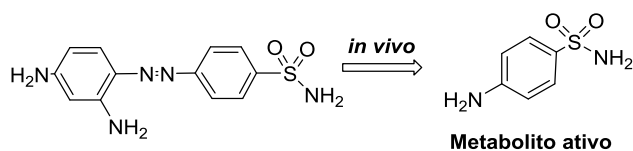


Figura 1.3 – Metabolismo do Prontosil *in vivo*

Desencadeou-se uma nova Era, onde inúmeras sulfonamidas foram sintetizadas e novas atividades terapêuticas destas foram descobertas,^{86,87,88} nomeadamente a inibição de proteases de cisteína,^{89,90,91,92} de proteases de HIV,⁹³ da anidrase carbónica,^{94,95,96,97,98} da COX-II,⁹⁹ da fosfodiesterase-5 metabolizadora do cGMP⁹⁹ e da sintetase de dihidroperóxido,^{9,23} entre outras. Além disso, encontram-se descritas também como agentes hipoglicemiantes.¹⁰⁰

Tendo em conta o enquadramento do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação, apresenta-se com mais detalhe o mecanismo de atuação das sulfonamidas como antibacterianos. Estas atuam como inibidores competitivos da enzima sintetase de dihidroperóxido mimetizando o seu substrato natural, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA). Deste modo, impossibilitam a síntese de ácido tetra-hidrofólico, imprescindível para a formação de precursores dos ácidos nucleicos e consequentemente inibem o crescimento e divisão celular.²³ No entanto, a ligação das sulfonamidas à enzima referida é reversível, sendo possível que as células bacterianas adquiram resistência ao fármaco quer pelo aumento da quantidade de PABA produzido, quer pela ocorrência de mutações que podem alterar a permeabilidade da membrana celular ao fármaco ou diminuir a afinidade da enzima para este. Os fármacos não são tóxicos para o organismo humano uma vez que as nossas células não produzem ácido tetra-hidrofólico e consequentemente não contêm a enzima alvo.⁸⁵

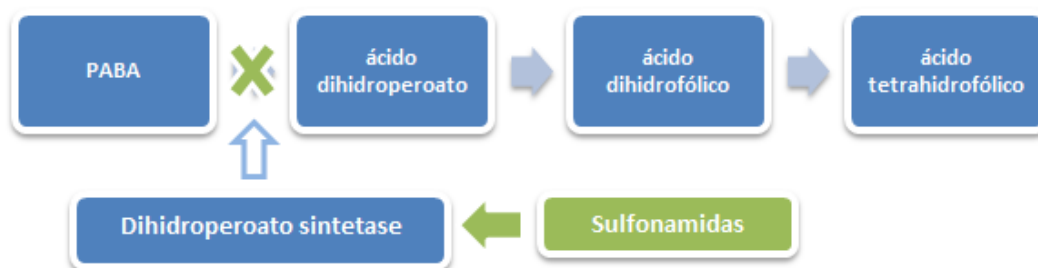


Figura 1.4- Esquema ilustrativo da síntese de ácido tetra-hidrofólico

Das diversas sulfonamidas de uso clínico podemos destacar a Sulfadiazina, comercializada como Dermazine® e a Sulfadoxina administrada com pirimetamina com ação antimalárica e comercializado como Fansidar®.¹⁰¹

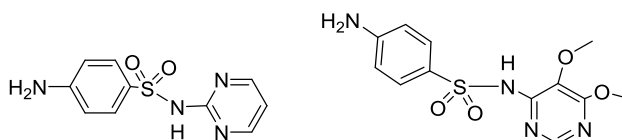


Figura 1.5- Estrutura da Sulfadiazina e Sulfadoxina

Síntese de Sulfonamidas

Precocemente descobertas e com um largo espectro de aplicabilidade, as sulfonamidas encontram-se vastamente exploradas, conhecendo-se mais de uma dezena de métodos de síntese. Deste modo, descreve-se uma longa lista de possíveis precursores, nomeadamente cloretos de sulfonilo^{102,103,104}(A), reagentes de Grignard¹⁰⁵ (B), sulfonatos⁹⁰ (C), ácidos sulfônicos^{106,107} (D), tióis^{108,109,110,111} (E), sulfenamidas⁹⁰ (F), entre outros.^{112,113} A figura 1.6 esquematiza os diversos métodos de síntese, identificando os precursores com a respetiva letra.

O método mais utilizado para a síntese de sulfonamidas consiste no acoplamento de uma amina, primária ou secundária, com um cloreto de sulfonilo (figura 1.6, A).^{114,115,116} Inicialmente o cloreto de sulfonilo era preparado a partir do ácido sulfônico correspondente recorrendo a um agente clorante, os mais comuns são SOCl_2 , PCl_5 e POCl_3 . No entanto este método requeria excesso de oxidante e de ácido o que não é compatível com a presença de grupos sensíveis.⁹⁹ Todavia novos métodos para contornar esta problemática foram surgindo, nomeadamente a utilização de reagentes de Grignard.¹¹⁷ No presente trabalho iremos escolher a estratégia sintética que recorre a cloretos de sulfonilo comerciais e proceder à sua derivatização com a amina desejada.

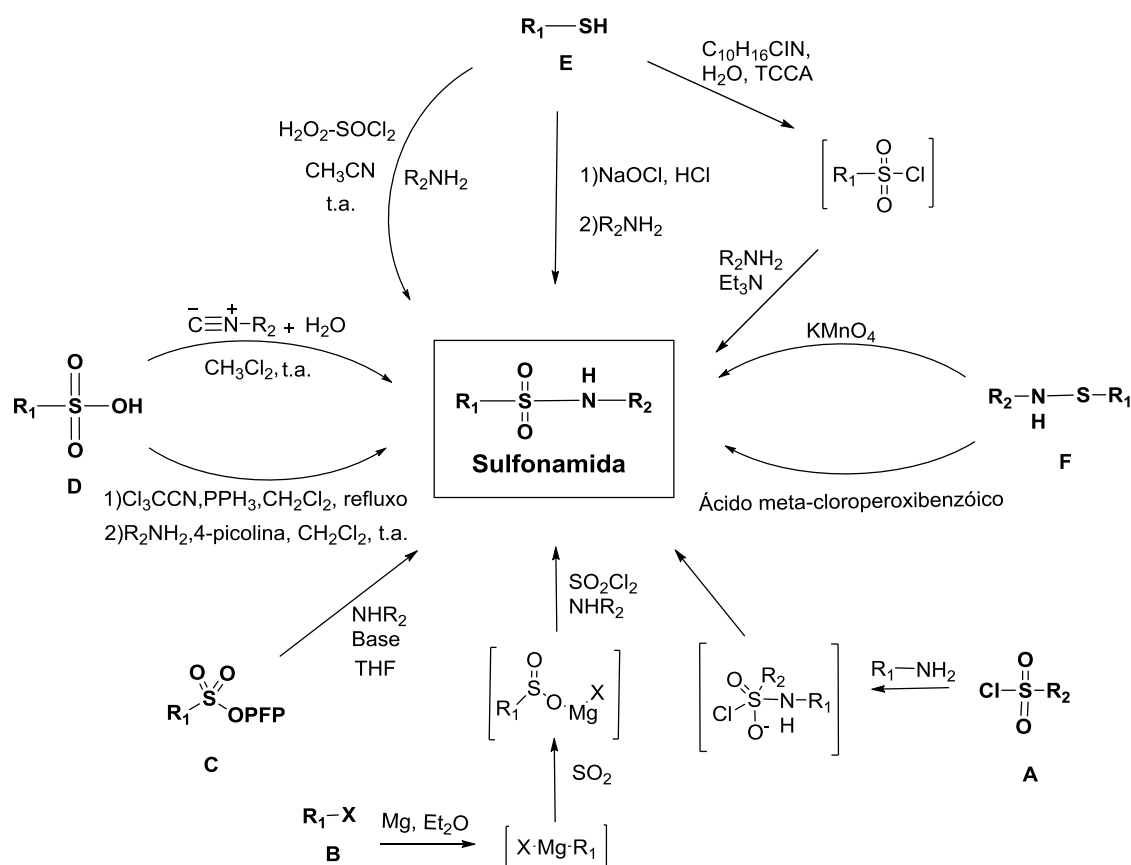


Figura 1.6 – Métodos de síntese de sulfonamidas

1.3-Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste numa metodologia terapêutica que requer a combinação de três fatores: uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, oxigênio molecular e um agente intermediário, denominado fotossensibilizador (PS), capaz de absorver e transferir energia da fonte de luz para o oxigênio, conduzindo à formação de espécies citotóxicas que causam danos e consequente morte das células. Na presença de luz, o PS transita para um estado excitado singuleto de maior energia. O retorno deste para o estado fundamental singuleto pode ocorrer de forma direta, através da emissão de luz (fluorescência) ou de calor (conversão interna), ou de forma indireta, sofrendo cruzamento intersistemas para o estado tripleto. Neste estado o PS pode interagir com o oxigênio molecular por dois mecanismos diferentes. O mecanismo tipo I, que consiste na transferência de elétrons para o oxigênio molecular originando espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilo ($HO\cdot$), radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), etc. ou o mecanismo tipo II, que envolve a transferência de energia com a consequente formação de oxigênio singuleto (1O_2) (figura 1.7).^{118,119,120,121}

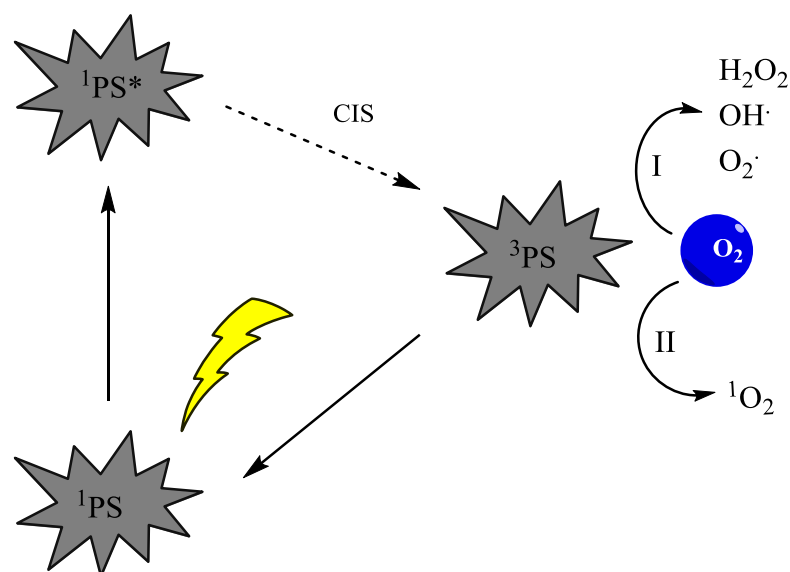


Figura 1.7- Esquema resumo do comportamento do PS em terapia fotodinâmica

Um fotossensibilizador ideal para PDT deve possuir as seguintes características: elevada pureza e estabilidade química; síntese fácil e de elevado rendimento; baixa toxicidade no escuro, tanto do fotossensibilizador, como dos metabolitos; forte absorção na região do infravermelho, no espectro eletromagnético de UV-visível (600-850 nm, a designada “janela terapêutica”); possuir características fotofísicas apropriadas, como baixo rendimento quântico de fluorescência, elevado rendimento quântico de oxigênio singleto e um estado tripleto com um tempo de semivida elevado, bem como, um coeficiente de partição adequado à via de administração pretendida e que permita a dissolução em formulações biocompatíveis, caso necessário.¹²²

De entre as múltiplas aplicações da terapia fotodinâmica referidas anteriormente salienta-se a inativação de bactérias (aPDT),²⁴ por ser uma potencial aplicação dos compostos sintetizados no decorrer do trabalho descrito nesta dissertação. Antes de apresentarmos uma seleção de fotossensibilizadores da família dos macrociclos tetrapirrólicos já utilizados em aPDT considera-se relevante descrever a estrutura membranar dos seus alvos biológicos (bactérias).

As células bacterianas exibem uma grande variedade de formas, tamanhos, arquitetura subcelular e composição bioquímica, conseqüentemente, a suscetibilidade aos PSs pode ser substancialmente diferente. Esta família divide-se essencialmente em duas classes: as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas apresentam na composição da sua parede celular ácidos teicóico e lipoteicóico organizados em múltiplas camadas de peptidoglicanos, conferindo um certo grau de porosidade, o que permite que algumas moléculas consigam permear. Assim, nesta classe de bactérias, a parede celular não atua como uma barreira à permeabilidade para a maioria dos PSs comumente utilizados. Pelo contrário, as bactérias Gram-negativas externamente à rede formada pelo peptidoglicano possuem um elemento estrutural denso

com composição heterogênea, que inclui desde proteínas com função de porinas, a lipopolissacarídeos e lipoproteínas, conferindo à superfície externa um escudo denso e praticamente contínuo de carga negativa. Este sistema organizado forma uma barreira de permeabilidade efetiva, restringindo a permeação da maioria dos PSs.

Com base nestas considerações, as bactérias Gram-negativas revelam-se os alvos mais desafiantes.^{123,124,125,126} A estratégia utilizada tem consistido essencialmente no desenvolvimento de fotossensibilizadores catiónicos, devido ao facto de estes conseguirem penetrar a membrana celular de ambas as classes de bactérias mas também por vários estudos demonstrarem que estes possuem uma maior seletividade para células bacterianas.^{127,128,129,130} Na literatura descreve-se uma estratégia alternativa que consiste na administração simultânea de agentes destabilizadores da membrana de bactérias Gram-negativas (Tris-EDTA e polimixina B) com os PSs.^{131,132}

Devido às dificuldades sintéticas e fraca disponibilidade de porfirinas naturais, a utilização de macrociclos tetrapirrólicos *meso*-substituídos, facilmente obtidos por métodos sintéticos sustentáveis, têm sido a escolha principal para o desenvolvimento de novas gerações de fotossensibilizadores.^{47,48,59,60} Esta recorre essencialmente ao uso de porfirinas catiónicas, cujas estruturas de exemplos selecionados se apresentam na Tabela 1.1.^{137,138,139,140,141,142,143} No entanto, algumas destas apresentam como aspecto negativo a sua elevada toxicidade, sobretudo as derivadas da 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina.^{133,134}

Realça-se que até ao momento, ainda não foi possível induzir resistência a aPDT após tratamentos consecutivos, reforçando a aposta desta terapia como uma alternativa promissora para enfrentar a problemática da resistência aos antibacterianos.^{24,135}

Tabela 1.1- Exemplos selecionados de porfirinas sintéticas utilizadas em aPDT

Fotossensibilizador	Ref	Fotossensibilizador	Ref
<p>M= 2H, Pt, Zn R= CH₃, CH₂CH₂OH, CH₂(CH₂)₂CH₃</p>	136		137
	138	<p>R=</p>	139
	140		141
<p>R=</p>	142		143

Atendendo ao nosso objetivo fulcral que consiste em combinar macrociclos tetrapirrólicos com sulfonamidas por via covalente ou *self-assembly*, em seguida apresenta-se uma revisão da

literatura de exemplos de macrociclos tetrapirrólicos contendo grupos sulfonamidas na sua estrutura, Tabela 1.2.

Analisando estes exemplos, verificamos que na maioria dos compostos a ligação da sulfonamida à porfirina ocorre através do átomo de enxofre, sendo apenas exceção o último composto apresentado em que a ligação ocorre pelo átomo de azoto. Por outro lado, a maioria destes encontram-se descritos como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica convencional, destacando-se a 5,10,15-tris(2,6-diclorofenil)-20-[4-N-(6-amino-hexil)sulfonamidofenil]porfirina, testada por Roxo-rosa¹⁴⁴ tanto em bactéria Gram-negativas como Gram-positivas. Este composto, inócuo para o ADN celular, despertou a atenção da comunidade científica para a pouco explorada área dos fotossensibilizadores neutros.

Tabela 1.2- Conjugados de sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos descritos na literatura

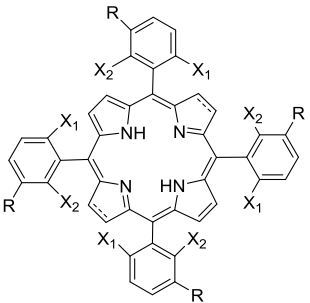
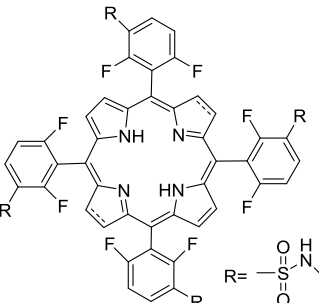
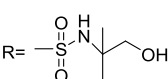
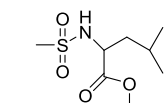
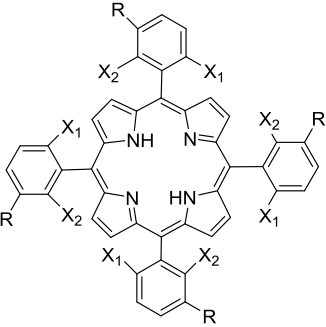
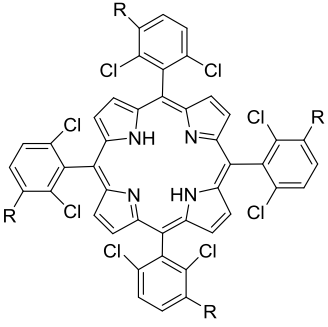

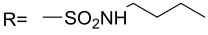
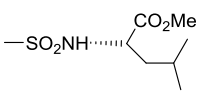
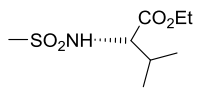


Composto	Ref	Compostos	Ref
	84 81 82		145
<p> $X_1=F, X_2=H$ $R=SO_2NHCH_3$ $X_1=X_2=F$ $R=SO_2NHCH_3$ $X_1=X_2=Cl$ $R=SO_2NHC_2H_5$ $X_1=F, X_2=H$ $R=SO_2NHC_2H_5$ $X_1=Cl, X_2=H$ $R=SO_2NHC_2H_5$ $X_1=X_2=Cl$ $R=SO_2NH(CH_2)_6CH_3$ </p>	80	<p> $R=$   </p>	
			146
<p> $X_1=Cl, X_2=H$ $R=SO_2NHCH_3$ $R=SO_2NH(CH_2)_2CH_3$ $R=SO_2NH(CH_2)_6CH_3$ $R=O_2SN$  </p>		<p> $R=$    </p>	
<p> $X_1=X_2=Cl$ $R=SO_2NHCH_3$ $R=SO_2NH(CH_2)_2CH_3$ $R=O_2SN$  </p>			
<p> $X_1=F, X_2=H$ $R=SO_2NH(CH_2)_2CH_3$ $R=SO_2NH(CH_2)_6CH_3$ $R=O_2SN$  </p>			

Tabela 1.2- Conjugados de sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos descritos na literatura (cont.)

	147		148
	149		144
	150		151

Deste modo, a estratégia utilizada no design das entidades moleculares desenvolvidas e apresentadas nesta dissertação consistiu na tentativa de encontrar sinergias entre a utilização de aPDT combinada com sulfonamidas reconhecidas como bons agentes antibacterianos. Neste sentido, realizou-se uma pesquisa na literatura da aplicação deste conceito. Verificamos que em 1995, Malik e Nitzan¹⁵² testaram uma composição antimicrobiana resultante da combinação de uma ou uma mistura de diferentes porfirinas (deuteroporfirina e hemina) e antibióticos convencionais (metecilina, ampicilina, tetraciclina) aplicada sobre a forma de creme, para inativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados deste estudo demonstraram que a presença de porfirinas aumenta a eficácia do tratamento. Posteriormente, em 2009, Di Poto e os seus colaboradores¹⁵³ desenvolveram um método que consistia num pré-tratamento de biofilmes com PDT, seguido da

aplicação de vancomicina em concentrações abaixo da concentração inibitória do biofilme. Esta metodologia provoca uma desintegração da matriz do biofilme e permite a morte da maioria das bactérias. Recentemente em 2011, Xing e a sua equipa¹⁵⁴ testaram uma fototerapia baseada na conjugação entre uma porfirina e duas moléculas de Vancomicina. Através da presença destas a afinidade e seletividade para ligação à membrana bacteriana demonstrou ser relativamente mais elevada, aumentando consequentemente a eficácia do tratamento.

1.4- Flúor em Química Medicinal

A presença de flúor em compostos orgânicos com potencial aplicação em farmacologia tem sido cada vez mais explorada nos últimos anos.^{155,156} Nomeadamente, cerca de 20% de compostos farmacêuticos contêm pelo menos um átomo de flúor.¹⁵⁷ As alterações estereoquímicas numa molécula induzidas pela substituição de um átomo de hidrogénio por um átomo de flúor são pequenas, devido à semelhança entre os seus raios atômicos. No entanto, a diferença de eletronegatividade é significativa, propriedade que consegue afetar consideravelmente tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica de um potencial fármaco. O local e o grau de substituição podem afetar a sua estabilidade, seletividade e propriedades físicas, tais como pKa e coeficiente de partição (log P).^{158,155} Por outro lado, com uma energia média de dissociação de ligação de 105,4 kcal mol, o vínculo C-F é uma das ligações mais fortes em química orgânica, conferindo uma estabilidade metabólica única.¹⁵⁹ Assim, o desenvolvimento e otimização de novas moléculas orgânicas com átomos de flúor na sua constituição é uma área de interesse crescente na química medicinal.¹⁶⁰ Na família dos fármacos com efeito antibacteriano, temos o exemplo das quinolonas, onde a maioria dos seus membros apresenta pelo menos um átomo de flúor (figura 1.8).

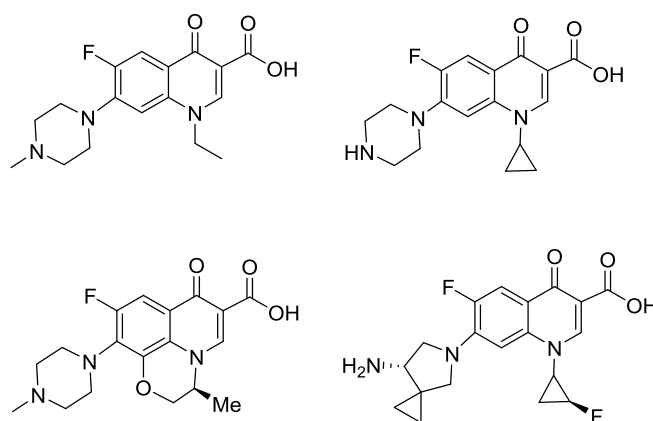


Figura 1.8 - Exemplos de quinolonas

Adicionalmente, a presença de átomos de flúor deixa em aberto outras potenciais aplicações. Compostos anfifílicos fluorados podem encontrar utilização, por exemplo, como sondas para a deteção de cancro com recurso a ressonância magnética de ¹⁹F, uma vez que, o átomo de

flúor possui o seu isótopo 100% ativo para RMN com alta sensibilidade intrínseca em sistemas biológicos.¹⁶¹ Além disso, é bem conhecido que as porfirinas fluoradas se acumulam preferencialmente em tumores,¹⁶² razão pela qual têm sido extensamente utilizadas como fotossensibilizadores para o tratamento de situações oncológicas, tendo todos os compostos fluorados apresentados na tabela 1.2 esta aplicação.

No âmbito dos fotossensibilizadores para aPDT, também se verifica esta tendência, tal como se observa nos exemplos da tabela 1.1.

1.5- Proposta de trabalho

Compilando todos os conhecimentos supracitados, definimos como proposta do trabalho desenvolvido e apresentado nesta dissertação, o desenvolvimento e/ou síntese de moléculas que incorporam na sua estrutura sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com o objetivo de obter novos compostos que possam simultaneamente atuar como antibacterianos *per si* e como fotossensibilizadores para inativação de bactérias, recorrendo à terapia fotodinâmica. Além disso, a presença de sulfonamidas pode funcionar como vetor para as células bacterianas, potenciando a seletividade do tratamento. Neste sentido, subdividimos o trabalho em dois campos de estudo (figura 1.9), o primeiro pretende desenvolver e otimizar métodos de síntese de macrociclos tetrapirrólicos fluorados funcionalizados com sulfonamidas, de modo, a ampliar o conhecimento na área dos fotossensibilizadores antibacterianos neutros. O segundo consiste na funcionalização de porfirinas catiónicas com sulfonamidas através de uma metodologia pouco explorada nesta área, a *self-assembly*.

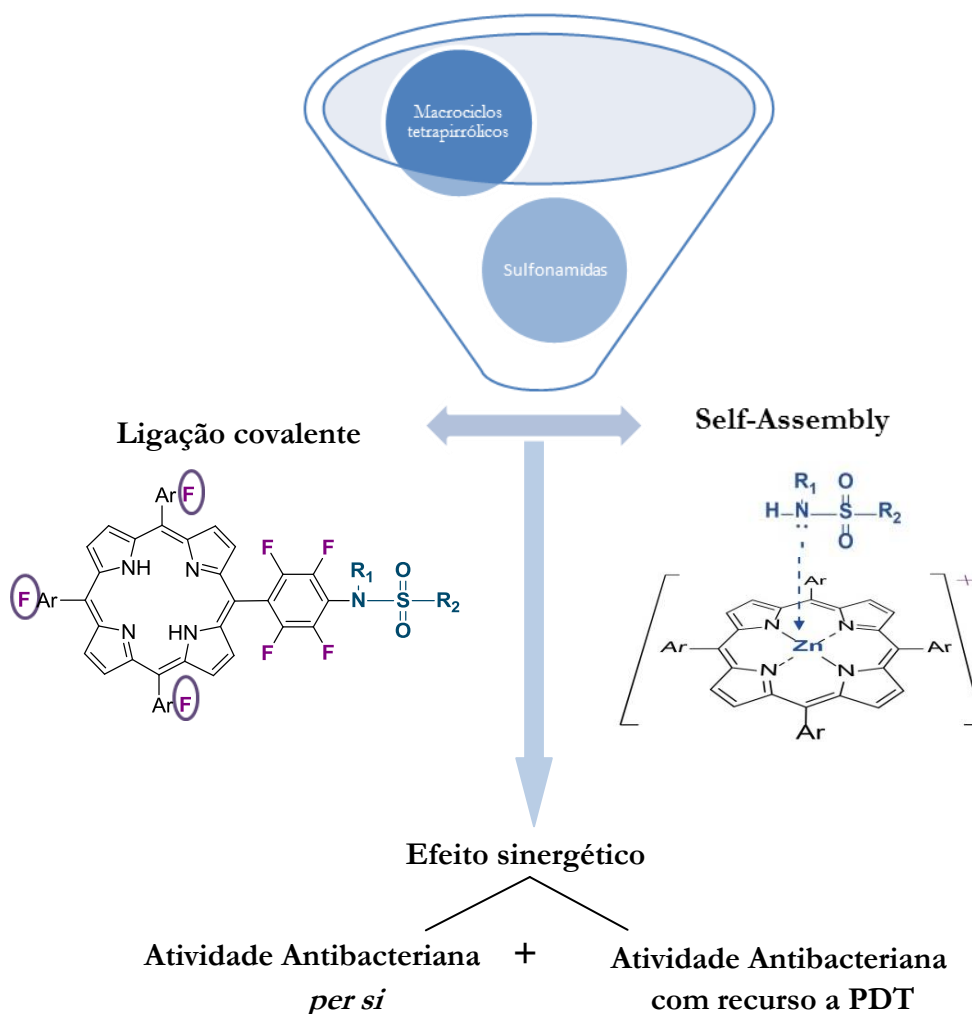


Figura 1.9- Esquema resumo da proposta de trabalho descrita nesta dissertação

Referências

- ¹Bassett E.J., Keith M.S., Armelagos G.J., Martin D.L., Villanueva A.R., *Science*, **1980**, 209, 1532–1534.
- ²Nelson M. L., Dinardo A., Hochberg J., Armelagos G.J., *Am. J. Phys. Anthropol.*, **2010**, 143, 151–154.
- ³Cook M., Molto E., Anderson C., *Am. J. Phys. Anthropol.*, **1989**, 80, 137–143.
- ⁴Armelagos G.J., *Science*, **1969**, 163, 225–258.
- ⁵Cui L., Su X.Z., *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **2009**, 7, 999–1013.
- ⁶Wong R.W., Hägg U., Samaranayake L., Yuen M.K., Seneviratne C.J., Kao R., *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **2010**, 39, 599–605.
- ⁷Ehrlich P., Hata S., *Die Experimentelle Chemotherapie der Spirilososen.*, Berlin: Julius Springer, **1910**.
- ⁸Chain E., Florey H.W., Gardner A.D., Heatley N.G., Jennings M.A., Orr-Ewing J., Sanders A.G., *Lancet*, **1940**, 2, 226–228.
- ⁹Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., P.K Moore, *Farmacologia*, 5 ed., Elsevier, 724-725.
- ¹⁰Zaffiri L., Gardner J., Toledo-Pereyra L.H., *Journal of Investigative Surgery*, **2012**, 25, 67–77.
- ¹¹Rammelkamp M., *Proc R Soc Exp Biol Med*, **1942**, 51, 386–389.
- ¹²Brandta C., Makarewicz O., Fischerb T., Steina C., Pfeifer Y., Werner G., Pletz M. W., *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2014**, 44, 424–430.
- ¹³Oliphant C.M., Eroschenko K., *The Journal for Nurse Practitioners*, **2015**, 11, 1, 79-86.
- ¹⁴Chang H.H., Cohen T., Grad Y.H., Hanage W.P., O'Brien T. F., Lipsitch M., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2015**, 79, 1, 101-116.
- ¹⁵Li X-Z., Plésiat P., Nikaido H., *Clinical Microbiology Reviews*, **2015**, 28, 2, 337-418.
- ¹⁶Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V., *Nature Reviews Microbiology*, **2014**, 13, 1, 42-51.
- ¹⁷Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B., Farrar J., *Phil. Trans. R. Soc. B*, **2015**, 370, 20140083.
- ¹⁸Direção-Geral de Saúde, *Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números*, **2014**.
- ¹⁹Tegos G.P., Hamblin M.R., *Current Opinion in Pharmacology*, **2013**, 13, 673–677.
- ²⁰Ryskova L., Buchta V., Slezak R., *Central European Journal of Biology*, **2010**, 5, 400-406.
- ²¹O’Riordan K., Akilov E.O., Hasan T., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 247-262.
- ²²Maisch T., *Lasers in Medical Science*, **2007**, 2, 83-91.
- ²³Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L., *Goodman&Guilman’s: As bases farmacológicas da terapêutica* . 10 ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, **2005**, 877-881.
- ²⁴Dai T., Huang Y.Y, Hamblin M.R., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, **2009**, 6, 170-188.
- ²⁵Groves J.T., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2000**, 4, 350-352.

- ²⁶Pires S.M.G., Paula R., Simões M.M.Q., Neves M.G.P.M.S., Santos I.C.M.S., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., *Catalysis Communications*, **2009**, 11, 24-28.
- ²⁷Rebelo S.L.H., Pereira M. M., Simões M.M.Q., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., *Journal of Catalysis*, **2005**, 234, 76-87.
- ²⁸Balaban T. S., *Acc. Chem. Res*, **2005**, 38, 612-623.
- ²⁹Pedersena T.G., Lyngea T.B., Kristensena P.K., Johansen P.M., *Thin Solid Films*, **2005**, 477, 182-186.
- ³⁰Campbell W.M., Burrell A.K., Officer D.L., Jolley K.W., *Coordination Chemistry Reviews*, **2004**, 248, 1363-1379.
- ³¹Calvete M.J.F., Yang G.Y., Hanack M., *Synthetic Metals*, **2004**, 141, 231-243.
- ³² Haoyuan Huang, Wentao Song, James Rieffel and Jonathan F. Lovell, *Frontiers in Physics*, **2015**, 3, 23, 1-15.
- ³³Waghorn P. A., *J. Label Compd. Radiopharm*, **2014**, 57, 304-309.
- ³⁴Grancho J.C.P., Pereira M.M., Miguel M.G., Rocha Gonsalves A.M., Burrows H.D., *J. Photochem. Photobiol.*, **2002**, 75, 3, 249-256.
- ³⁵Josefsen L. B., Boyle R. W., *Theranostics*, **2012**, 2, 9, 916-966.
- ³⁶Zhang Y., Lovell J. F., *Theranostics*, **2012**, 2, 9, 905-915.
- ³⁷Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R. K., *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 340-362.
- ³⁸Dąbrowski J. M., Arnaut L.G., Pereira M. M., Urbanska K., Simões S., Stochel G., Cortes L. , *Free Radical Biology & Medicine*, **2012**, 52, 1188-1200.
- ³⁹Dabrowski J.M., Arnaut L.G., Pereira M.M., Urbanska K., Stochel G., *Med. Chem. Commun.*, **2012**, 3, 502-505.
- ⁴⁰Dabrowski J.M., Pereira M.M., Arnaut L.G., Monteiro C.J.P., Peixoto A. F., Karocki A., Urbanska K., Stochel G., *J. Photochem. Photobiol.*, **2007**, 83, 897-903.
- ⁴¹Kulkarni A.D., Kuppermann B. D., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1994-2009.
- ⁴²Hamblin M. R., Hasan T., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 436-450.
- ⁴³Rothmund P., *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, **57**, 2010-2011.
- ⁴⁴Adler A.D., Longo F.R., Finarelli J.D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476-476.
- ⁴⁵Lindsey J.S., Hsu H.C., Schreiman I.C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.
- ⁴⁶Rocha Gonsalves A.M., Varejão J. M.T.B., Pereira M.M., *J. Heterocyclic Chem*, **1991**, 28, 635-640.
- ⁴⁷Silva M., Fernandes A., Bebiano S.S., Calvete M. J. F., Ribeiro M. F., Burrows H. D., Pereira M. M., *Chem Commun (Camb)*, **2014**, 50, 6571-6573.

- ⁴⁸Henriques C.A, Pinto S.M.A, Aquino G.L.B, Pineiro M., Calvete M.J.F, Pereira, M.M., *ChemSusChem*, **2014**, 7, 10, 2821-2824.
- ⁴⁹Aravindu K., Kim H., Taniguchi M., Dilbeck P.L., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2013**, 12, 2089-2109.
- ⁵⁰Krayer M., Yang E., Kim H.-J., Kee H.L., Deans R.M., Sluder C.E., Diers J.R., Kirmaier C., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J. S., *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 4607-4618.
- ⁵¹Yuen J.M., Harris M.A., Liu M., Diers J.R., Kirmaier C., Bocian D.F., Lindsey J.S., Holten D., *J. Photochem. Photobiol.*, **2015**, 91, 331-342.
- ⁵²Santos F.A.B., Uchoa A.F., Baptista M.S., Iamamoto Y., Serra O.A., Brocksom T.J., de Oliveira K.T., *Dyes Pigments*, **2013**, 99, 402-411.
- ⁵³Sergeeva N., Shaker Y.M., Finnigan E.M., McCabe T., Senge M.O., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 12454-12464.
- ⁵⁴Oliveira K.T., Momo P.B., Assisa F.F., Ferreira M.A.B., Brocksom T.J., *Current Organic Synthesis*, **2014**, 11, 42-58.
- ⁵⁵Calvete M.J.F., *Revista Virtual de Química*, **2009**, 1, 2, 92-103.
- ⁵⁶Whitlock Jr H.W., Hanauer R., Oester M.Y., Bower B.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 7485-7489.
- ⁵⁷Bonnett R., White R.D., Winfield U.J., Berenbaum M.C., *Biochem.*, **1989**, 1, 261-277.
- ⁵⁸Pereira 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, 1666-1672.
- ⁵⁹Pereira M.M., Arnaut L.G., Formosinho S.J., Monteiro C.J.P., Universidade de Coimbra, French patent n° 0412149, **2004**.
- ⁶⁰Pereira M.M., Arnaut L.G., Formosinho S.J., Monteiro C.J.P., Universidade de Coimbra, PCT/EP/012212, **2005**.
- ⁶¹Bruckner C., Dolphin D., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 3295-3298.
- ⁶²Tome A.C., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 408-414.
- ⁶³de Assis F.F., de Souza J.M., Assis B.H.K., Brocksom, T.J., de Oliveira K.T., *Dyes Pigments*, **2013**, 98, 153-159.
- ⁶⁴Uchoa A.F., de Oliveira K.T., Baptista M.S., Bortoluzzi A.J., Iamamoto Y., Serra O.A., *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 8824-8832.
- ⁶⁵Silva A.M.G, Cavaleiro J.A.S., *Progress Heterocycl. Chem.*, **2008**, 19, 44-69.
- ⁶⁶Gomes A.T.P.C., Leao R.A.C., Alonso C.M.A., Neves M.G.P.M.S., Faustino M.A.F., Tome A.C., Silva A.M.S., Pinheiro S., de Souza M.C.B.V., Ferreira V.F., Cavaleiro J.A.S., *Helv. Chim. Acta*, **2008**, 91, 2270-2283.

- ⁶⁷Lamani M., Ravikumara G.S., K.R. Prabhu, *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, 354, 1437 – 1442.
- ⁶⁸ Kim H.-J., Lindsey J.S., *De novo synthesis of bacteriochlorins*, US8664260 B2, **2012**.
- ⁶⁹Callot H.J., *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 11, 1011-1014.
- ⁷⁰Ostrowski S., Wyrebek P., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 8437-8440.
- ⁷¹Silva A.M.G., Tomé A.C., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., Kappe C.O., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 4723-4726.
- ⁷²Chang C.K., Sotiriou C., Wu W., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1986**, 1213-1215.
- ⁷³Zheng G., Kozyrev A., Dougherty T.J., Smith K.M., Pandey R.K., *Chemistry Lett.*, **1996**, 119-122.
- ⁷⁴Ostrowski S., Wyrebek P., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 8437-8440.
- ⁷⁵Tome A.C., Lacerda P.S.S., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., *Chem Commun*, **1997**, 136, 1199-1200.
- ⁷⁶Morgan A.R., Skalkos D., Garbo G.M., Keck R.W., Selamn S.H., *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2126-2133.
- ⁷⁷Sternberg E.D., Dolphin D., Brucker C., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151–4202.
- ⁷⁸Senge M.O., Kalish W.W., Runge S., *Tetrahedron*, **1998**, 54, 3781-3798.
- ⁷⁹Grahn M. F., McGuinness A., Benzie R., Boyle R., Jode M.L., Dilkes M.G., Abbas B., Williams N. S., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 37, 261-266.
- ⁸⁰Monteiro C.J.P., Pereira M.M., Pinto S.M.A., Simoes A.V.C., Sá G.F.F., Arnaut L.G., Formosinho S.J., Simoes S., Wyatt M.F., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 5132–5138.
- ⁸¹Pereira 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, 9545-9551.
- ⁸²Pereira M.M., Monteiro C.J.P., Simões A.V.C., Pinto S.M.A., Arnaut L.G., Sá G.F.F., Silva E.F.F., Rocha L.B., Simões S., Formosinho S.J., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2009**, 13, 568–573.
- ⁸³Arnaud L.G., Pereira M.M., Formosinho S.J., Simoes S.P.M., Urbanska K., Stochel G., *Process for preparing chlorins and their pharmaceutical uses*, PCT/PT2009/000057, **2009**.
- ⁸⁴Arnaud L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem Eur. J.*, **2014**, 20, 5346-5359.
- ⁸⁵Patrick G.L., *An introduction to medical chemistry.*, 5 ed., Oxford, **2012**, 413-419.
- ⁸⁶Domínguez J.N., León C., Rodrigues J., Domínguez N.G., Gut J., Rosenthal P.J., *Il Farmaco*, **2005**, 60, 307–311.
- ⁸⁷El-Sayed N.S., El-Bendary E.R., El-Ashry S.M., El-Kerdawy M.M., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46, 3714-3720.

- ⁸⁸Macías B., Villa M.V., Lapresa R., Alzuet G., Hernández-Gil J., Sanz F., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2012**, 115, 64–71.
- ⁸⁹Daniel N. N., Korsmeyer S. J., *Cell*, **2004**, 116, 205–219.
- ⁹⁰Lee C.-C., *Synthetic approaches to biologically active sulfonates and sulfonamides*, Chemistry Department, University College London, **2010**.
- ⁹¹Supuran C. T., Casini A., Scozzafava A., *Medicinal Research Review*, **2003**, 23, 5, 535–558.
- ⁹²Santos M.M.M., *Química*, **2011**, 121, 47–51.
- ⁹³Schobert R., Stehle R., Walter H., *Tetrahedron*, **2008**, 64, 9401–9407.
- ⁹⁴Poulsen S., Bornaghi L.F., Healy P.C., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 5429–5433.
- ⁹⁵Scozzafava A., Menabuoni L., Mincione F., Mincione G., Supuran C. T., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2001**, 11, 575–582.
- ⁹⁶Balseven H., Isgor M. M., Mert S., Alm Z., Beydemir S., Ok S., Kasimogullari R., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2013**, 21, 21–27.
- ⁹⁷Smyth J.F., Aamdal S., Awada A., Dittrich C., Caponigro F., Schoffski P., Gore M., Lesimple T., Djurasinovic N., Baron B., Ravic M., Fumoleau P., Punt C. J. A., *Annals of Oncology*, **2005**, 16, 158–161.
- ⁹⁸Abbate F., Casini A., Owa T., Scozzafava A., Supuran C. T., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, 14, 217–223.
- ⁹⁹García-Giménez J.L., Hernández-Gil J., Martínez-Ruiz A., Castiñeiras A., Liu-González M., Pallardó F.V., Borrás J., Piña G.A., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2013**, 121, 167–178.
- ¹⁰⁰Edilberto Antonio Souza de Oliveira, Insulina e fármacos hipoglicemiantes orais. **2008**, 6
- ¹⁰¹Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K., *Farmacologia*. 5 ed.; Elsevier, 724–725.
- ¹⁰²Greenfield A., Grosanu C., *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 6300–6303.
- ¹⁰³Mustafa G., Khan I. U., Ashraf M., Afzal I., Shahzad S. A., Shafiq M., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, 20, 2535–2539.
- ¹⁰⁴Ho D. K. H., Chan L., Hooper A., Brennan P. E., *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 820–823.
- ¹⁰⁵Pandya R., Murashima T., Tedeschi L., Barrett A.G.M., *J. Org. Chem*, **2003**, 68, 8274–8276.
- ¹⁰⁶Chantarasriwong O., Jang D. O., Chavasiri W., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 7489–7492.
- ¹⁰⁷Shaabani A., Soleimani E., Rezayan A. H., *Tetrahedron Letters*, **2007**, 48, 2185–2188.
- ¹⁰⁸Bahrami K., Khodaei M. M., Soheilzad M., *Tetrahedron*, **2009**, 74, 9287–9291.
- ¹⁰⁹Bonk J.D., Amos D. T., Olson S. J., *Synthetic Communications*, **2007**, 37, 2039–2050.
- ¹¹⁰Wright S.W., Hallstrom K.N., *J. Org. Chem*, **2006**, 71, 1080–1084.
- ¹¹¹Bahrami K., Khodaei M. M., Abbasi J., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 5095–5101.
- ¹¹²Buck J.R., Saleh S., Uddin Md. I., Manning H. C., *Tetrahedron Letters*, **2012**, 53, 4161–4165.

- ¹¹³Jain A.K, Singla R.K., *Int. J.PharmTech Res*, **2010**, 2, 1, 827-833.
- ¹¹⁴Greenfield A., Grosanu C., *Tetrahedron Letters*, **2008**, 49, 6300–6303.
- ¹¹⁵Prado A. G. S., *Quim. Nova*, **2003**, 26, 5, 738-744.
- ¹¹⁶Woods C.R., Hack M.D., Allison B.D., Phuong V.K, Rosen M.D., Morton M.F., Prendergast C.E., Barrett T.D., Shankley N.P, Rabinowitz M.H., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17, 6905–6909.
- ¹¹⁷Ho D.K.H., Chan L., Hooper A., Brennan P.E., *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 820–823.
- ¹¹⁸Macdonald I.J., Dougherty T.J., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105–129.
- ¹¹⁹Hatz S., Lambert J.D.C., Ogilby P.R., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 1106-1116.
- ¹²⁰Mroz P., Hamblin M.R., *Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical*. Norwood, MA: Artech House, **2008**.
- ¹²¹Cieplik F., Tabenski L., Buchalla W., Maisch T., *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 2014, 5, 1-17.
- ¹²²Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J.H., Sibata C.H., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 27-42.
- ¹²³Dai T., Huang Y.-Y., Hamblin M.R., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2009**, 6, 170-188.
- ¹²⁴Kharkwal G.B., Sharma S.K., Huang Y.-Y., Dai T., Hamblin M.R., *Lasers in Surgery and medicine*, **2011**, 43, 755–767.
- ¹²⁵Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G., *Lasers in Surgery and Medicine*, **2006**, 38, 468–481.
- ¹²⁶Pereira M.A., Faustino M.A.F., Tomé J.P.C., Neves M.G.P.M.S., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., Cunha Â., Almeida A., *J. Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, 13, 680-690.
- ¹²⁷Demidova T.N., Hamblin M.R., *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **2004**, 17, 3, 245–254.
- ¹²⁸Merchat M., Spikes J.D., Bertoloni G., Jori G., *J. Photochem. Photobiol.*, **1996**, 35, 149-157.
- ¹²⁹Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J. H., Brown S.B., *J. Photochem. Photobiol.*, **1996**, 32, 159-164.
- ¹³⁰Ergaieg K., Chevanne M., Cillard J., Seux R., *Solar Energy*, **2008**, 82, 1107-1117.
- ¹³¹Nitzan Y., Gutterman M., Malik Z., Ehrenberg B., *J. Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 89–96.
- ¹³² de Melo W.CMA, Avci P., de Oliveira M.N., Gupta A., Vecchio D., Sadasivam M., Chandran R., Huang Y.-Y., Yin R., Perussi L.R, Tegos G.P., Perussi J.R., Dai T., Hamblin M.R., *Expert Rev. Anti Infect. T*, **2013**, 11, 669-693.
- ¹³³Tada-Oikawa S., Oikawa S., Hirayama J., Hirakawa K., Kawanishi S., *J. Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1391–1399.

- ¹³⁴Yaku H., Murashima T., Tateishi-Karimata H., Nakano S.-i., Miyoshi D., Sugimoto N., *Methods*, **2013**, 64, 19–27.
- ¹³⁵Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., Neves M. G. P. M. S., Tomé J. P.C., Tomé A. C., Cavaleiro J.A.S., Cunha Â., Gomes N.C.M., Alves E., Almeida A., *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 91-105.
- ¹³⁶Alves E., Costa L., Carvalho C., Tome J.P.C., Faustino M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Tome A.C., Cavaleiro J.A.S., Cunha A., Almeida A., *BMC Microbiol.*, **2009**, 9, 1-13.
- ¹³⁷Trannoy L.L., Terpstra F.G., Korte D., Lagerberg J.W.M., Verhoeven A.J., Brand A., van Engelenburg F.A.C., *Vox Sang.*, **2006**, 91, 111-118.
- ¹³⁸Cormick M.P., Alvarez M.G., Rovera M., Durantini E.N., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 1592-1599.
- ¹³⁹Yu K.G., Li D.H., Zhou C.H., Dia J.L., *Chinese Chem. Lett.*, **2009**, 20, 411-414.
- ¹⁴⁰Oliveira A., Almeida A., Carvalho C.M., Tome J.P., Faustino M.A., Neves M.G., Tome A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., *J. Appl. Microbiol.*, **2009**, 106, 1986-1995.
- ¹⁴¹Maisch T., Bosl C., Szeimies R.M., Lehnand N., Abels C., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 1542-1552.
- ¹⁴²Gomes M.C., Woranovicz-Barreira S.M., Faustino M.A.F., Fernandes R., Neves M.G.P.M.S., Tome A.C., Gomes N.C.M., Almeida A., Cavaleiro J.A.S., Cunha A., Tome J.P.C., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 10, 1735-1743.
- ¹⁴³Alves E., Faustino M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Cunha A., Nadais H., Almeida A., *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **2015**, 22, 34–57.
- ¹⁴⁴Mendes S., Camacho F., Silva T., Calado C.R.C., Serra A.C., Rocha Gonsalves A.M.d'A., Roxo-Rosa M., *J. Photochem. Photobiol.*, **2011**, 87, 1395–1404.
- ¹⁴⁵Simoes A.V.C., Adamowicz A., Dabrowski J.M., Calvete M.J.F., Abreu A.R., G. Stochel, Arnaut L.G., Pereira M.M., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 8767-8772.
- ¹⁴⁶Ressurreição A.S.M., Pineiro M., Arnaut L.G., Rocha Gonsalves A.M.d'A., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, 11, 50-57.
- ¹⁴⁷Seixas de Melo J., Sobral A.J.F.N., Rocha Gonsalves A.M.d'A., Burrows H.D., *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **2005**, 172, 151–160.
- ¹⁴⁸Banfi S., Cassani E., Caruso E., Cazzaro M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 3595–3605.
- ¹⁴⁹Sobral A.J.F.N., Eléouet S., Rousset N., Rocha- Gonsalves A.M.d'A., Le Meur O., Bourré L., Patrice T., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2002**, 6, 456-462.
- ¹⁵⁰Manono J., Marzilli P.A., Fronczek F.R., Marzilli L.G., *Inorganic Chemistry*, **2009**, 48, 5626-5635.
- ¹⁵¹Bhaumik J., Weissleder R., McCarthy J.R., *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5894–5901.

-
- ¹⁵²Malik Z., Nitzan Y., *Synergistic antibiotic compositions containing a porphyrin and an antibiotic*, WO/1995/033463, **1995**.
- ¹⁵³Di Poto A., Sbarra M.S., Provenza G., Visai L., Speziale P., *Biomaterials*, **2009**, 30, 3158-3166.
- ¹⁵⁴Xing B., Jiang T., Bi W., Yang Y., Li L., Ma M., Chang C.-K., Xu B., Yeow E.K.L. *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1601–1603.
- ¹⁵⁵Hagmann W. K., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 15, 4359-4369.
- ¹⁵⁶Purser S., Moore P. R., Swallow S., Gouverneur V., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 320-330.
- ¹⁵⁷Thayer AM., *Chem. Eng. News*, **2006**, 84, 23, 15–24.
- ¹⁵⁸Smart B. E., *J. Fluorine Chem.*, **2001**, 109, 3-11.
- ¹⁵⁹O'Hagan D., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 2, 308–319.
- ¹⁶⁰Swallow S., *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier, **2015**, 54, 65-133.
- ¹⁶¹Goslinski T., Piskorz J., *J. Photochem. Photobiol.*, **2011**, 12, 304-321.
- ¹⁶²Dolmans D., Fukumura E.D., Jain R.K., *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 380-387.

Capítulo 2

Síntese e caracterização de sulfonamidas derivadas da pentafluorofenilporfirina por ligação covalente

Nas sociedades modernas assiste-se a um aumento crescente do número de bactérias e vírus com resistência aos fármacos atualmente disponibilizados pela Indústria Farmacêutica¹. Por este facto é de extrema relevância desenvolver métodos de síntese de novas moléculas com potencial atividade antibacteriana. De entre as múltiplas famílias de compostos com estas propriedades salientam-se novas sulfonamidas devido à sua fácil modulação estrutural e demonstrada atividade antibacteriana.^{2,3} Por outro lado, as porfirinas e seus derivados reduzidos, têm sido muito utilizadas como fotossensibilizadores em fotomedicina^{4,5} e mais recentemente na inativação de vírus e bactérias, sem indução de resistência aos microorganismos.^{6,7}

Neste capítulo descrevem-se novas metodologias de síntese de moléculas bimodais que incorporam na sua estrutura sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com o objetivo de obter compostos com propriedades inovadoras que possam simultaneamente atuar como antibacterianos e como fotossensibilizadores para inativação de bactérias, recorrendo à terapia fotodinâmica (PDT). De forma a averiguar a potencial aplicação referida, procedeu-se à caracterização fotofísica dos compostos sintetizados, onde foram avaliados atributos fundamentais a um bom fotossensibilizador, tais como o rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico de oxigénio singuleto e rendimento quântico de formação de estado tripleto. Por último, mas não menos importante, foram realizados estudos preliminares de permeabilidade celular e ensaios citotxicológicos no escuro.

2.1 Síntese dos precursores

Sulfonamidas

O trabalho apresentado neste capítulo iniciou-se com a síntese de sulfonamidas, com o intuito de preparar “sintões”, para posterior utilização como unidade de construção (building block) na derivatização de porfirinas fluoradas. Segundo a literatura, tal como descrito anteriormente (capítulo 1), existem diversos métodos de síntese desta classe de compostos, no entanto, o método mais comum consiste no acoplamento de uma amina primária ou secundária com um cloreto de

sulfonilo.^{8,9} Deste modo, delineou-se uma estratégia sintética baseada no esquema de retrosíntese apresentado na figura 2.1.

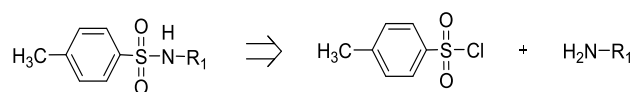
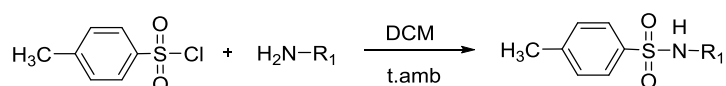


Figura 2.1- Esquema da estratégia de retrosíntese aplicada no estudo

Sendo do nosso conhecimento que vários estudos têm demonstrado a importância de um próton ácido livre no grupo sulfonamida para a ligação à enzima alvo (dihidroperoxo sintetase)^{10,11}, decidiu-se sintetizar duas sulfonamidas com estruturas semelhantes, diferindo somente na presença ou ausência de um átomo de hidrogénio diretamente ligado ao átomo de azoto da sulfonamida, para em trabalhos futuros poder dar continuidade a este estudo e comparar a sua atividade inibidora do crescimento de bactérias de forma a validar as hipóteses formuladas.

Tendo por base a estratégia sintética referida (figura 2.1), iniciou-se a síntese de sulfonamidas adicionando-se 1.2 equivalentes da amina pretendida, a uma solução de cloreto de *para*-tolueno sulfonilo em diclorometano (DCM) (tabela 2.1). A mistura permaneceu à temperatura ambiente sob agitação (4 a 5 horas), até se verificar por cromatografia de camada fina (TLC, do inglês thin layer chromatography) o consumo total do material de partida. Verificou-se que a *p*-toluenosulfonamida, **2.1**, e a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida, **2.2**, precipitam no meio reacional pelo que se procedeu à sua filtração e posterior dissolução em diclorometano de modo a realizar a extração por solventes sequencial com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água. Obteve-se um rendimento de 48 % e 94 %, respetivamente (tabela 2.1).

Tabela 2.1- Método de síntese de sulfonamidas e respetivos rendimentos obtidos



Entrada	Sulfonamida	Substituinte (R)	Rendimento	Rendimento literatura
1	<i>p</i> -toluenosulfonamida	2.1 R= H	48%	97% ¹²
2	<i>N</i> -metil- <i>p</i> -toluenosulfonamida	2.2 R=CH ₃	94 %	92 % ¹³

O rendimento obtido para a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida foi semelhante ao descrito na literatura¹³ (94 %, entrada 2 tabela 2.1). Relativamente à *p*-toluenosulfonamida (tabela 2.1, entrada 1) obteve-se um rendimento inferior possivelmente devido à sua fácil protonação que facilitou a sua transferência para a fase aquosa durante a extração com consequente perda de produto. Procedeu-

se ainda à extração da fase aquosa com acetato de etilo, no entanto, uma quantidade apreciável continuou a permanecer nesta e por isso, o rendimento isolado inferior ao descrito na literatura.¹² Por questões temporais não foi possível proceder a uma completa otimização.

Ambas as sulfonamidas foram caracterizadas estruturalmente por espectrometria de massa e por ressonância magnética nuclear de protão e de carbono e os dados encontram-se descritos na secção experimental, capítulo 4.

Porfirinas

Tal como discutido no capítulo 1, tanto a classe das porfirinas como as sulfonamidas podem apresentar ação antibacteriana^{2,3,6} Devido a esta potencial aplicação partilhada entre as duas classes de compostos e ao nosso interesse no desenvolvimento de novos macrociclos tetrapirrólicos com possível atividade biológica decidiu-se sintetizar uma porfirina base que posteriormente possa ser conjugada com as sulfonamidas previamente sintetizadas.

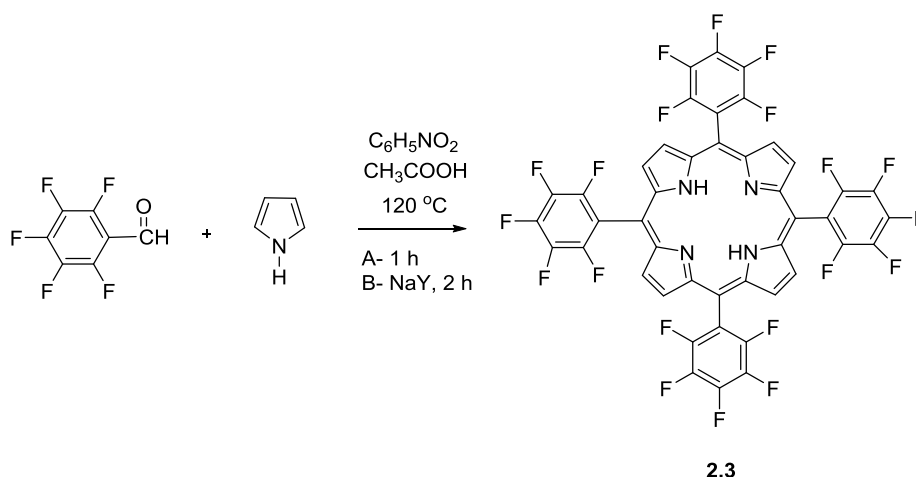
Selecionou-se a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP) (**2.3**) por constituir um excelente modelo para obtenção de novos derivados porfirínicos, uma vez que possui um flúor mais ativado para substituição nucleofílica na posição *para* do grupo fenilo. Esta reação de substituição nucleofílica aromática foi descoberta ocasionalmente por Kadish e os seus colaboradores¹⁴ em 1990, permitindo a síntese de porfirinas com grupos dadores de eletrões na posição *para*. Posteriormente, já foi testada numa vasta gama de nucleófilos, como aminas, tióis, álcoois, heterociclos de azoto, etc.¹⁵ Contudo, não se encontra descrito a utilização de sulfonamidas como nucleófilo, tornando inovador o trabalho desenvolvido e descrito nesta dissertação.

Adicionalmente, trabalhos anteriores do grupo nos quais se estudaram porfirinas difluoradas, mostraram que os átomos de flúor aumentam a sua fotoestabilidade.^{4,5} Desta forma, a nossa hipótese de trabalho pressupõe que porfirinas perfluoradas poderão contribuir para aumentar ainda mais esta estabilidade, sobretudo se a partir delas se evoluir para os seus derivados reduzidos. Concomitantemente sabe-se que os átomos de flúor contribuem para o aumento do cruzamento intersistemas via efeito do átomo pesado e portanto podem também contribuir para diminuir o rendimento quântico de fluorescência e aumentar o rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto.¹⁶ Desta forma é reforçada a seleção da TPFPP como porfirina base.

A 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (**2.3**) foi sintetizada de acordo com o método do nitrobenzeno¹⁷ e sua otimização recente recorrendo à presença de NaY.¹⁸ No que diz respeito ao método clássico do nitrobenzeno, colocou-se uma solução de pentafluorobenzaldeído em ácido acético/nitrobenzeno (2:1) a 120 °C. Posteriormente foi adicionada, gota a gota, uma quantidade equimolar de pirrol e a mistura permaneceu em refluxo durante uma hora. Após

arrefecimento, procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de extração com diclorometano e água. O processo de purificação foi bastante laborioso, devido à presença de diversos produtos secundários da reação e de nitrobenzeno. Este consistiu em três colunas de sílica gel, seguidas de sucessivas precipitações e uma recristalização final. Devido a este trabalho de purificação o rendimento obtido foi de apenas 4.9 % (tabela 2.2, entrada 1).

Tabela 2.2- Métodos de síntese da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina e respetivos rendimentos



Entrada	Método de Síntese	Rendimento (%)
1	Método do nitrobenzeno	4.9
2	Método do NaY	9.2

Atendendo ao baixo rendimento os estudos prosseguiram com a síntese da mesma porfirina mas usando o zeólito NaY como ácido de Lewis para ativar o grupo carbonilo do aldeído.¹⁸ Como já referi esta metodologia difere do protocolo anterior apenas na adição inicial de um zeólito alumino-silicato denominado NaY e no tempo de reação, que é prolongado para duas horas. As etapas de purificação necessárias foram semelhantes o que nos permite obter uma comparação mais fiável. O rendimento obtido foi de 9.2 %. Corroborando os dados da literatura, observamos uma duplicação do rendimento aquando da adição do catalisador sólido.

Para além da posição *meso*, as porfirinas podem ser modeladas perifericamente nas posições β -pirrólicas. Sabe-se que quando a posição β do macrociclo contém um substituinte com conjugação, poderá existir um aumento de conjugação do macrociclo refletido num alargamento das bandas Q ou uma deslocalização dos eletrões π do macrociclo, podendo provocar um desvio do espectro de absorção para o vermelho ou infravermelho próximo.¹⁹ Motivados por este

conhecimento, decidimos também explorar a síntese de novas porfirinas funcionalizadas nas posições β -pirrólicas, mantendo, no entanto, o raciocínio utilizado anteriormente, com o intuito de avaliar a influência da presença de um grupo sulfonamida nesta posição do macrociclo tetrapirrólico. Deste modo, a estratégia consistiu na inserção de um bom grupo abandonante na posição β do macrociclo (NO_2), que possa subsequentemente ser substituído pela sulfonamida pretendida. Procedeu-se à otimização desta metodologia usando como modelo a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP).

Esta porfirina base foi gentilmente cedida pela empresa Luzitin, S.A. Assim, começámos por mono funcionalizar a TPP com nitrato de cobre na presença de anidrido acético e ácido acético, segundo metodologias descritas na literatura^{19,20,21,22} obtendo-se a $\text{Cu(II)-}\beta\text{NO}_2\text{TPP}$ com um rendimento de 79 %, que está de acordo com o descrito na literatura.¹⁹

Uma vez que a reação protótipo correu como esperado, decidiu-se expandir a estratégia para a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina. Usando as condições descritas anteriormente apenas se observou a metalção da porfirina, deste modo, a temperatura foi aumentada para 60 °C. Após 27 horas, deixou de se observar por cromatografia de camada fina (TLC) qualquer evolução da reação pelo que se procedeu ao seu término. Obteve-se a $\text{Cu(II) - }\beta\text{NO}_2\text{TPFPP}$ com um rendimento isolado de 30.8 %. A porfirina metalada intermediária foi o produto secundário obtido em maior quantidade, sendo o seu rendimento de 41.8%. O Flúor comumente utilizado como bioisótero do Hidrogénio, tem um tamanho similar a este, no entanto, apresenta uma maior eletronegatividade.²³ Com base neste conhecimento, podemos constatar que a transposição desta reação para a TPFPP não é afetada por impedimentos estéreos mas sim pela eletronegatividade referente aos grupos flúor presentes que desativam o macrociclo para a ocorrência de reações de substituição electrofílica.

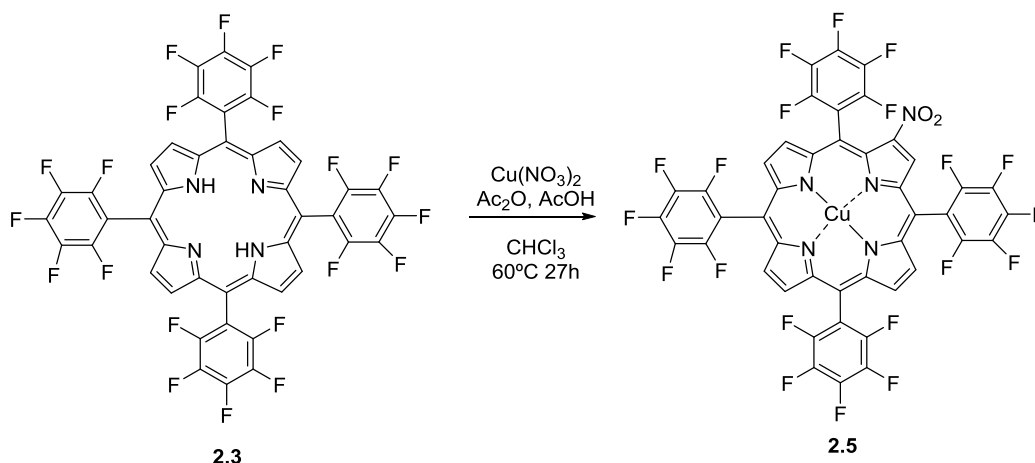


Figura 2.2- Esquema geral de síntese 2-nitro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinato de cobre (II)

As três porfirinas foram caracterizadas estruturalmente por espectroscopia de massa. Adicionalmente a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina foi caracterizada por ressonância

magnética nuclear de próton e de flúor. Os dados encontram-se descritos na secção experimental, capítulo 4 e estão de acordo com a literatura.^{24,25}

2.2- Síntese de sulfonamidas derivadas da pentafluorofenilporfirina por ligação covalente

Os estudos prosseguiram com a otimização da ligação da sulfonamida à 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina, recorrendo a uma sulfonamida comercial, a metanosulfonamida, como modelo. Tendo conhecimento prévio da relevância da concentração no rendimento de reações de substituição nucleofílica, realizou-se uma pesquisa da gama de concentrações utilizadas na preparação de derivados da TPFPP com diferentes nucleófilos e os dados considerados relevantes apresentam-se na tabela 2.3.

Tabela 2.3- Exemplos selecionados de reações de substituição nucleofílica aromática na TPFPP

Entrada	Nucleófilo	Porf/Nucl	Solvente	[C]	Produto(s) maioritário(s)	η (%)	Ref
1	2- aminoetanol	1/2.9	Dioxano	1.3×10^{-2}	Tetrassubstituído	81%	26
2	N- α -acetil-L-lisina metil éster	1/10	NMP	5.10×10^{-2}	Tetrassubstituído	70%	27
3	6- mercaptopurina ribósido	1/32	DMF	3.00×10^{-3}	Tetrassubstituído	38%	28
4	Propano-1,3-diamino monoprotégido	1/4.4	Dioxano	4.28×10^{-2}	Trissubstituído Tetrassubstituído	31% 30%	29
5	Aminoalquil	2/1	Tolueno	8.0×10^{-3}	Monossubstituído	63- 83%	30
6	fosforamidatos	1/10	Tolueno	8.0×10^{-3}	Tetrassubstituído	50- 77%	30

Pela análise destes resultados da literatura, apresentados na tabela 2.3, verificámos que nas reações em que se obtém o composto tetrassubstituído com um rendimento mais elevado a concentração de porfirina é da ordem de 10^{-2} M (tabela 2.3, entrada 1 e 2) variando o excesso de sulfonamida de exemplo para exemplo. Desta pesquisa salientamos o trabalho de Pedrosa³⁰ onde para obter a porfirina monossubstituída utilizou uma relação porfirina/nucleófilo de 2/1 (tabela 2.3 entrada 5). É de salientar, que a nucleofilicidade do reagente utilizado é um dos fatores preponderantes nos resultados obtidos. As sulfonamidas são nucleófilos mais fracos do que os encontrados na literatura, devido à sua possibilidade de conjugação intrínseca (figura 2.3), podendo o substituinte (R_1) presente reforçar ou atenuar este efeito.

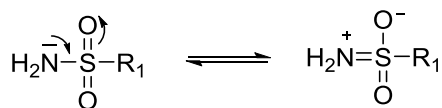


Figura 2.3 - Possibilidade de conjugação inerente ao grupo sulfonamida

Sendo o objetivo fulcral deste trabalho otimizar condições reacionais para obter preferencialmente as sulfonamido-porfirinas mono e tetrassubstituída, os estudos de substituição nucleofílica foram iniciados com uma concentração de $5.1 \times 10^{-3} \text{M}$, similar à usada por Pedrosa²⁴ para obter seletividade para o composto monossubstituído (entrada 5, tabela 2.3), mas tendo em conta a menor nucleofilicidade da sulfonamida utilizou-se uma relação porfirina:sulfonamida de 1:6.

Assim, numa experiência tipo, a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (**2.3**) (concentração de $5.1 \times 10^{-3} \text{M}$), e 6 equivalentes de metanosulfonamida (**2.2**) foram dissolvidos em dioxano sendo posteriormente adicionado carbonato de céσιο como base. De seguida, a mistura foi aquecida até 100°C . Apesar de na cromatografia de camada fina ainda se observar algum reagente de partida, após 72 horas, decidimos terminar o processo, uma vez que, já não se observava nenhuma evolução conducente ao aumento da formação do produto. Após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente o crude foi purificado por extração por solventes seguido de secagem e cromatografia utilizando como eluente *n*-hexano/acetato de etilo (2:1) e gel de sílica como fase estacionária. Foi recolhida uma primeira fração identificada como a porfirina de partida (TPFPP) e uma segunda fração maioritária identificada por RMN como sendo essencialmente a porfirina monossubstituída (**2.6**). No entanto considerámos que a pureza não era ainda satisfatória para os estudos fotofísicos que pretendíamos prosseguir pelo que se efetuou uma purificação adicional por cromatografia de adsorção em placa, usando um eluente de polaridade crescente baseado na mistura *n*-hexano/acetato de etilo (10:1 até 2:1). Após esta purificação adicional obteve-se a 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina com um rendimento de 18.5%.

Posteriormente, com o intuito de obter o composto tetrassubstituído, efetuaram-se estudos para avaliar o efeito da concentração de porfirina inicial, do excesso de sulfonamida e da quantidade de base. Variando a concentração de porfirina de $5.1 \times 10^{-3} \text{M}$ para $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ a quantidade de sulfonamida de 6 para 18 equivalentes e o carbonato de céσιο de 6 para 12 equivalentes, observou-se por TLC, após 48 horas, o total consumo da porfirina de partida com concomitante formação de uma mistura complexa de produtos (tabela 2.4, entrada 2). Decidiu-se elevar a concentração de porfirina para $1.5 \times 10^{-2} \text{M}$, mantendo a mesma relação porfirina/ sulfonamida/base. Após 48 horas observou-se, também por TLC, o consumo total do material de partida e a formação de um produto insolúvel no meio reacional. Após purificação, descrita em seguida, obteve-se o composto

5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina, **2.14**, com um rendimento de 70%. Concomitantemente, com o intuito de diminuir mais o tempo reacional, procedeu-se ainda a uma tentativa de otimização desta reação, realizando-a na total ausência de solvente. Sendo o ponto de fusão da metanosulfonamida de 85-89 °C, pensámos que ao realizar a reação a 100 °C tal como anteriormente, conseguiríamos que a sulfonamida funcionasse como solvente e como nucleófilo. Verificou-se que tal era possível mas que ao fim de 24 horas tínhamos apenas um rendimento de 56%, inferior ao obtido na presença de solvente.

Tabela 2.4- Estudo da influência da concentração e da relação porfirina / sulfonamida no rendimento e seletividade da reação

Entrada	Concentração	Sulfonamida	Base	Produto maioritário	η (%)
1	5.1×10^{-3} M	6 equivalentes	6 equivalentes	Monossubstituída	18.47 ^a
2	1.0×10^{-2} M	18 equivalentes	12 equivalentes	Mistura	---- ^b
3	1.5×10^{-2} M	18 equivalentes	12 equivalentes	Tetrassubstituída	70 ^b
4	Sem solvente	616 equivalentes	12 equivalentes	Tetrassubstituída	56 ^c

a) 72 horas de reação; b) 48 horas c) 24 horas

No caso da reação utilizando o dioxano como solvente, este foi retirado por decantação e por TLC observou-se neste, a presença de quantidade vestigial da porfirina de partida, **2.3**, e dos produtos secundários correspondentes às porfirinas mono- di- e trissubstituídas. A análise por TLC de uma amostra do sólido obtido dissolvido em metanol, usando acetato de etilo como eluente, revelou apenas a existência de uma única mancha no ponto de aplicação. A purificação final do produto revelou alguma dificuldade devido à elevada solubilidade em meios aquosos tanto da presumível porfirina tetrassubstituída como do excesso de sulfonamida utilizada uma vez que não foi possível efetuar a cromatografia de adsorção em coluna ou em placas, como anteriormente. Perante esta dificuldade experimental tentou-se proceder à purificação por cromatografia de exclusão usando uma coluna de Sephadex G-10 (limite de exclusão molecular de 700 g/mol) e água como eluente. Surpreendentemente a porfina ficou retida nos poros e não foi possível recuperá-la. Da nossa observação experimental verificou-se que este composto era insolúvel em dioxano e que contrariamente a metanosulfonamida era parcialmente solúvel pelo que se procedeu a vários ciclos de lavagem com dioxano recorrendo a ultra-sons para aumentar a dissolução desta. No entanto, o dioxano é um solvente de custo elevado, pelo que era prioritário encontrar outra forma de purificar. Assim, verificou-se que o composto tetrassubstituído também era insolúvel em acetona, pelo que se substituiu o dioxano por esta. Contudo, este processo não permitiu concluir a completa purificação do composto pelo que decidimos recorrer à purificação adicional por filtração por tamanho

utilizando um dispositivo Amicon equipado com uma membrana de 1KDa (retém compostos com peso molecular superior a 1000 Daltons). A mistura de compostos dissolvida em água foi colocada no aparelho e o produto pretendido (1275 g/mol) foi retido pela membrana enquanto que a sulfonamida livre, de menor peso molecular (95.12 g/mol), foi eliminada juntamente com o solvente. Esta purificação adicional permitiu obter a 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoi]fenil]porfirina (**2.14**) com um rendimento de 70 %. No caso da reação sem solvente a decantação não foi necessária sendo os restantes passos de purificação similares aos anteriormente descritos.

Todavia, o fator primordial limitante do nosso trabalho não é o tempo mas sim o custo da síntese. Deste modo, procedeu-se à comparação de custos entre o método convencional e o método sem solvente. Tal como se observa na tabela 2.5, a reação sem solvente tem um custo cerca de seis vezes superior.

Tabela 2.5- Análise dos custos dos dois métodos aplicados (convencional e sem solvente)

Entrada	Método	Reagente	Preço stock	Solvente	Custo
1	Convencional	Dioxano	95.90 €/ L	2 mL	0.19 €
2	Sem solvente	Metanosulfonamida	4.710 €/g	247.4 mg	1.17 €

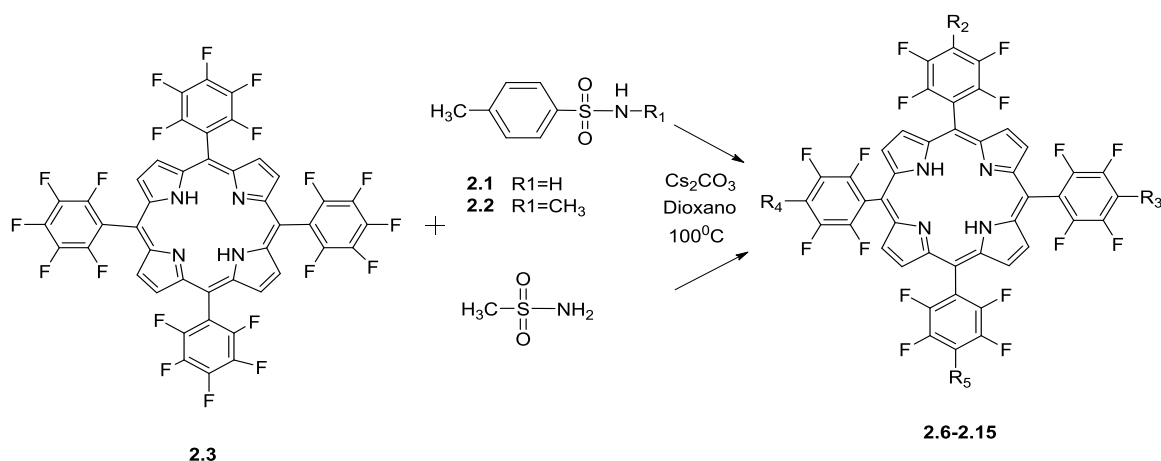
No entanto, não podemos descurar o impacto ambiental causado por estas. Desta forma procedeu-se ao cálculo da diferença entre o Factor E³¹ das duas metodologias. Considerando idênticas todas as etapas de purificação obteve-se uma diferença de 63.5 unidades, apresentando a síntese sem solvente, consideravelmente, um menor impacto ambiental. Consequentemente a metodologia sem solvente revelou diminuir a duração da reação de 2 dias para apenas 1, além de apresentar um menor impacto ambiental. Contudo o rendimento de síntese é menor e o custo cerca de seis vezes superior. Deste modo, temos um equilíbrio entre as vantagens e as desvantagens que pode tender para cada um dos lados, consoante as prioridades definidas no momento da síntese.

Em suma, através da modelação da concentração e da relação porfirina/sulfonamida conseguimos desenvolver uma metodologia para obter seletivamente o composto mono e tetrassubstituído independentemente. Resumidamente, pode obter-se o composto monossubstituído como produto maioritário realizando a reação com uma concentração de 5.1×10^{-3} M e um excesso de sulfonamida de 6 equivalentes (Método A) e o produto tetrassubstituído utilizando um excesso de 18 equivalentes e a concentração de 1.54×10^{-2} M (Método B).

Com o intuito de avaliar o efeito da estrutura da sulfonamida na reatividade, utilizando as condições previamente descritas alargaram-se os estudos para a síntese de porfinas monossubstituídas contendo as sulfonamidas previamente sintetizadas: *p*-toluenosulfonamida (**2.1**) e

N-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**). Os rendimentos da reação após isolamento apresentam-se na tabela 2.6. Da análise destes resultados, constatamos que os rendimentos de formação das porfirinas **2.7-2.13** variaram entre 0-6-4.5% (entradas 3-5 e 7-8, tabela 2.6), sendo consideravelmente inferiores ao obtido com a metanosulfonamida (18.5 %, entrada 1, tabela 2.6).

Tabela 2.6- Rendimentos dos produtos isolados da reação da TPFPP com as sulfonamidas 2.1, 2.2 e com a metanosulfonamida



Entrada	Porf.	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	η(%)
1	2.6	NHSO ₂ Me	F	F	F	18.47 ^A
2	2.14	NHSO ₂ Me	NHSO ₂ Me	NHSO ₂ Me	NHSO ₂ Me	70 ^B
3	2.7	NHSO ₂ PhMe	F	F	F	4.53 ^A
4	2.8/2.9	NHSO ₂ PhMe	NHSO ₂ PhMe	F	F	0.69 ^A
5	2.10	NMeSO ₂ PhMe	F	F	F	3.11 ^A
6	2.11/2.12	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	F	F	1.45 ^A
7	2.13	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	F	0.64 ^A
8	2.15	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	NMeSO ₂ PhMe	20 ^B

A- Método A (5.1x10⁻³ M, excesso de 6 equivalentes sulfonamida)

B- Método B (1.54x10⁻² M, excesso de 18 equivalentes de sulfonamida)

Estes baixos rendimentos podem ser atribuídos à presença do grupo tolilo, que contribui para a diminuição da nucleofilicidade da sulfonamida, devido à sua capacidade de ser atrator de elétrons por conjugação, reforçando deste modo, a conjugação inerente ao grupo sulfonamida, tal como explicitado anteriormente. Contraditoriamente, observamos que com a metanosulfonamida, nestas condições, obtemos apenas o composto monossustituído e com a *p*-toluenosulfonamida

(**2.1**) e a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**), sulfonamidas menos nucleofílicas, obtemos os compostos mono e dissustituídos em ambos os casos e adicionalmente o composto trissustituído, no último caso. Este facto pode interpretar-se com base numa maior ativação do macrocilo para a ocorrência de posteriores substituições nucleofílicas na posição *para* dos outros grupos pentafluorofenilo, depois de ter ocorrido a primeira substituição com um grupo atrator de eletrões.

Nos compostos dissustituídos não se procedeu à separação dos isómeros, resultantes da segunda substituição ocorrer no anel adjacente ou aposto, pelo que apresentamos sempre os estudos referentes à mistura dos dois compostos.

De seguida, aplicou-se o método B (excesso de 18 equivalentes de sulfonamida e concentração de 1.54×10^{-2} M), com vista à obtenção do produto tetrassustituído, utilizando a título de exemplo, a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**). Obteve-se a 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil]fenil]porfirina (**2.15**) com um rendimento de 20% (entrada 6, tabela 2.6). Tal como esperado, tendo em conta os resultados previamente apresentados, este é inferior ao obtido com a metanosulfonamida (70%, entrada 2, tabela 2.6). A purificação do composto tetrassustituído **2.15** foi consideravelmente mais simples do que a anteriormente descrita, uma vez que, devido à estrutura da sulfonamida este não apresenta solubilidade em meios aquosos podendo, deste modo, ser purificado por cromatografia tal como os derivados mono, di e trissustituídos.

No que diz respeito à segunda metodologia de funcionalização, nas posições β -pirrólicas, seguimos exatamente o mesmo raciocínio, começando por otimizar esta com a metanosulfonamida. Deste modo, usando como modelo a 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II) (**2.4**) sintetizada anteriormente, empregamos as condições de concentração otimizadas para a mono-substituição (5.1×10^{-3} M), utilizando, porém, apenas um excesso de 3 equivalentes de sulfonamida. Após 48 horas a 100°C, verificou-se a presença de material de partida em grande quantidade, pelo que se adicionaram mais 2 equivalentes de metanosulfonamida ao meio reacional, e a reação permaneceu à mesma temperatura (100°C) por mais 24 horas. Após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, realizou-se a extração da mistura, usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa, sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado a pressão reduzida. O resíduo foi retomado em diclorometano e procedeu-se à sua purificação por cromatografia de adsorção em coluna utilizando como eluente *n*-hexano/diclorometano (2:1) e sílica como fase estacionária. Foi recolhida uma primeira fração identificada como a porfirina de partida metalada com cobre (Cu(II)TPP) e uma segunda fração correspondente ao produto

pretendido. Deste modo, obtivemos a 2-*N*-metanosulfamoil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II) (**2.16**) com um rendimento de 14.56%.

Dado que os resultados obtidos foram positivos, prosseguimos com a aplicação desta estratégia na 2-nitro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinato de cobre (II) (**2.5**) utilizando condições semelhantes. Inevitavelmente, esta metodologia revelou-se ineficaz, uma vez que, obtemos uma mistura de produtos, não sendo possível atingir seletividade para a substituição do grupo NO₂ em detrimento do flúor. Consequentemente, daqui em diante esta dissertação vai centrar-se apenas nos compostos obtidos com recurso à primeira metodologia descrita, ou seja, funcionalizados nas posições *meso* do macrociclo tetrapirrólico.

2.2.1- Caracterização química

Todas as porfirinas anteriormente apresentadas foram caracterizadas por RMN de protão e de flúor. De modo a facilitar a interpretação da análise efetuada aos espectros de RMN ¹H, encontra-se na figura 2.4 uma esquematização da nomenclatura utilizada para definir os diferentes tipos de protões presentes nas porfirinas.

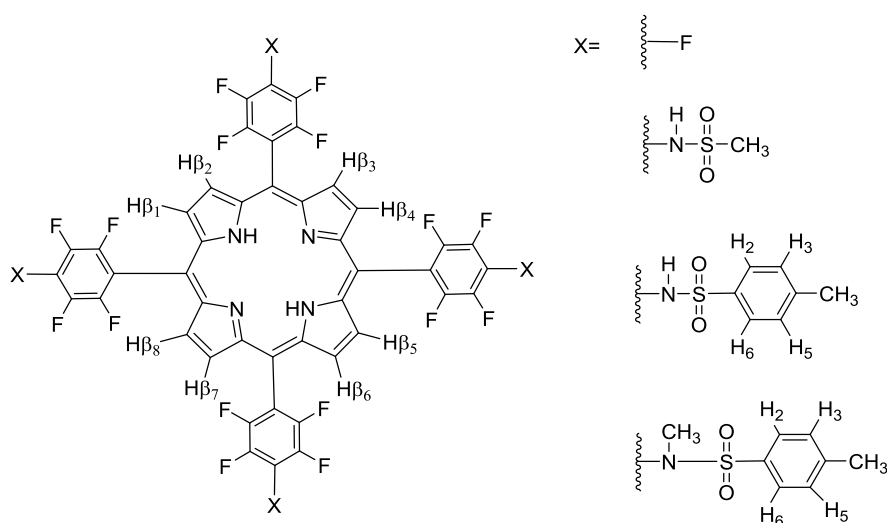


Figura 2.4 – Nomenclatura proposta para a definição dos diferentes tipos de protões das porfirinas apresentadas

As propostas de atribuição dos valores referentes aos desvios químicos, constantes de acoplamento e multiplicidade de spin são apresentados na tabela 2.7. Uma vez que a maioria dos compostos não apresenta o mesmo substituinte nas quatro posições *meso*, verifica-se a ocorrência de alterações, apesar de não acentuadas, no desvio químico dos protões β-pirrólicos e dos NH do interior do anel. Com o intuito de explicitar a estratégia aplicada, apresenta-se, a título de exemplo a interpretação do efeito dos diferentes substituintes para a porfirina **2.7**. As restantes caracterizações encontram-se descritos na secção experimental (Capítulo 4).

Na figura 2.6, apresenta-se o respetivo espectro de RMN de ^1H , onde se observam seis sinais característicos: um sinal em forma de singuleto a 8.94 ppm; dois sinais em forma de duplete a 7.46-7.48 e 8.04-8.06 ppm; dois sinais em forma de singuleto a 7.08 e 2.51 ppm e por fim um sinal em forma de singuleto a -2.89 ppm. Os sinais a 8.94 e -2.89 ppm são atribuídos aos protões β -pirrólicos e N-H internos da porfirina base, respetivamente e os restantes à *p*-toluenosulfonamida. Os hidrogénios no interior do anel sofrem uma forte blindagem devido ao campo magnético gerado pela corrente de anel do macrociclo tetrapirrólico ter sentido oposto ao do campo externo aplicado, consequentemente estes protões apresentam valores negativos de desvio químico. Pelo contrário, no exterior do anel o campo magnético externo é fortemente reforçado pelas correntes de anel, surgindo a ressonância destes protões em campo fraco, ou seja, com elevados valores de desvio químico ($\delta=8.94$ ppm). Os dois sinais seguintes em campo baixo – 7.46-7.48 e 8.04-8.06 ppm - foram atribuídos aos protões aromáticos da sulfonamida. Cada protão aromático acopla com o protão aromático adjacente ($J = 8.2$ Hz) originando dupletos. Neste caso, o sinal referente aos protões aromáticos adjacentes ao grupo SO_2 apresentam um desvio maior devido à proximidade a este grupo eletroatractor (figura 2.5). Além disso temos também a influência do efeito doador de eletrões por indução do grupo metilo, que em certa forma blinda os protões 3 e 5.

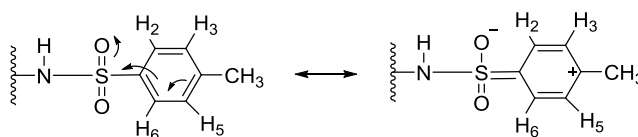
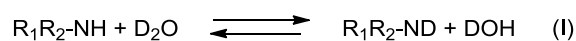


Figura 2.5 – Efeito eletroatractor do grupo SO_2

O sinal a 7.08 ppm altera o seu desvio químico de acordo com o número de substituições pelo que se pensou que este seria referente ao protão do NH. De modo a certificar este facto, realizou-se o mesmo espectro em CDCl_3 com adição de uma gota de D_2O e observou-se que o sinal referido desapareceu, confirmando a hipótese colocada. Os protões do grupo NH são bastante lábeis sofrendo fenómenos de troca frequentemente, com água deuterada ocorre a reação (Equação I) esquematizada.



O sinal a 2.51 ppm é referente ao grupo metilo do anel aromático. Como todos os protões são equivalentes, não ocorre acoplamento e consequentemente o sinal é um singuleto.

A identificação de todos os sinais representados na tabela 2.7, foi proposta com base nesta metodologia. Adicionalmente, esta técnica foi também utilizada para determinar o número de substituições nas posições *meso* dos compostos obtidos. Com este fim, analisaram-se as integrações de sinais característicos, como os grupos metilo e os protões aromáticos. Posteriormente estas foram confirmadas por espectroscopia de massa.

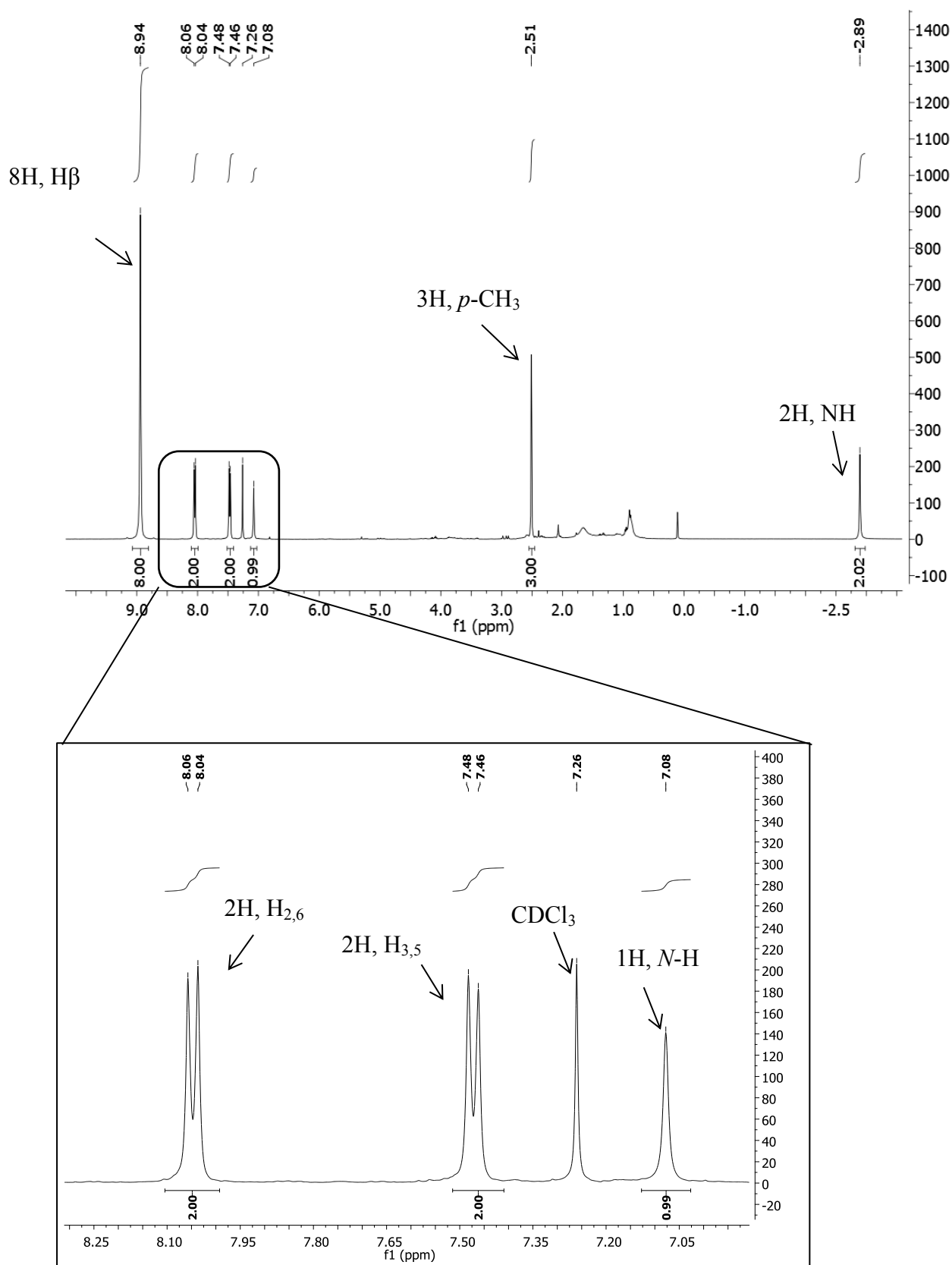


Figura 2.6- Espectro de ^1H RMN para a porfirina **2.7** em clorofórmio

Tabela 2.7 – Desvios químicos, constantes de acoplamento e multiplicidade de spin de RMN de ^1H das porfirinas 2.6-2.15 em CDCl_3 , exceto 2.14 em DMSO

Porfirina	H_β	$\text{H}_{2,6}$	$\text{H}_{3,5}$	N-H	N- CH_3	<i>p</i> - CH_3	NH
2.3	8.93						-2.90
	-	----	----	----	----	----	-
2.6	s						s
	8.93					3.53	-2.92
2.7	13.5	----	----	-	----	-	-
	d					s	s
2.8, 2.9	8.94	8.05	7.47	7.08		2.51	-2.89
	-	8.2	8.2	-	----	-	-
2.10	s	d	d	s		s	s
	8.89	8.01	7.46	6.86		2.51	-2.94
2.11/2.12	-	8.1	7.9	-	----	-	-
	s	d	d	s		s	s
2.13	8.92	7.97	7.47		3.50	2.51	-2.91
	-	8.2	8.1	----	-	-	-
2.14	s	d	d		s	s	s
	8.85	7.96	7.47		3.51	2.51	-2.90
2.15	51.6	7.6	7.5	----	-	-	-
	d	d	d		s	s	s
2.15	8.96	7.96	7.47		3.51	2.51	-2.89
	-	8.1	8.0	----	-	-	-
2.15	s	d	d		s	s	s
	9.11			-	----	-	-3.04
2.15	-	----	----				-
	s						s
2.15	8.99	7.97	7.48	----	3.52	2.52	-2.85
	-	6.1	6.1		-	-	-
2.15	s	d	d		s	s	s

Legenda: 1ª linha - desvio químico em ppm

2ª linha - constantes de acoplamento em Hz

3ª linha - multiplicidade de spin

No composto tetrassubstituído **2.14** o pico referente ao grupo metilo apresenta um desvio químico de 3.28 ppm em DMSO e 3.66 ppm em metanol. Além disso, é um pico alargado e a integração não apresenta os valores expectáveis, variando mesmo entre espectros da mesma amostra. A possível ocorrência de fenômenos de troca em grupos constituídos por prótons ácidos, é uma justificação viável. Estes verificam-se com o uso de solventes próticos, sendo acentuados na presença de água. Como as restantes porfirinas são solúveis em clorofórmio, este fenómeno ainda não tinha sido observado. Encontram-se em curso estudos de RMN com variação da temperatura de modo a corroborar a explicação supracitada.

Tal como referido anteriormente, procedeu-se também à análise do espectro de RMN de ^{19}F dos compostos obtidos. Para uma melhor compreensão da atribuição dos picos aos respetivos acoplamentos encontra-se na figura 2.7 a numeração atribuída aos átomos de flúor da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina.

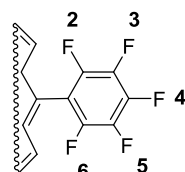


Figura 2.7- Numeração dos átomos de flúor da 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina

Na figura 2.8, encontra-se a título de exemplo, o espectro de RMN de flúor da porfirina **2.10**. Neste, a porfirina apresenta cinco sinais distintos: três em forma de duplo duplete a -135.36 a -135.44 ppm, -135.64 a -135.73 ppm e -141.75 a -141.85 ppm, um sinal em forma de tripleto a -150.06 a -150.17 ppm com constante de acoplamento de 20.6 Hz e um sinal em forma de multiplete a -160.21 ppm. Três dos sinais são comuns ao espectro da porfirina sem substituição, uma vez que este apenas é substituído numa posição, ficando as restantes inalteradas. Começando por estes e de acordo com o esquema acima, o primeiro duplo duplete (-135.36 a -135.44 ppm) deve-se à ressonância dos oito átomos de flúor das posições 2 e 6 dos grupos benzeno, o tripleto à ressonância de quatro átomos de flúor da posição 4 do anel benzóico e o multiplete corresponde aos oito átomos de flúor das posições 3 e 5. Existe um acoplamento a curta distância com os átomos vizinhos, denominado acoplamento J^3 , que apresenta valores elevados e a longa distância com o átomo que se encontra em posição *para* relativamente a si, acoplamento J^5 apresentando valores mais baixos. Cada átomo na posição 2 e 6 acopla com o seu átomo adjacente ($J = 23.2$ Hz) e com o átomo em posição oposta ($J = 7.3$ Hz) originando um duplo duplete; o mesmo acontece com cada átomo na posição 3 e 5, no entanto, adicionalmente estes acoplam ainda com o flúor 4 originando deste modo um multiplete; cada átomo na posição 4 acopla com os dois átomos adjacentes originando desta forma um tripleto ($J = 20.6$ Hz). Os outros dois duplos dupletos, de -135.64 a -135.73 ppm e de -141.75 a -141.85 ppm, são referente à posição monossubstituída, onde cada flúor acopla com o átomo adjacente e com o oposto, tal como explicitado anteriormente.

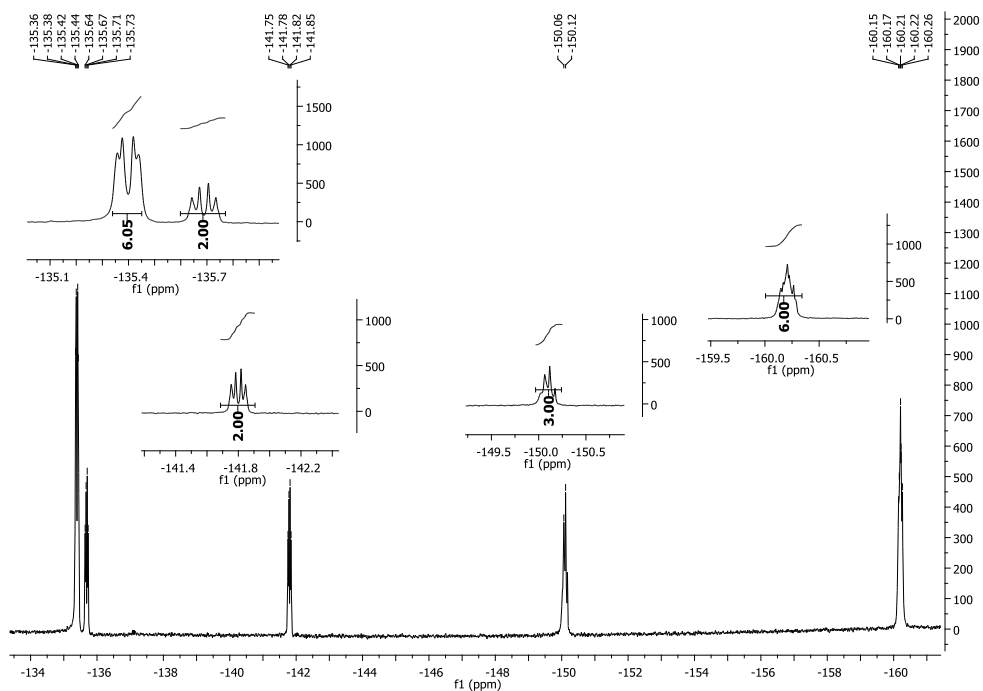


Figura 2.8- Espectro de ^{19}F RMN para a porfirina 2.10 em clorofórmio

Este comportamento é observado na maioria dos compostos sintetizados, sendo apenas exceção nos compostos tetrassubstituídos. Nestes, todas as posições *meso* possuem o mesmo substituinte, deste modo, o espectro apenas apresenta dois sinais, tal como demonstrado na figura 2.9. Estes são dois dupletos, referentes aos pares de átomos 3/5 e 2/6.

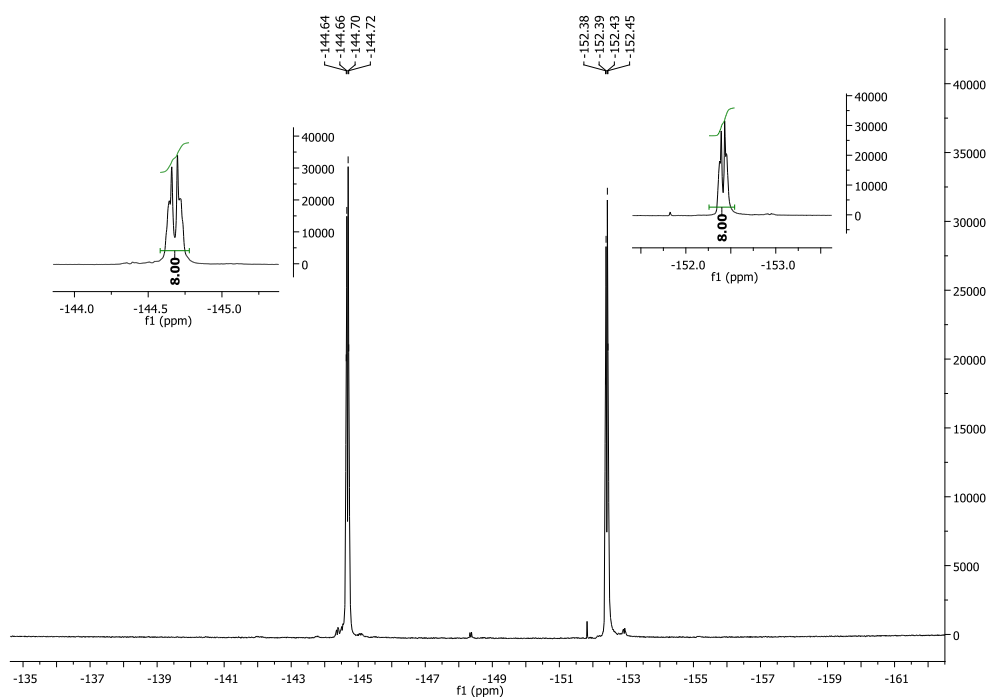


Figura 2.9- Espectro de ^{19}F RMN para a porfirina 2.14 em DMSO

Tabela 2.8 – Desvios químicos, constantes de acoplamento e multiplicidade de spin de RMN de ^{17}F das porfirinas sintetizadas em CDCl_3 , exceto 2.14 em DMSO

Porfirina	$F_{3/5}$	F_4	$F_{3/5'}$	$F_{2/6'}$	$F_{2/6}$
2.3	-160.15 a -160.26 - m	-150.11 20.8 t	-----	-----	-135.9 22.7; 7.6 dd
2.6	-160.26 a -162.08 - m	-151.22 20.9; 7.1 td	-147.82 23.7; 10.7 dd	-136.54 7.3 d	-136.47 15.3; 7.9 dd
2.7	-159.35 22.8; 7.5 td	-149.44 a -150.90 - m	-142.17 67.3; 33.5 dd	-135.51 102.1; 51 dd	-134.73 21.8; 5.1 dd
2.8, 2.9	-159.34 22.3; 6.8 td	-150.2 20.4 t	-142.01 23.3; 10.4 dd	-135.27 23.4; 10.4 dd	-134.73 23.2; 7.1 dd
2.10	-160.15 a -160.26 - m	-150.12 20.6 t	-141.80 23.7; 10.9 dd	-135.69 23.7; 10.9 dd	-135.40 23.2; 7.3 dd
2.11, 2.12	-161.25 a -161.35 - m	-151.19 - t	-142.9 12.9 d	-136.79 23.4; 10.5 dd	-136.50 16.1 d
2.13	-160.32 a -161.32 - m	-152.05 - s	-141.52 23.2; 10 dd	-136.79 a -137.24 - m	-132.57 23.2; 1.7 dd
2.14	-----	-----	-152.19 19.1 dd	-144.71 17.7 dd	-----
2.15	-----	-----	-141.52 a -142.90 - m	-136.53 a -137.79 - m	-----

Legenda: 1ª linha - desvio químico em ppm

2ª linha - constantes de acoplamento em Hz

3ª linha - multiplicidade de spin

De forma a complementar a caracterização apresentada, realizaram-se na Unidade de Espectroscopia de Massa da Universidade de Santiago de Compostela, espectros de massa com as técnicas de ionização MALDI-TOF ou ESI-TOF, de todas as porfirinas descritas. A título de exemplo, apresenta-se os resultados obtidos para a porfirina **2.12/2.13**. Como se pode observar, existe uma excelente concordância entre o padrão isotópico calculado e o observado, sendo o erro de apenas 0.0641 ppm. A distribuição isotópica apresenta um pico de maior intensidade de 1276.12 m/z correspondente à massa do ião molecular e alguns picos de menor intensidade referentes aos diferentes isótopos.

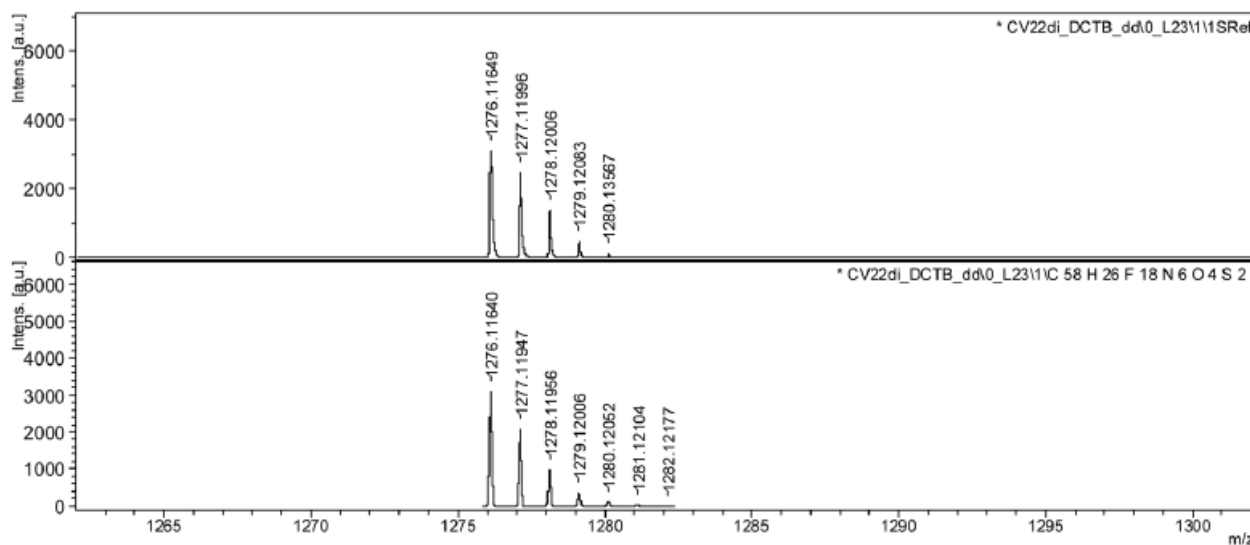


Figura 2.10-Padrão isotópico calculado e observado para a porfirina **2.12/2.13**

Em todos os espectros obtidos para as porfirinas sintetizadas se observou a presença do ião molecular $(M+H)^+$, bem como uma boa concordância entre o padrão isotópico calculado e o observado. Os restantes resultados encontram-se descritos na secção experimental (capítulo 4).

2.3- Síntese de hidroporfirinas

Para além de um fotossensibilizador ideal possuir todos os requisitos fotofísicos avaliados e apresentados adiante nesta dissertação, é necessário que este absorva na gama de comprimentos de onda compreendidos na janela terapêutica (600-850nm). Todas as porfirinas apresentadas possuem uma banda de absorção nesta gama de valores, no entanto, esta apresenta uma baixa intensidade ($\epsilon \leq 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Deste modo, é de elevado interesse, evoluir, a partir destes, para compostos que absorvam com maior intensidade e preferencialmente que apresentem um maior desvio para o infravermelho.

As porfirinas possuem na sua estrutura, duas ligações duplas que não pertencem ao sistema de conjugação do macrociclo, tornando-as suscetíveis à ocorrência de redução. Desta forma,

obtêm-se clorinas quando apenas uma das posições é reduzida e bacterioclorinas quando são ambas.

Baseado neste conhecimento e nos dados descritos anteriormente nesta dissertação, selecionou-se a porfirina que reunia o maior número de características relevantes para PDT *in vivo*, a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluor-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina, como modelo para prosseguir com os estudos de redução. Deste modo, começámos por aplicar o método descrito por RamaiahPrabhu³² e explicitado no capítulo 1. Assim, numa experiência tipo, a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluor-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina e o FeCl₃.6H₂O foram dissolvidos em etanol, sendo posteriormente adicionado um excesso de 10 equivalentes de hidrazina hidratada (NH₂NH₂.H₂O). A mistura foi colocada em agitação, em atmosfera inerte e a 25^oC. O acompanhamento da reação foi realizado recorrendo a espectroscopia UV-Vis e por TLC. Através destes observamos a formação de clorina progressivamente, até ao desaparecimento total da porfirina de partida. O crude foi purificado por cromatografia utilizando como eluente diclorometano/acetato de etilo (3:1) e gel de sílica como fase estacionária. No decorrer desta, foi necessário ter alguns cuidados para evitar a oxidação do produto. Deste modo, os solventes foram utilizados frios e desarejados. No fim desta etapa, avaliou-se a amostra recolhida e verificou-se que não tinha ocorrido oxidação, obtendo-se a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluor-4'-metanosulfamoil)fenil]clorina **2.17** com um rendimento de 65%.

Posteriormente, com o intuito de verificar se era possível evoluir até à bacterioclorina recorrendo a esta metodologia, colocou-se uma nova reação mimetizando a anterior. Progressivamente foi adicionado catalisador e hidrazina aquosa a esta. Verificou-se que mesmo utilizando um largo excesso de hidrazina, cerca de 130 equivalentes (5.15x10⁻⁴ mol), não era possível obter seletivamente a bacterioclorina. Neste sentido, recorreu-se ao método sem solvente descrito precedentemente pelo grupo,^{33,34} decorrente da otimização do método de redução da diimida de Whitlock.³⁵ Assim, numa experiência tipo, sem solvente, mistura-se a porfirina com 40 equivalente de *p*-toluenosulfonilhidrazida num tubo de Schlenck e liga-se o vácuo (P= 0,1 Torr). Cerca de 20 minutos depois, o sólido é aquecido a uma temperatura de 140^oC na total ausência de oxigénio. Logo que se atinja a temperatura de fusão da hidrazina, o líquido obtido dissolve a porfirina e a reação ocorre. Após 20 minutos, deixa-se arrefecer até à temperatura ambiente. Apenas quando ocorreu o arrefecimento total, se procedeu à abertura do reator e se retirou uma amostra do crude da qual se obteve um espectro de absorção UV-Vis. Pela análise deste verificou-se que se tratava de uma mistura de clorina e bacterioclorina. Tendo em conta este facto, adicionaram-se mais 20 equivalentes de *p*-toluenosulfonilhidrazida e a reação foi colocada novamente, seguindo o procedimento descrito acima. Após 20 minutos voltou-se a recolher uma amostra e a realizar o espectro UV-Vis, no qual se observou que a contaminação com clorina já não era significativa. O resíduo sólido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica

utilizando como eluente inicialmente diclorometano de modo a remover a *p*-toluenosulfonilhidrazida e de seguida diclorometano/acetato de etilo 3:1. Os cuidados seguidos foram semelhantes aos indicados anteriormente para a purificação da clorina. Obteve-se a 5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluor-4'-metanosulfamoil)fenil]bacterioclorina **2.18** com um rendimento de 70%.

2.3.1- Caracterização química

Tal como anteriormente, tanto a clorina como a bacterioclorina foram caracterizadas por RMN de protão e de flúor. Ao reduzirmos uma ligação dupla do macrociclo tetrapirrólico para formar a clorina, quebramos a simetria deste. Por este facto, o sinal correspondente aos hidrogénios β -pirrólicos que na porfirina aparecia como um singuleto a $\delta=9.11$ desdobra-se em 4 sinais: três sinais em campo fraco, ou seja, com elevados valores de desvio químico ($\delta=8.59-9.19$ ppm) e um em campo forte referente aos quatro protões da posição reduzida [H β (r)]. Por sua vez, os protões do interior do anel sofrem uma menor blindagem, uma vez que a corrente gerada pelo anel do macrociclo tetrapirrólico é inferior. Deste modo, o sinal a $\delta=-3.04$ ppm é desviado para $\delta=-1.61$ ppm. Além disso, ao reduzirmos a porfirina, o sinal a $\delta=3.07$ ppm atribuído aos protões do grupo metilo da sulfonamida já se observa no espectro.

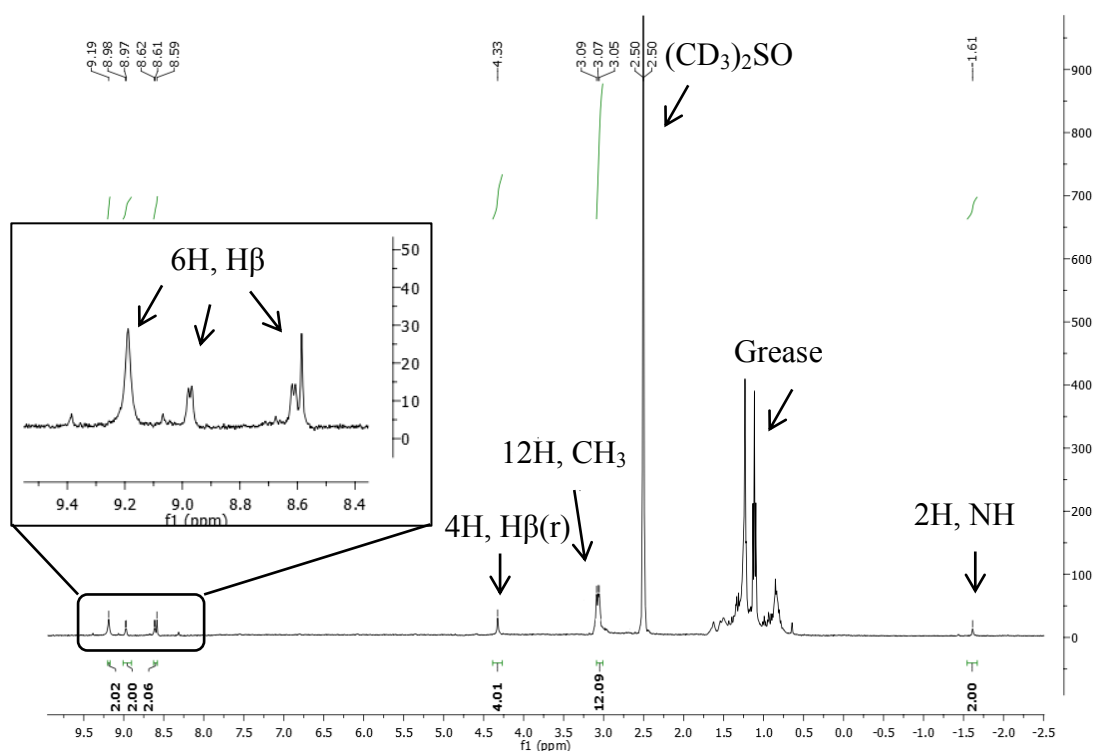


Figura 2.11 – Espectro de ¹H RMN da clorina **2.17** em DMSO

Na bacterioclorina, após ocorrência da segunda redução em anéis opostos, a simetria do anel é reestabelecida. Deste modo, relativamente aos protões β -pirrólicos observa-se apenas um

sinal em campo fraco, a $\delta=8.45$ ppm e um sinal a $\delta=4.12$ ppm referente aos oito prótons das posições reduzidas [$H\beta(r)$]. Dado que a corrente gerada pelo anel é ainda menor que no caso anterior, verificamos um ligeiro desvio do sinal referente aos prótons do interior do anel para $\delta=-1.41$ ppm.

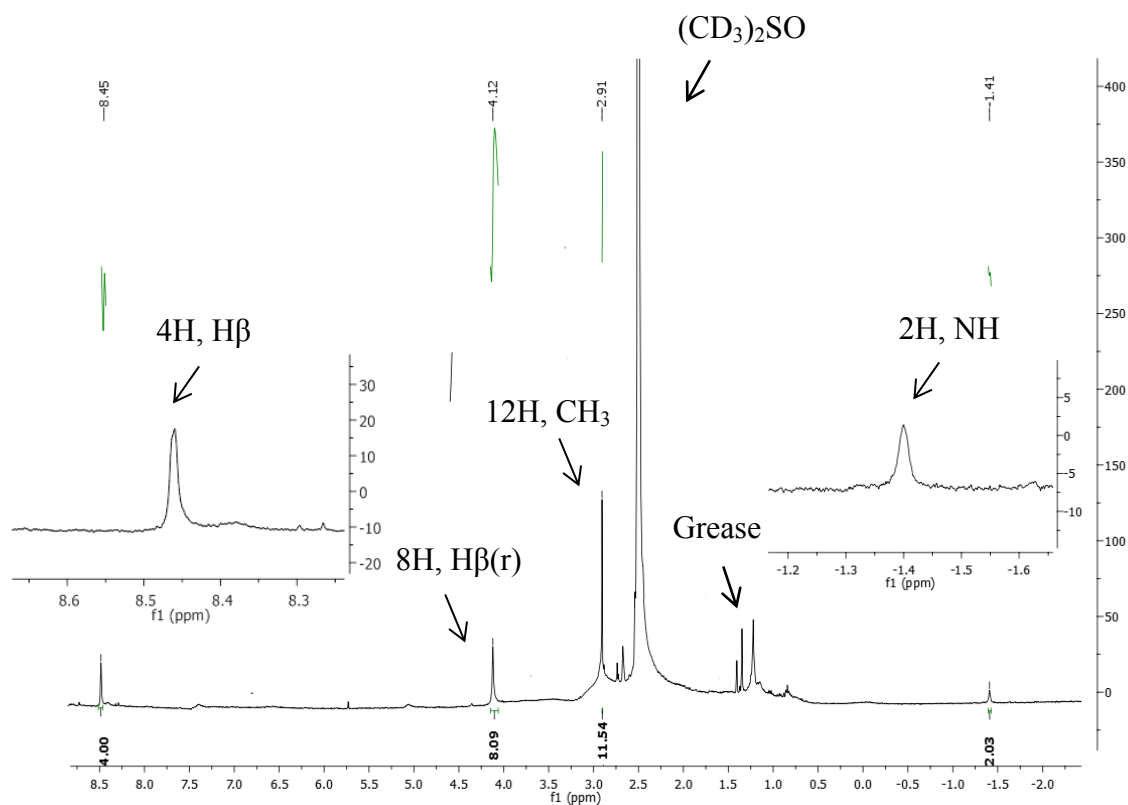


Figura 2.12 - Espectro de ^1H RMN da bacterioclorina **2.18** em DMSO

Procedeu-se também à análise do espectro de RMN de ^{19}F dos compostos. No caso da clorina, pode-se facilmente constatar que quatro dos flúores se encontram num ambiente químico diferente (assinalados com a sua numeração). Devido a este facto, o espectro de RMN de flúor (figura 2.13) apresenta quatro sinais distintos, sendo dois deles similares aos apresentados pela porfirina tetrassubstituída e dois adicionais correspondentes aos pares 2/6 e 3/5. A integração dos sinais corrobora a interpretação efetuada.

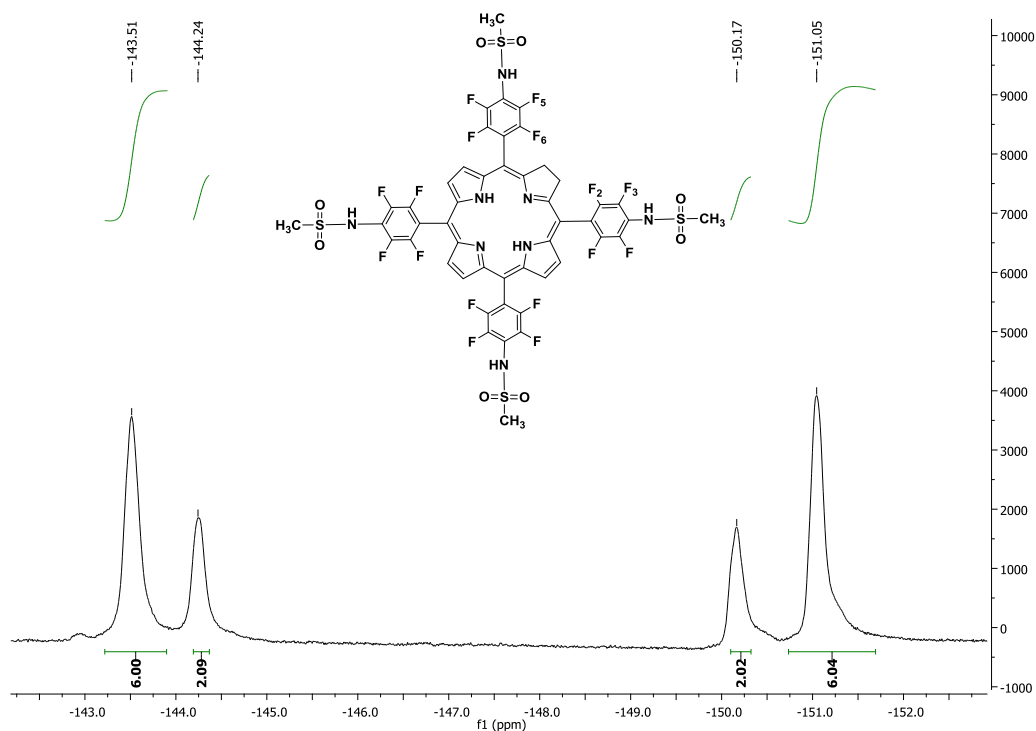


Figura 2.13 - Espectro de ^{19}F RMN da clorina **2.17** em DMSO

O espectro de RMN de flúor da bacterioclorina é semelhante ao da porfirina tetrassubstituída que lhe deu origem. Este facto indica que a simetria foi restabelecida e que o anel fenílico é novamente, perpendicular ao macrociclo. (figura 2.14).

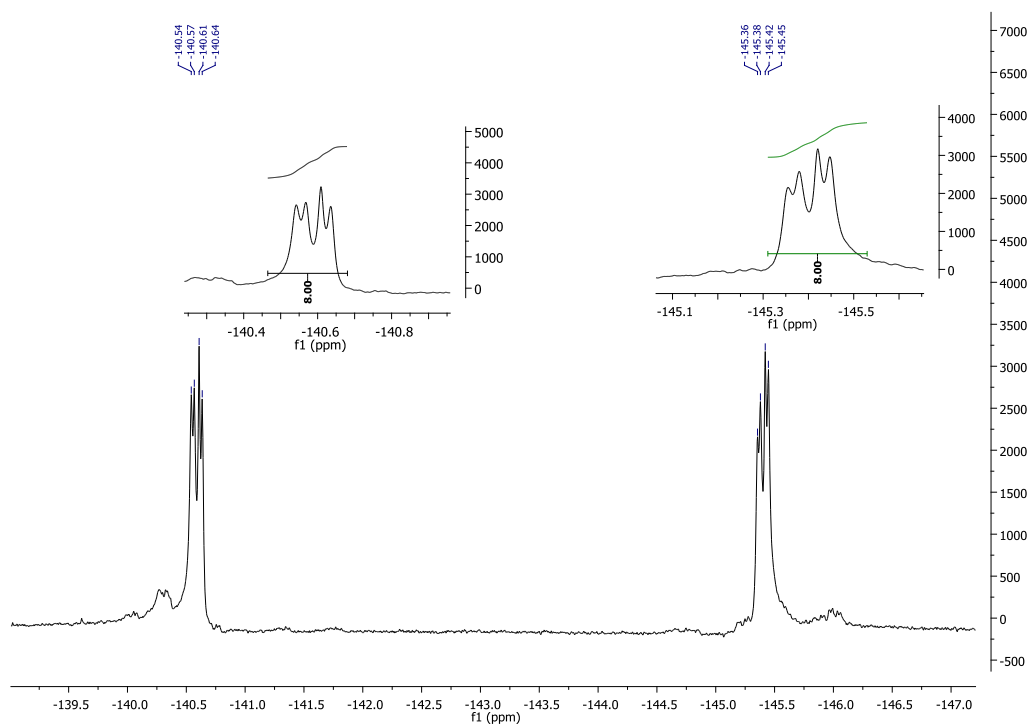


Figura 2.14 - Espectro de ^{19}F RMN da bacterioclorina **2.18** em DMSO

2.4- Estudos fotofísicos

Para complementar os estudos e avaliar a potencial utilização dos compostos sintetizados como fotossensibilizadores para inativação de células cancerígenas ou bacterianas, procedeu-se à sua caracterização fotofísica.

O espectro de absorção UV-Vis característico de uma porfirina de base livre distingue-se pela existência de uma banda com elevado coeficiente de absorvidade molar (ϵ) próxima dos 400 nm, geralmente entre 400 a 450 nm, seguida de quatro bandas de baixa intensidade compreendidas entre os 500 e os 660 nm. A primeira é denominada de banda B ou Soret e as quatro bandas de menor intensidade de bandas Q, segundo a terminologia descrita por Platt.³⁶ Ao longo de várias décadas foram publicados trabalhos com interpretações dos espectros deste tipo de compostos, no entanto, o modelo teórico das quatro orbitais proposto por Gouterman^{37,38} no início da década de 60 continua a ser o mais consensual devido à sua natureza simplificada. De acordo com este, o espectro de absorção das porfirinas, pode ser interpretado com base nas transições electrónicas entre duas orbitais ocupadas de maior energia, HOMO (do inglês “highest occupied molecular orbital”) designadas por b_1 e b_2 e duas orbitais desocupadas de menor energia, LUMO (do inglês “lowest unoccupied molecular orbital”) designadas por c_1 e c_2 . Segundo Gouterman^{37,38} pode arbitrar-se um sistema de eixos cartesianos x e y sobre a estrutura do macrociclo, sendo possível que as transições ocorram sobre ambos. Assim as bandas Q_x e Q_y têm origem nas transições $b_1 \rightarrow (c_1, c_2)$ e as bandas B_x e B_y nas transições $b_2 \rightarrow (c_1, c_2)$.

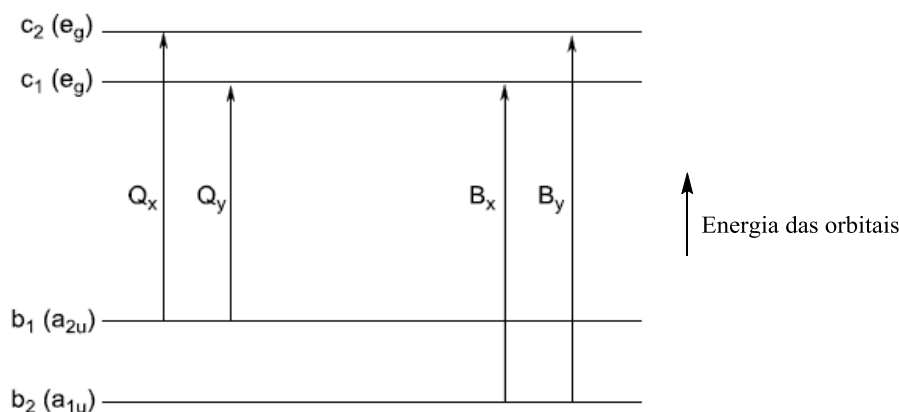


Figura 2.15 – Esquematisação das transições eletrónicas possíveis de acordo com o modelo de Gouterman

Quando estas transições ocorrem entre o nível vibracional zero do estado fundamental e o nível vibracional zero do estado excitado, estas podem também ser denominadas $Q_x(0,0)$, $Q_y(0,0)$, $B_x(0,0)$ e $B_y(0,0)$. Contudo, associado às transições Q, surgem ainda outras duas transições – $Q_x(1,0)$ e $Q_y(1,0)$ – referentes a transições para níveis vibracionais mais elevados. De acordo com esta análise, o espectro deveria apresentar duas bandas B, no entanto, este facto não se verifica uma vez

que a baixa diferença de energia entre as transições B_x e B_y conduz ao aparecimento de uma única banda, ligeiramente alargada.³⁹ A intensidade das quatro bandas Q varia de acordo com os grupos substituintes presentes no macrociclo, o que levou Stern et al.⁴⁰ a propor uma classificação dos espectros de absorção de acordo com esta intensidade relativa. Esta compreende quatro tipos: *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* e *filo*.

Na figura 2.16, encontram-se os espectros das porfirinas **2.3** e **2.6-2.15** e respetivas ampliações. Os espectros foram agrupados, tendo em conta a sulfonamida constituinte, de modo a facilitar a sua comparação. Todos os espectros foram adquiridos utilizando diclorometano como solvente, exceto o da porfirina **2.14** que foi realizado em DMSO devido à sua insolubilidade em diclorometano. Deste modo, este espectro não pode ser comparado com os restantes, uma vez que se encontra descrito na literatura a influência do solvente no valor do coeficiente de absorção molar bem como nos comprimentos de onda de absorção.⁴¹ Analisando os espectros apresentados, verifica-se que a intensidade relativa das bandas Q não é alterada pelo número de substituições, nem pelo substituinte, classificando-se todos os espectros como sendo do tipo *filo*. Este facto era previsível, uma vez que a substituição ocorre no anel fenílico e não no macrociclo tetrapirrólico.

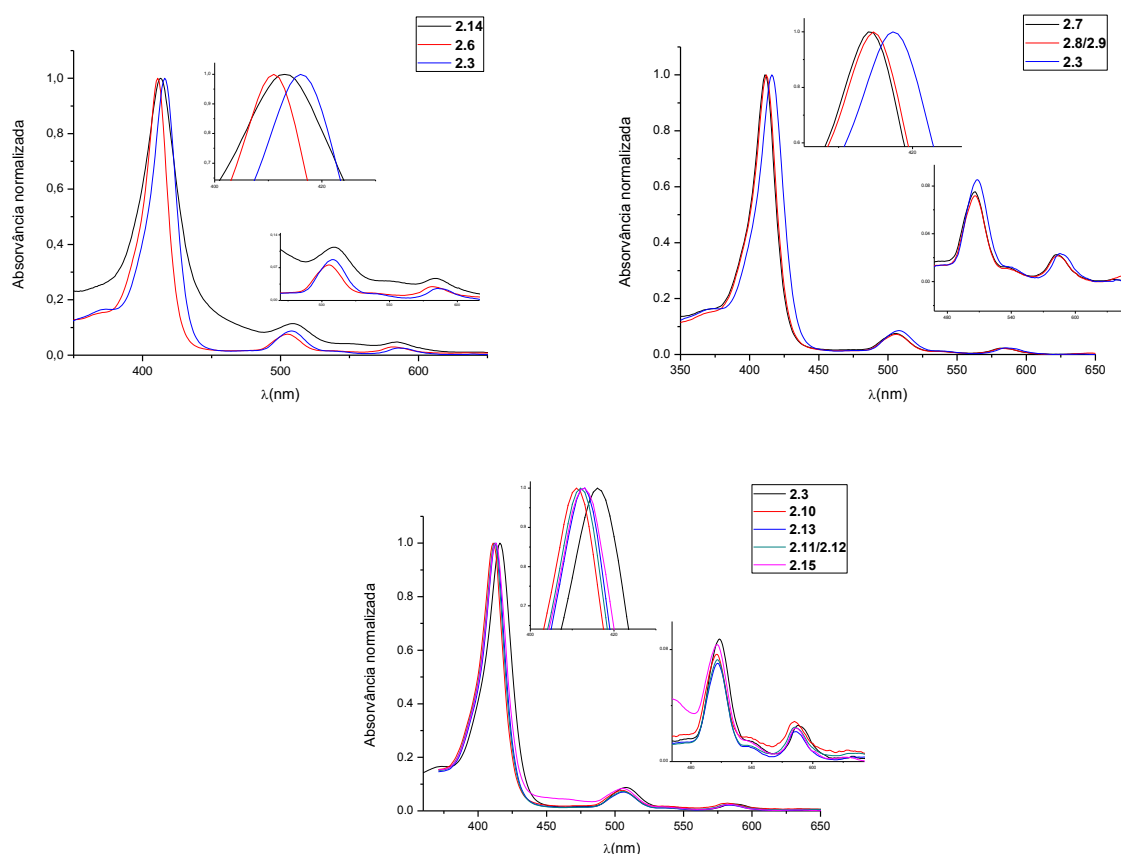


Figura 2.16 – Espectros de absorção das porfirinas **2.3** e **2.6-2.15** e respetivas ampliações. Os dados encontram-se agrupados por famílias de compostos.

Além disso nos produtos com apenas uma substituição observa-se um ligeiro desvio, de 5 nm, para a zona do azul, ou seja, para menores comprimentos de onda. Este efeito decresce com o aumento do número de substituições, aparentemente estabilizando nos 413 nm.

Cálculos de orbitais moleculares demonstraram que as orbitais LUMO são praticamente isoenergéticas nas porfirinas e seus derivados reduzidos correspondentes. Por outro lado, a redução do macrociclo tetrapirrólico provoca uma diminuição da diferença de energia entre as orbitais HOMO-LUMO que se torna mais evidente com o aumento do número de posições reduzidas, bem como uma destabilização da orbital HOMO devida essencialmente à distorção do macrociclo. Consequentemente, observa-se um desvio batocrômico do espectro UV-Vis, essencialmente das bandas Q, associado a um aumento da absortividade molar das mesmas.⁴² Na figura 2.16 encontra-se a comparação dos espectros da porfirina **2.14** e dos seus derivados reduzidos (**2.17** e **2.18**). Nesta observa-se o deslocamento da banda de absorção de menor energia de $\lambda_{\text{max}}=638$ nm na porfirina, para $\lambda_{\text{max}}=655$ nm na clorina e $\lambda_{\text{max}}=751$ nm na bacterioclorina. Por outro lado, verifica-se o aumento do coeficiente de absortividade molar de $\epsilon=6.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na porfirina para $\epsilon=5.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na clorina e $\epsilon=8.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na bacterioclorina.

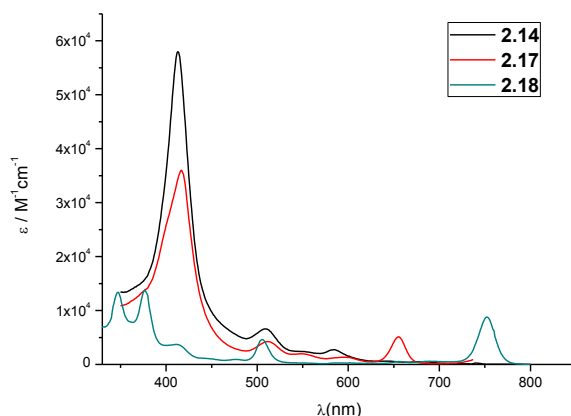


Figura 2.17- Espectro UV-Vis da porfirina **2.14** e seus derivados reduzidos (**2.17** e **2.18**) em DMSO

A lei de Beer-Lambert indica que existe uma dependência logarítmica entre a intensidade de luz incidente numa amostra e a intensidade de luz transmitida por esta. Adicionalmente, relaciona esta fração de luz incidente absorvida, num determinado comprimento de onda, com o coeficiente de absorção molar (em $\text{L}/\text{mol}\cdot\text{cm}$), com a concentração da amostra (em mol/L) e com o comprimento do percurso ótico (em cm).⁴³

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I_\lambda} = \epsilon(\lambda)lc \Leftrightarrow \epsilon(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{lc} \text{ (II)}$$

Com recurso a esta lei e fixando o comprimento do percurso ótico em 1 cm, determinaram-se os coeficientes de absorção molar de cada composto. Para isso, foram preparadas soluções em diclorometano e no caso da porfírina **2.14** e dos seus derivados reduzidos (**2.17** e **2.18**) em DMSO, com concentrações entre 10^{-5} e 10^{-6} , das quais se efetuaram os respetivos espectros de absorção. De seguida, representa-se graficamente os máximos de absorção, para cada banda, em função das concentrações das soluções previamente preparadas e procede-se ao ajuste linear destes pontos. O declive do ajuste corresponde ao coeficiente de absorção molar da banda em análise.

Na figura 2.18, apresenta-se a título de exemplo, a representação gráfica da absorvância em função da concentração para a banda Qy da bacterioclorina **2.18**.

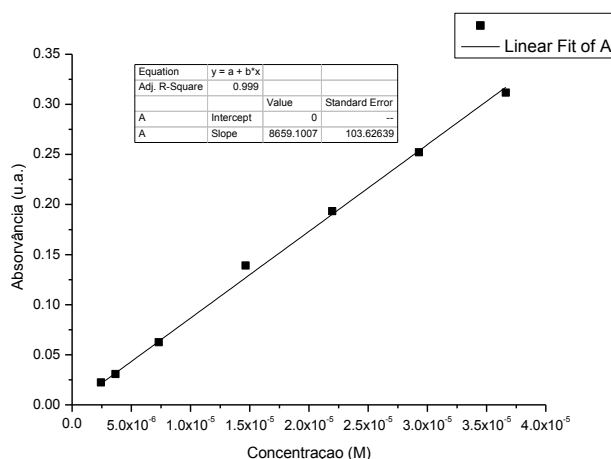


Figura 2.18 – Absorvância em função da concentração para a banda Qx(0,0) ($\lambda=751\text{nm}$) da bacterioclorina **2.18** em DMSO

Os coeficientes dos restantes compostos foram calculados do mesmo modo, obtendo-se em todos eles uma boa correlação, indicando que na gama de concentrações utilizadas não se observaram desvios à lei de Beer-Lambert e que consequentemente não ocorreu agregação⁴⁴. Estes são apresentados na tabela 2.9. Para os compostos **2.14**, **2.17** e **2.18** os coeficientes de absorvidade molar são inferiores aos normalmente descritos na literatura para este tipo de compostos, indicando que possivelmente estes não se encontram completamente puros, induzindo erros por defeito. Deste modo, perspetiva-se uma otimização no processo de purificação destes compostos, seguida de uma nova determinação destes valores.

Tal como abordámos, quando uma molécula no seu estado fundamental (S_0), absorve luz transita para um estado excitado ($S_1 \dots S_n$) de maior energia. No entanto, apesar de esta transição ser possível para todos os estados, ocorre um decaimento, através de processos não radiativos, para o estado excitado de mais baixa energia (S_1), derivado do facto de as porfirinas obedecerem à regra de Kasha.⁴⁵ O retorno deste para o estado fundamental singuleto (S_0) pode ocorrer de forma direta, através da emissão de luz, processo designado por fluorescência ou de forma indireta, sofrendo

conversão intersistemas para o estado tripleto. Desta forma, o espectro de fluorescência típico apresenta uma banda de maior energia ($Q(0,0)$) derivada da transição obtida do nível vibracional mais baixo do estado excitado para o nível vibracional mais baixo do estado fundamental. Além desta, pode ainda apresentar bandas adicionais resultantes das transições para níveis vibracionais superiores do estado eletrônico fundamental, $Q(0,n)$, onde n representa o estado vibracional para o qual se dá a transição ($n = 0,1,2,\dots$).⁴⁶ Nas bacterioclorinas, geralmente, estas são praticamente insignificantes.⁴⁷

Para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência seguiu-se a metodologia proposta por Parker et al.⁴⁸, em que se compara o espectro de fluorescência da amostra com o de uma referência, cujas características fotofísicas sejam conhecidas. No caso das porfirinas, selecionou-se a TPP como padrão e tolueno como solvente ($\phi_F=0.11^{49}$), exceto no caso da porfirina **2.14** e da clorina **2.17** em que se utilizou DMSO. Preparam-se soluções de cada amostra com uma absorvância aproximada de 0.1 na banda Soret, de seguida diluíram-se estas num fator de 1/10. As soluções foram desarejadas cerca de 10 min e de seguida, efetuaram-se os respetivos espectros de emissão quer das porfirinas, quer da referência, excitando a 418 nm. Os espectros de todas as porfirinas foram semelhantes, verificando-se em todos eles que a banda correspondente à transição $Q(0,0)$ é superior em intensidade comparativamente à banda $Q(0,1)$, inversamente ao que ocorre com a TPP. A presença de átomos de halogénios pode introduzir diferenças na geometria dos estados, aumentando a sobreposição entre a função de onda do nível vibracional zero do estado excitado e o primeiro nível vibracional do estado fundamental. Consequentemente, a probabilidade de ocorrerem transições entre estes aumenta justificando assim, a alteração da intensidade relativa das bandas.⁵⁰ Em relação à clorina **2.17** observa-se que a sua intensidade de fluorescência é mais elevada do que a da porfirina correspondente (**2.14**) e que o seu espectro apresenta um ligeiro desvio para o infravermelho, tal como seria de esperar. Para a bacterioclorina **2.18** a metodologia utilizada foi semelhante, no entanto, utilizou-se a 5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoilfenil)bacterioclorina (luz11) como referência ($\phi_F=0.138^5$ em etanol) e excitou-se a 510 nm. Estes espectros de emissão apresentam apenas uma banda de elevada intensidade.

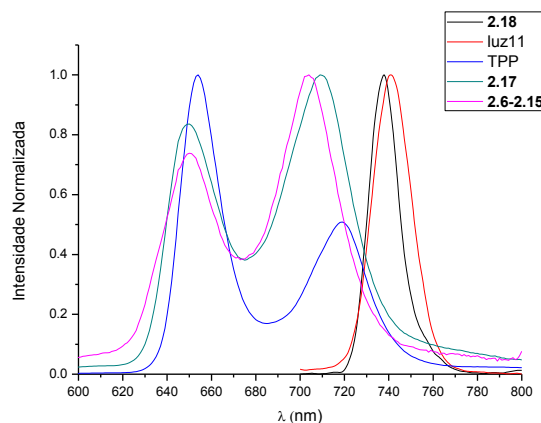


Figura 2.19- Espectro de fluorescência normalizado das referências (TPP e TDCPB), de uma das porfirinas **2.6-2.15** que apresentam o mesmo espectro em tolueno e dos derivados reduzidos **2.17** e **2.18** em DMSO

O rendimento quântico de fluorescência é definido como a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número total de fótons absorvidos. Este pode ser calculado através da equação III. Nesta, a área refere-se à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e η ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidos, podendo este termo ser anulado quando o solvente utilizado é o mesmo.

$$\Phi_F(\text{amostra}) = \frac{\text{Área}(\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Área}(\text{ref})} * \frac{\eta^2(\text{amostra})}{\eta^2(\text{ref})} * \Phi_F(\text{ref}) \quad (\text{III})$$

Como seria de esperar, devido à presença dos átomos de flúor⁵⁵, os rendimentos quânticos de fluorescência obtidos para os compostos sintetizados, apresentados na tabela 2.9, são relativamente baixos, sendo o valor mais elevado de $\Phi_F = 0.1375$ (entrada 10, tabela 2.9). Esta característica revela-se favorável para a potencial aplicação dos compostos sintetizados em terapia fotodinâmica. Além disso, pela análise destes dados, podemos observar que o Φ_F apresenta valores crescentes na série porfirina (**2.14**) < clorina (**2.17**) < bacterioclorina (**2.18**).

Seguidamente para estudar as características de absorção do primeiro estado tripleto bem como os respetivos tempos de vida do estado tripleto na ausência [$t_T(\text{N}_2)$] e presença de oxigénio [$t_T(\text{O}_2)$], utilizou-se a técnica de fotólise por relâmpago. Neste sentido foram preparadas as soluções em tolueno com absorvância aproximada de 0.2 a 355 nm.

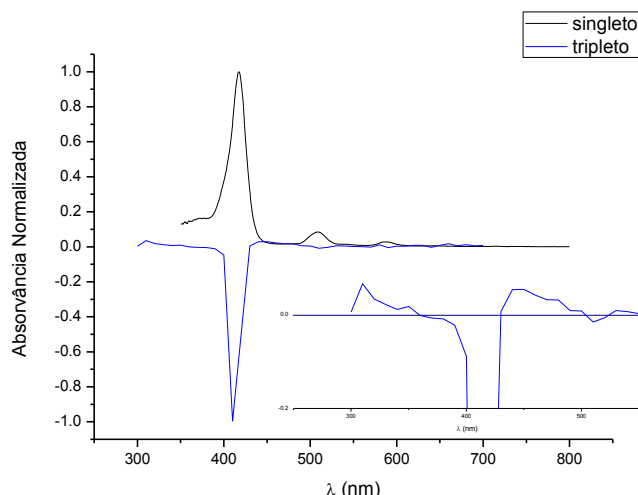


Figura 2.20- Espectro normalizado de absorção do estado tripleto e singuleto, tendo como exemplo a porfirina **2.13** em tolueno

Tal como descrito na literatura^{51,52} o espectro de absorção transiente singuleto-triplete apresenta duas depleções, correspondentes à banda Soret e Q do espectro de absorção, no estado fundamental, e duas bandas aparentes de absorção do estado tripleto principais entre 300-370nm e 450-500 nm. Devido à concentração utilizada, a banda Soret apresenta uma absorvância muito intensa o que dificulta a visualização destas duas bandas de menor intensidade (ampliação, gráfico 2.20).

Para definir os tempos de vida do estado tripleto, é feita uma primeira medição na presença de oxigénio e uma segunda após a amostra estar 20 min sob azoto. Com recurso a programas computacionais, é realizado o ajuste exponencial aos dados recolhidos e retirado o tempo respetivo da equação obtida (figura 2.21).

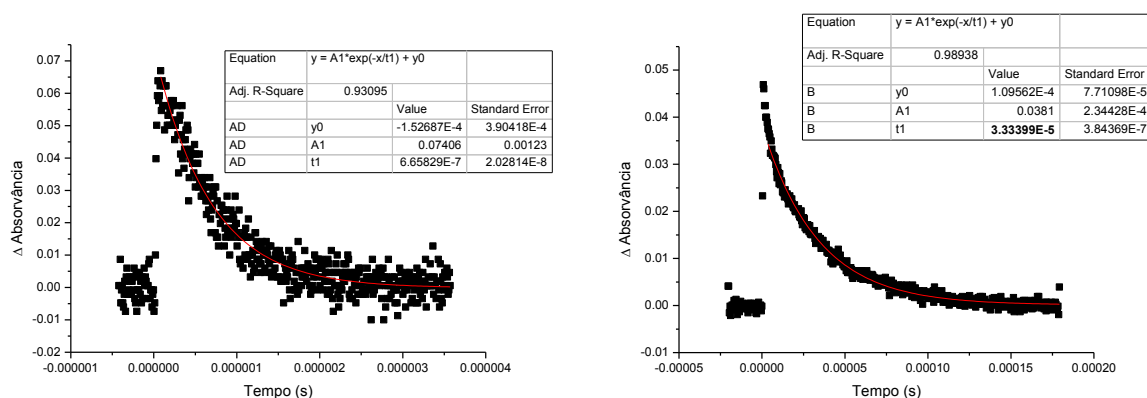


Figura 2.21- Decaimento do estado tripleto a 460 nm na presença (gráfico da esquerda) e na ausência (gráfico da direita) de O₂, tendo como exemplo a porfirina **2.10**

Observa-se que em todos os compostos analisados, o tempo de vida do estado tripleto na presença de oxigénio é menor do que na sua ausência confirmando que o estado excitado tripleto é suprimido pelo oxigénio molecular.

Esta supressão pode ocorrer quer por processos de transferência de eletrão (mecanismo tipo I), quer por processos de transferência de energia (mecanismo tipo II). Por norma, nas porfirinas o segundo mecanismo é dominante⁵³. Para verificar este facto foram calculados os rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto. A estratégia utilizada para o cálculo deste é semelhante à utilizada para o rendimento quântico de fluorescência, uma vez que também se considera uma referência mas desta vez a fenolona ($\Phi_{\Delta}=0.98$ ⁵⁴). Neste caso é utilizada a técnica de fotólise por relâmpago, efetuando-se uma medição da emissão de oxigénio singuleto a 1270 nm para diferentes energias do laser. Foram preparadas soluções das amostras em tolueno com absorvância aproximada de 0.2 a 355 nm. Posteriormente, para os dados referentes a cada energia do laser é feito um ajuste exponencial, tal como demonstrado na figura 2.22.

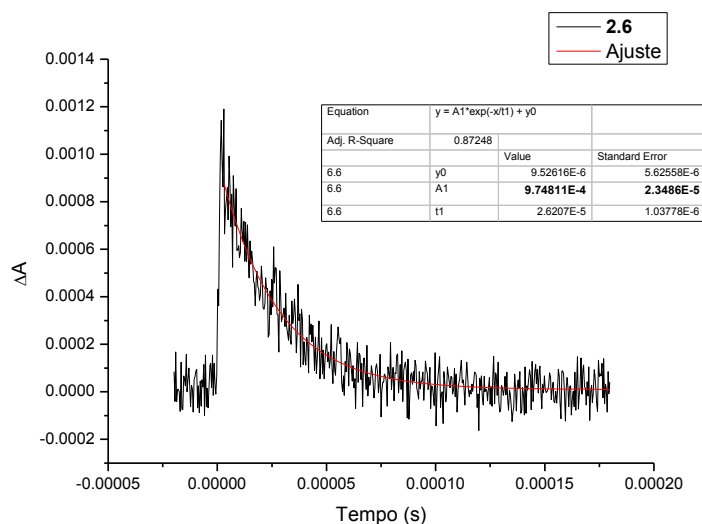


Figura 2.22- Emissão de fosforescência do oxigénio singuleto para a energia do laser de 6.6 tendo como exemplo a porfirina 2.6

Da equação de ajuste obtida é retirado o valor do pré-exponencial (A) e o respetivo erro e construído um novo gráfico deste (A) em função da energia do laser (Figura 2.23). De seguida procede-se a um ajuste linear dos valores e retira-se o respetivo declive da reta. O rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo oxigénio e o número total de fótons absorvidos pela amostra. Este pode ser calculado através da equação IV.

$$\Phi_{\Delta} (\text{amostra}) = \frac{\text{Declive (amostra)}}{1-10^{-\text{Abs(amostra)}}} * \frac{1-10^{-\text{Abs(ref)}}}{\text{Declive (ref)}} * \Phi_{\Delta} (\text{ref}) \quad (\text{IV})$$

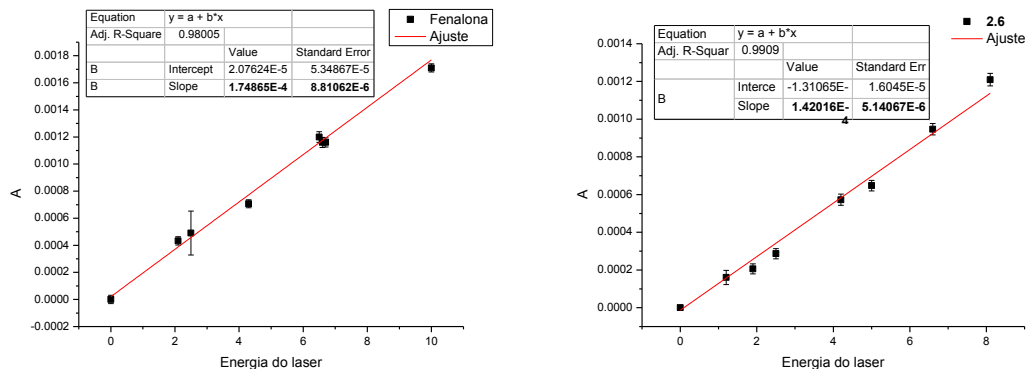


Figura 2.23- Ajuste linear do valor do pré-exponencial em função da energia do laser, tendo como exemplo a referência (fenalona) e a porfirina **2.6**

Na família de compostos funcionalizados com a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida observamos uma diminuição dos rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete com o aumento do número de substituições: **2.10** (monossubstituída, $\Phi_{\Delta}=0.66$) > **2.11/2.12** (dissubstituída, $\Phi_{\Delta}=0.63$) > **2.13** (trissubstituída, $\Phi_{\Delta}=0.59$). Este fenômeno é atribuído ao efeito de átomo pesado.⁵⁵ Os dados encontram-se sumariados na tabela 2.9.

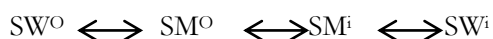
Sumariamente, verificou-se que os compostos possuem baixos rendimentos quânticos de fluorescência ($\Phi_F \leq 0.1375$) e rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete adequados ($\Phi_{\Delta} \geq 0.59$), revelando-se candidatos bastante promissores para aplicação como fotossensibilizador.

Tabela 2.9 – Dados espectroscópicos e fotofísicos das porfirinas, clorina e bacterioclorina sintetizadas

Entrada		Absorção /nm ($\epsilon / M^{-1}cm^{-1}$)					Fluorescência λ_{max} /nm		ϕ_F	ϕ_{Δ}	$\tau_T(O_2)$ / μs	$\tau_T(N_2)$ / μs	
		B (0,0)	Q _y (1,0)	Q _y (0,0)	Q _x (1,0)	Q _x (0,0)	Q (0,0)	Q (0,1)					
1	2.3	----	416 (2.3x10 ⁵)	508 (1.7x10 ⁴)	ombro	586 (5.4x10 ³)	639 (8.1x10 ²)	----	----	----	----	----	
2	2.6	----	411 (2.4x10 ⁵)	505 (1.4 x10 ⁴)	ombro	582 (4.5x10 ³)	636 (6.6x10 ²)	644	712	0.035	0.74± 0.08	0.59±0. 01	45.14 ±1.76
3	2.7	----	411 (2.1x10 ⁵)	506 (1.7x10 ⁴)	ombro	583 (5.4x10 ³)	637 (8.2x10 ²)	644	712	0.034	0.70± 0.04	0.59±0. 03	34.45 ±3
4	2.8/2.9	----	412 (1.7x10 ⁵)	506 (1.2x10 ⁴)	ombro	583 (4.0x10 ³)	644 (1.3x10 ³)	644	712	0.047	0.71± 0.05	0.62±0. 02	40.99 ±1.17
5	2.10	----	411 (2.7x10 ⁵)	505 (1.7 x10 ⁴)	ombro	582 (5.3x10 ³)	636 (8.3x10 ²)	644	712	0.042	0.66± 0.04	0.67±0. 02	33.34 ±0.38
6	2.11/2.12	----	412 (2.3 x10 ⁵)	506 (1.8x10 ⁴)	ombro	583 (5.7x10 ³)	642 (1.1x10 ³)	644	712	0.033	0.63± 0.02	0.64±0. 02	48.44 ±0.42
7	2.13	----	413 (2.9x10 ⁵)	506 (1.7x10 ⁴)	ombro	583 (5.6x10 ³)	640 (9.6x10 ²)	644	712	0.030	0.59± 0.05	0.71±0. 008	45.82 ±0.78
8	2.14	----	413 (5.8x10 ⁴)	509 (6.6x10 ³)	ombro	585 (2.8x10 ³)	638 (6.3x10 ²)	644	712	0.019	----	----	----
9	2.17	----	417 (3.6x10 ⁴)	512 (4.4x10 ⁴)	543 (2.1x10 ³)	596 (1.4x10 ³)	655 (5.3x10 ³)	650	709	0.0278	----	----	----
10	2.18	348 (1.4x10 ⁴)	375 (1.3x10 ⁴)	----	507 (3.3x10 ³)	----	751 (8.7x10 ³)	754	----	0.1375	----	----	----

2.5- Estudos preliminares de permeabilidade em membranas e cálculo de coeficientes de partição

A afinidade de um fármaco para a membrana celular condiciona todo o processo de absorção, biodistribuição, metabolização e excreção, pelo que é fundamental conseguirmos prevê-la. O processo de permeação consiste essencialmente na passagem de um meio extracelular aquoso (SW^o) para um meio hidrofóbico [lípidos membranares da monocamada externa (SM^o) e interna (SM^i)], e de seguida deste para um meio aquoso intracelular (SW^i).



Para simular este processo e conseqüentemente prever o comportamento *in vivo* de permeação de fármacos nas membranas celulares recorre-se a diversos modelos experimentais, sendo o coeficiente de partição octanol-água o mais utilizado. O 1-octanol simula os fosfolípidos membranares uma vez que possui uma cadeia alquílica longa e um grupo funcional com características de aceitador e dador de ligações de hidrogénio. Além disso, dissolve uma vasta gama de compostos orgânicos, permite determinações espectroscópicas sem interferências e a sua pressão de vapor baixa origina medidas reprodutíveis. Como fase aquosa, neste caso, foi utilizado tampão fosfato PBS (do inglês Phosphate saline buffer) com pH ajustado para 7.4, uma vez que o anel tetrapirrólico das porfirinas possui um carácter anfotérico e sabe-se que a protonação ou desprotonação destes grupos pode afetar o coeficiente de partição.⁵⁶ Este modelo possui diversas limitações como a incapacidade de simular a ação de proteínas, que funcionam como transportadores e recetores membranares e a dificuldade em adaptar o octanol para refletir membranas com diferentes composições.⁵⁷ No entanto, serve como uma primeira aproximação para obter dados sobre a anfifilicidade dos compostos.

O coeficiente de partição define-se pela razão entre a concentração na fase orgânica (C_o) e na fase aquosa (C_w). Existem na literatura dois métodos para a determinação de coeficientes de partição. O primeiro é essencialmente aplicado na determinação dos coeficientes de partição de analitos neutros e recorre à utilização de HPLC munido de uma coluna de fase reversa e utilizando como fase móvel a água.⁵⁸ O segundo, denominado por “*shake-flash method*”, consiste na agitação do soluto numa mistura de PBS e 1-octanol, seguindo-se a quantificação da concentração do composto nas duas fases por técnicas espectroscópicas UV-Vis ou de fluorescência, após construídas as curvas de calibração com os padrões apropriados.^{59,60} Neste trabalho foi utilizado o segundo método recorrendo à espectroscopia UV-Vis. Deste modo, o composto foi dissolvido num volume definido de octanol previamente saturado com PBS e em seguida, adicionou-se a este o mesmo volume de PBS saturado com octanol. Agitou-se a mistura vigorosamente e centrifugou-se. Após o tratamento necessário a cada uma das fases, descrito em pormenor no capítulo 4, efetuaram-se os respetivos espectros UV-Vis. De acordo com a lei de Beer-Lambert, a absorvância é diretamente proporcional

à concentração pelo que podemos aplicar a fórmula para o cálculo do LogP, com as alterações necessárias: $\log P_{OW} = \log(\text{Abs}_{n\text{-}oct}/\text{Abs}_{\text{PBS}})$, assumindo que o coeficiente de partição é igual nos dois meios. Na tabela 2.10, apresentam-se os valores do logaritmo da razão entre a concentração na fase orgânica e a concentração na fase aquosa para os compostos avaliados. Para a porfirina **2.6** não foi possível calcular o valor através desta metodologia, o que indica que esta possui $\text{LogP} > 4$ (entrada 1, tabela 2.10).

Tabela 2.10 - Valores de LogP dos compostos avaliados

Entrada	Composto	LogP
1	2.6	>4
2	2.14	0.94
3	2.17	1.15
4	2.18	1.02

Os resultados obtidos revelam que através do número de funcionalizações com grupos sulfonamida, conseguimos modelar significativamente a anfifilicidade das moléculas. As alterações no coeficiente de partição da porfirina tetrassubstituída (**2.14**) e dos seus derivados reduzidos (**2.17** e **2.18**) não são significativas, tal como seria de esperar, dado que as modificações na estrutura do composto são mínimas e não ocorrem em grupos que influenciam significativamente a anfifilicidade.

Em trabalhos anteriores do grupo, descreveu-se uma porfirina difluorada tetrasubstituída com a metanosulfonamida ligada ao anel fenílico pelo átomo de enxofre, com um $\text{LogP}=2.74$.⁶¹ A porfirina **2.14** sintetizada no âmbito do trabalho apresentado nesta dissertação que é constituída pela mesma sulfonamida, todavia, a ligação ao anel fenílico ocorre de modo inverso. Surpreendentemente, no nosso estudo o efeito da inversão referida provoca uma diminuição abrupta no coeficiente de partição ($\text{LogP}=0.94$), mesmo com a presença adicional de dois átomos de flúor em cada anel fenílico, que segundo dados da literatura deveriam aumentar a lipofilicidade.⁶² Esta alteração no LogP pode ser interpretada pela acidez relativa do grupo metilo diretamente ligado ao grupo sulfóxido no composto **2.14** (tal como observado pela alteração no desvio químico e integração do RMN em diferentes solventes) diferindo do descrito na literatura onde o metilo da sulfonamida está ligado ao átomo de azoto.⁶¹

Tendo em conta, as lacunas desta metodologia para prever a permeação membranar, surgiram estratégias alternativas, nomeadamente sistemas modelo de biomembranas como vesículas unilamelares ou multilamelares.⁵⁷

Com o intuito de quantificar a interação das porfirinas monossubstituída **2.6** e tetrassubstituída **2.14** com a membrana lipídica, começou-se por otimizar a estratégia experimental utilizando como modelo a porfirina **2.6**. Deste modo, realizou-se uma titulação desta com uma vesícula unilamelar de um lípido bastante comum, o POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina). Assim, um volume definido de uma solução previamente preparada de porfirina de modo a obter uma concentração final de 200 nM e 0.5 % (v/v) de metanol, foi adicionado a uma concentração crescente de lípido, tal como demonstrado na figura 2.24.

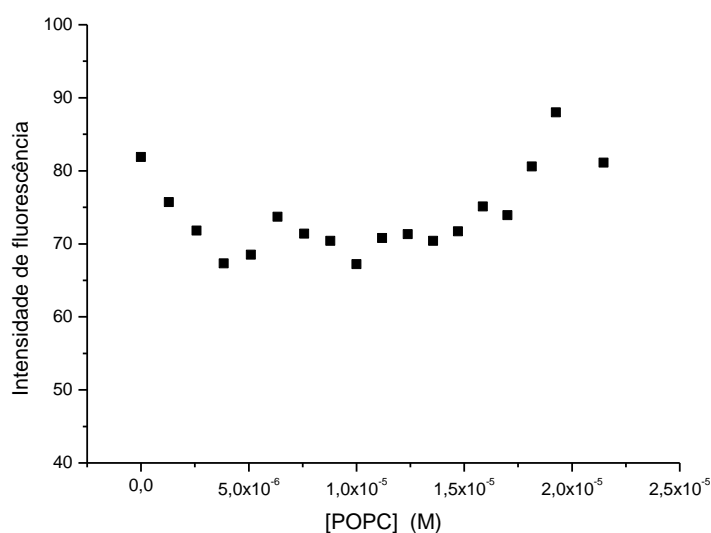


Figura 2.24- Dependência da intensidade de fluorescência com a concentração de POPC da porfirina **2.6**

Verificámos que a intensidade de fluorescência não apresenta uma variação monotónica com a concentração de lípido indicando que vários processos ocorrem simultaneamente. Por este motivo, não conseguimos calcular o valor do coeficiente de partição com recurso a esta estratégia.

Por fim, testamos uma metodologia que consistiu em avaliar a associação da porfirina com a membrana através da supressão de fluorescência do NBD-DMPE, uma sonda fluorescente previamente associada à bicamada lipídica. Deste modo, foram preparadas novas vesículas lipídicas unilamelares (LUVs), de acordo com o procedimento descrito no capítulo experimental (capítulo 4), contendo os lípidos pretendidos e o NBD a uma concentração molar de 1%. A diminuição de fluorescência referida deve-se à transferência de energia não radiativa do NBD-DMPE para a porfirina, quando ambas as moléculas estão associadas com a bicamada lipídica, tal como se pode

observar pela sobreposição do espectro de fluorescência do NBD-DMPE e o espectro de absorção da porfirina **2.6**, Figura 2.25.

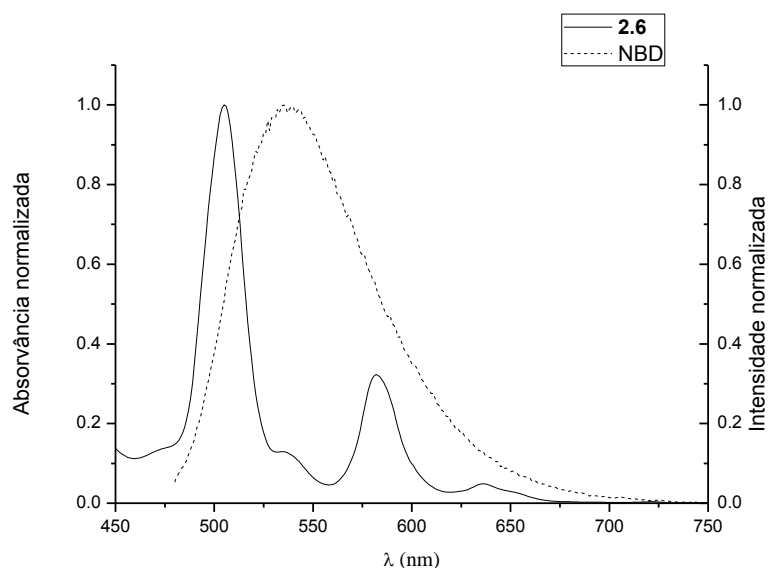


Figura 2.25 - Sobreposição entre a emissão de fluorescência do NBD-DMPE em bicamadas de POPC e a absorção da porfirina em metanol.

A supressão de fluorescência resultante (IF/IF_0) e a eficiência de transferência de energia (EET) são representados no gráfico 2.26, tendo como exemplo uma titulação da porfirina numa concentração de $100\mu\text{M}$. Para pequenas concentrações de lípidos a concentração local de porfirina na bicamada lipídica é elevada conduzindo a um quenching eficiente da fluorescência do NBD-DMPE. Com o aumento da concentração de lípido, a quantidade de porfirina que particiona na bicamada lipídica aumenta até que toda a porfirina se associa com a membrana. No entanto, este aumento não é proporcional ao aumento da concentração lipídica provocando uma redução na concentração local de porfirina e, por conseguinte, uma supressão de fluorescência menos eficiente.

Este estudo foi realizado para concentrações de porfirina de 100, 200 e $400\mu\text{M}$. Verificou-se que a supressão da fluorescência é mais eficiente para as concentrações mais elevadas de porfirina. No entanto, esta não varia proporcionalmente.

A dependência observada na eficiência da transferência de energia (EET) com a concentração do lípido foi analisada com uma aproximação analítica para a transferência de energia em duas dimensões, assumindo que ao fim de 10 min de incubação a porfirina **2.6** se encontra equilibrada com a fase lipídica.⁶³ A distância Förster (R_0) calculada para o par dador / aceitante NBD-DMPE / porfirina é de 47 \AA assumindo orientação aleatória dos dipolos de transição, um rendimento quântico de fluorescência de NBD-DMPE igual a $0,4$ ⁶⁴ e o a absorvidade molar da porfirina cujo valor se encontra na tabela 2.9. Para calcular a eficiência de transferência de energia é

também preciso conhecer a distância de aproximação (R_e) entre o doador (NBD) e o aceitante (porfirina). Esse parâmetro foi estimado a partir de seu volume molar⁶⁵ assumindo uma geometria esférica e é cerca de 8 Å. Deste modo, selecionou-se a solução analítica para a transferência de energia em duas dimensões correspondentes a R_e igual a $0,25 R_0$ (≈ 6 Å) para analisar os resultados.

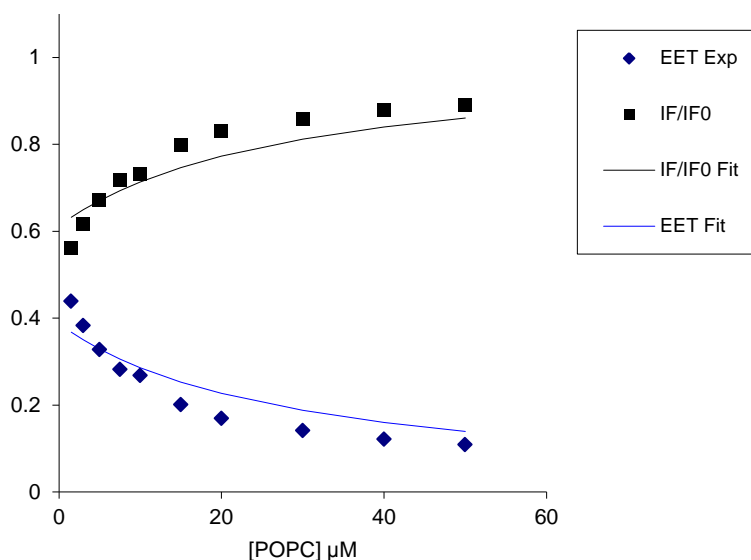


Figura 2.26 - Representação da supressão de fluorescência resultante da titulação de diferentes concentrações de LUVs de POPC com a porfirina **2.6** (IF/ IF0) e da eficiência de transferência de energia (EET), em tampão HEPES a 25 ° C.

O coeficiente de partição foi calculado recorrendo a LUVs com duas composições distintas, um deles constituído por POPC de modo a mimetizar uma membrana celular eucariota e outro constituído por POPC:POPE:POPS 5: 4: 1 para simular uma membrana bacteriana. Assim obteve-se um coeficiente de partição entre as fases aquosas e bicamadas de POPC de $4,5 \pm 1,2 \times 10^5$. Este parâmetro é ligeiramente maior do que o obtido para hematoporfirina ($1,4 \times 10^5$)⁶⁶ devido à maior hidrofobicidade da porfirina analisada relacionada com a presença de três grupos benzeno perfluorinados.

A associação com bicamadas lipídicas típicas de células bacterianas foi ligeiramente menor $9,1 \pm 2,4 \times 10^4$ do que a observada para as membranas de POPC, verificando-se que o composto não apresenta seletividade para estas. Apesar disso, a partição continua a ocorrer de forma eficiente, dada a elevada constante de partição apresentada. Estes valores são resultantes da média de seis medições distintas. Estes coeficientes de partição apresentam erros na ordem dos 16 e 27%, sendo necessário um maior número de medições para obter um valor mais rigoroso.

Dado que a estratégia desenvolvida se mostrou eficiente, procedemos também à sua aplicação para a porfirina 2.14. Nesta, obteve-se um valor de coeficiente de partição para as membranas de POPC de $3,4 \pm 2,3 \times 10^5$. Este resulta apenas da média de três medições, sendo por isso, o erro elevado e os estudos apelidados de preliminares.

Em relação à utilização do modelo do cálculo do coeficiente de partição octanol-água corroborámos as lacunas referidas anteriormente, uma vez que obtivemos valores discrepantes entre as duas metodologias. Deste modo, podemos concluir que o coeficiente de partição octanol-água é importante para obter dados sobre a anfifilicidade dos compostos, no entanto, para avaliar a sua partição membranar outras metodologias são necessárias.

Em suma, verificou-se que o número de derivatizações com grupos metanosulfonamida é crucial para modular a anfifilicidade dos compostos, sendo que estes apresentam variações significativas nos seus coeficientes de partição octanol-água ($0,94 \leq \text{LogP} \leq 4$). Apesar disso, conseguimos garantir a elevada afinidade para as membranas lipídicas, obtendo assim um conjunto de compostos com múltiplas potencialidades tanto a nível de aplicações como a nível de vias de administração.

2.6- Estudos de citotoxicidade preliminares

A ausência de toxicidade em células saudáveis nas concentrações passíveis de serem aplicadas *in vivo*, é um dos principais requisitos para um potencial fármaco. Se este se tratar de um fotossensibilizador necessita também de possuir esta característica quando sujeito a irradiação. No âmbito deste trabalho, realizaram-se estudos preliminares de citotoxicidade no escuro. A porfirina escolhida para iniciar estes estudos foi a 5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina **2.6**.

Em primeiro lugar é essencial averiguar se o composto pode ser dissolvido em meio de cultura com uma pequena adição de DMSO (máximo de 3%) ou se necessita do auxílio de uma formulação para ser adicionado às células. Com este objetivo, realizaram-se espectros de absorção do composto em DMSO e numa solução de 1 % DMSO em meio de cultura (DMEM). Verificou-se que em ambos ocorre alguma agregação, no entanto, o espectro continua a apresentar uma banda Q intensa, concluindo-se, que se pode prosseguir utilizando a mistura de solventes referida.

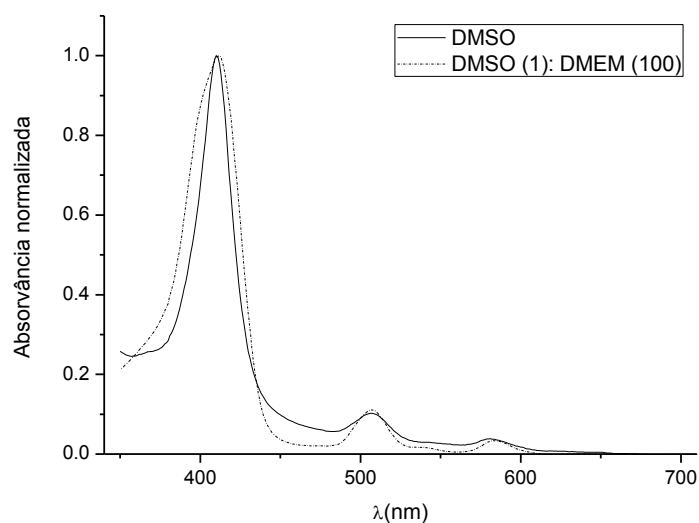


Figura 2.27 – Espectros de absorção da porfirina **2.6** em DMSO e na mistura de 1% DMSO com meio de cultura (DMEM)

Selecionou-se a linha celular de fibroblastos 3T3 para realizar os estudos. Começou-se por otimizar o número de células por poço, plaqueando diversas concentrações de células. Para as placas de 96 poços utilizadas nos estudos de citotoxicidade foram testadas uma gama de concentrações, entre 3.000 e 9.000 células por poço (200µL de meio). Ao fim de 24 e 48 horas observou-se com recurso ao microscópio ótico a confluência de cada poço. Baseado nesta observação, elegeu-se a concentração de 7.000 células por poço (2mL e 200µL de meio), para realizar os referidos estudos.

Para determinar a toxicidade no escuro, as células foram incubadas com diferentes concentrações do potencial fármaco: 1.25µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40µM, 60 µM e 80 µM. Células controlo, sem adição de composto, são incubadas nas mesmas condições. Passado 24 horas, removeu-se a porfirina e lavaram-se as células com PBS. Neste ponto, a uma das placas coloca-se novo meio, uma vez, que só será avaliada após 48 horas e na outra procede-se à avaliação da viabilidade recorrendo ao método Alamar Blue. Neste o metabolismo das células vivas converte a resazurina (componente ativo do Alamar Blue) em resofurina. Este fenómeno é facilmente visível devido à ocorrência de uma alteração de cor, tal como se retrata na figura 2.28.

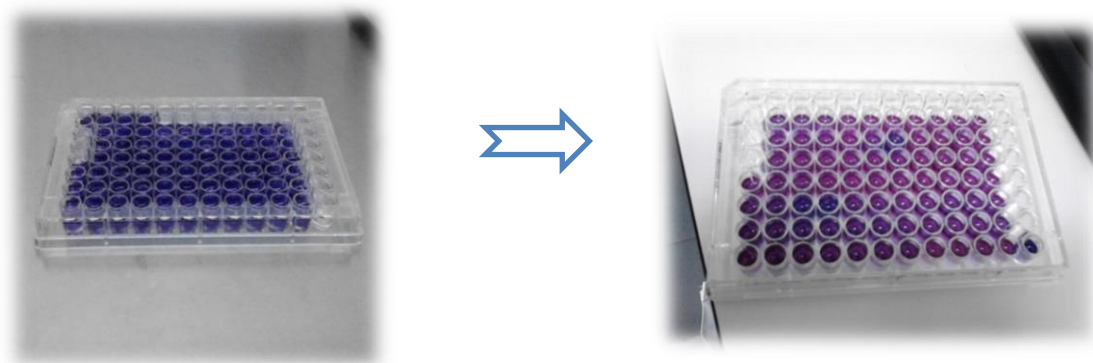


Figura 2.28 – Metabolização da resazurina pelas células vivas

Por fim, procede-se à medição da absorvância nos comprimentos de onda de 540 e 630 nm. A diferença percentual entre as células de controlo e as células tratadas com fármaco é calculada através da equação, onde ϵ corresponde ao coeficiente de absorvidade molar do Alamar Blue oxidado nos comprimentos de onda especificados (ϵ 570nm=80586 e ϵ 630nm=34798).

$$\%Viabilidade = \frac{(\epsilon_{630} \times Abs_{amostra570}) - (\epsilon_{540} \times Abs_{amostra630})}{(\epsilon_{630} \times Abs_{ref570}) - (\epsilon_{540} \times Abs_{ref630})}$$

Ao fim de 48 horas, a segunda placa foi avaliada seguindo o mesmo procedimento. Estes estudos foram realizados três vezes utilizando sempre um triplicado de poços por concentração de composto. A análise dos resultados encontra-se em registo gráfico na figura 2.29. As pequenas flutuações apresentadas devem-se à variabilidade característica deste tipo de ensaios.

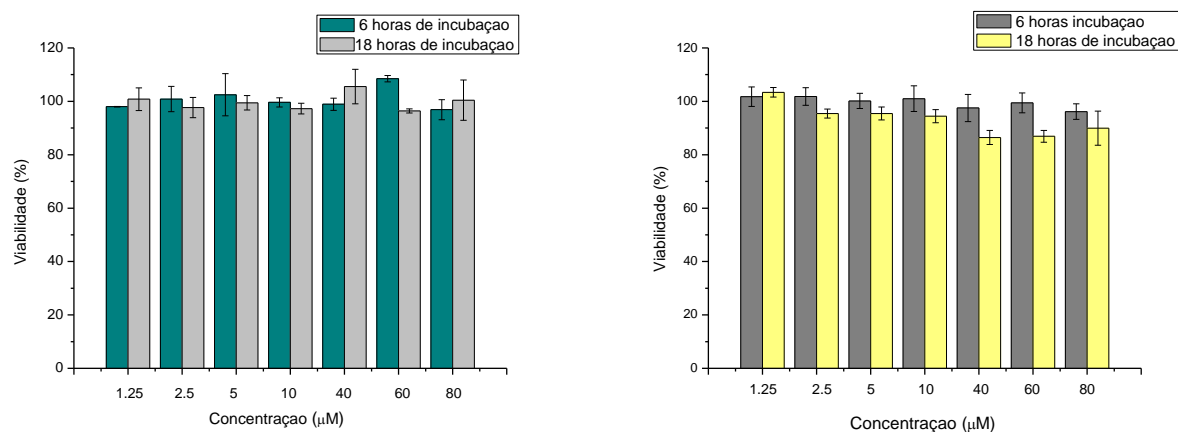


Figura 2.29 - Estudos de citotoxicidade no escuro da porfirina 2.6. Esquerda- Avaliação após 24 horas
Direita-Avaliação após 48 horas

Verifica-se que a diferença entre a incubação do composto ser de 6 ou 18 horas é pouco significativa na avaliação às 24 horas. Na avaliação às 48 horas este efeito é realçado, sendo que a viabilidade das células incubadas

durante 18 horas com o potencial fármaco é 6.17 a 21.87 pontos percentuais inferior, dependendo-se que a morte celular ocorre de forma lenta. Corroborando estes dados, identificaram-se corpos apoptóticos na observação microscópica (Figura 2.30)

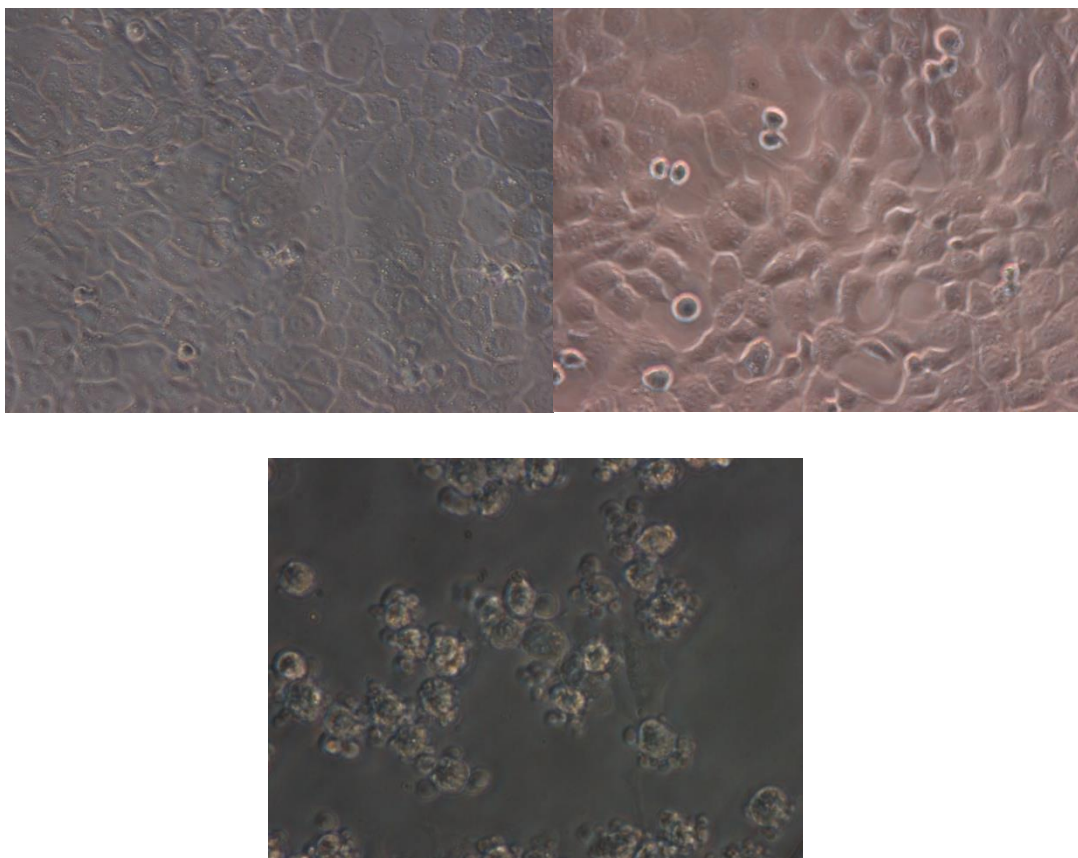


Figura 2.30- A- Células controlo (20x) B- Células controlo em divisão (40x) C- Corpos apoptóticos (100µM, 40x)

Os resultados *in vitro* com células da linha 3T3 demonstraram assim, que o composto não é tóxico na gama de concentrações utilizada no estudo.

2.7-Conclusão

O objetivo central deste capítulo consistiu na síntese de moléculas bimodais que incorporam na sua estrutura sulfonamidas e macrociclos tetrapirrólicos com o fim de obter compostos com propriedades inovadoras que possam simultaneamente atuar como antibacterianos e como fotossensibilizadores para inativação de bactérias, recorrendo à terapia fotodinâmica (PDT). Para este efeito selecionou-se a 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (TPFPP) (**2.3**) por constituir um excelente modelo para obtenção de novos derivados porfirínicos e por influência de resultados obtidos anteriormente no grupo. De seguida, foram apresentados estudos de otimização da sua derivatização com a metanosulfonamida. Em suma, pode obter-se o composto monossustituído como produto maioritário realizando a reação com uma concentração de 5.1×10^{-3}

M e um excesso de sulfonamida de 6 equivalentes (Método A) e o produto tetrassubstituído utilizando um excesso de 18 equivalentes e a concentração de 1.54×10^{-2} M (Método B).

Utilizando as condições otimizadas alargaram-se os estudos para a síntese de porfirinas monossubstituídas contendo as sulfonamidas: *p*-toluenosulfonamida (**2.1**) e *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**) e para a síntese de uma porfirina tetrasubstituída contendo a *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**), com o intuito de avaliar o efeito da estrutura da sulfonamida na reatividade. Através destas reações obteve-se a família completa referente à sulfonamida *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida (**2.2**), ou seja, os compostos mono, di, tri e tetrassubstituídos e os compostos mono e dissustituídos no caso da *p*-toluenosulfonamida (**2.1**). Os rendimentos obtidos foram baixos dada a baixa nucleofilicidade apresentada pelas sulfonamidas em questão.

Uma metodologia alternativa de inserção de sulfonamidas nas posições β -pirrólicos foi também testada mas sem sucesso.

No sentido de desviar os valores de absorção para a designada “janela terapêutica”, selecionou-se de entre as porfirinas sintetizadas, a **2.14** para prosseguir com os estudos de redução. A clorina foi sintetizada com rendimentos elevados (65%), recorrendo ao uso de hidrazina hidratada, um método que segundo o nosso conhecimento nunca tinha sido aplicado na redução de macrociclos tetrapirrólicos. A bacterioclorina foi obtida com recurso ao método sem solvente anteriormente descrito pelo grupo, com um rendimento de 70%.

Os compostos foram caracterizados fotofísicamente, tendo revelado possuir características bastante promissoras para aplicação como fotossensibilizador, tais como, baixos rendimentos quânticos de fluorescência e rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto adequados.

Para avaliar a lipofilicidade e a interação com a membrana lipídica procedeu-se ao cálculo do coeficiente de partição das porfirinas mono (**2.6**) e tetrassubstituídas (**2.14**) através de duas metodologias, uma delas recorrendo à mistura octanol-água e a outra a vesículas unilamelares lipídicas (LUVs). Estes estudos revelaram que apesar da anfifilicidade destas variar consideravelmente, (de $\text{LogP} > 4$ no caso da **2.6** para $\text{LogP} = 0.94$ na **2.14**) a sua afinidade para a membrana continua a ser da mesma ordem de grandeza (10^5). Comparou-se também a afinidade membranar entre LUVs com composição semelhante à membrana bacteriana e LUVs com composição semelhante às membranas eucarióticas humanas, revelando-se que não ocorria nenhum tipo de seletividade.

Por fim, realizaram-se estudos preliminares de citotoxicidade no escuro, com a linha celular 3T3, demonstrando-se que o composto não apresenta toxicidade.

É relevante realçar que a porfirina tetrassubstituída (2.14) apresenta um comportamento surpreendente, dado que os prótons do seu grupo metilo não são detetados no RMN e a sua solubilidade é substancialmente diferente da apresentada pelos seus derivados reduzidos. Contudo, este facto não se reflete nos respetivos coeficientes de partição octanol-água. A compilação de resultados díspares obtidos para esta porfirina deixa em aberto a necessidade de estudos adicionais que permitam a sua compreensão.

Em suma, os estudos efetuados no decorrer do trabalho que conduziu à escrita desta dissertação, permitiram otimizar métodos de síntese e purificação de sulfonamidas derivadas da pentafluorofenilporfirina com coeficientes de partição octanol/água facilmente modeláveis por alteração do número de substituições. Além disso, as propriedades fotofísicas e os resultados preliminares obtidos com modelos membranares e nos estudos *in vitro* são bons indicadores da sua potencial aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

Referências

- ¹Stuart B.Levy, *Advanced drug delivery reviews*, **2005**, 57, 1446-1450.
- ²Patrick G.L., *An introduction to medical chemistry*, 5 ed., Oxford, **2012**, 413-419.
- ³Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L., *Goodman&Guilman's: As bases farmacológicas da terapêutica*, 10 ed., McGraw-Hill: Rio de Janeiro, **2005**, 877-881.
- ⁴Silva E.F.F., Serpa C., Dabrowski J.M., Monteiro C.J.P., Formosinho S.J., Stochel G., Urbanska K., Simoes S., Pereira M.M., Arnaut L.G., *Chem. Eur.*, **2010**, 16, 9273 – 9286.
- ⁵Arnaud L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem Eur. J.*, **2014**, 20, 5346-5359.
- ⁶Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2009**, 6, 170-188.
- ⁷Tavares A., Carvalho C.M.B., Faustino M.A., Neves M. G. P. M. S., Tomé J. P.C., Tomé A. C., Cavaleiro J.A.S., Cunha Â., Gomes N.C.M., Alves E., Almeida A., *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 91-105.
- ⁸Chantarasriwong O., Jang D. O., Chavasiri W., *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47, 7489–7492.
- ⁹Greenfield A., Grosanu C., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 820-823.
- ¹⁰Rang H.P., Dale M.M, Ritter J.M, P.K Moore, *Farmacologia*, 5 ed., Elsevier, 724-725.
- ¹¹S.L.Dax, *Antibacterial Chemotherapeutic Agents*: Chapman& Hall, **1997**, 48-54.
- ¹²Buchbauer G., Pernold W., Ittner M.,; Ahmadi M.T., Dobner R., Reidinger R., *Monatshefte fur Chemie*, **1985**, 116, 1209-1220.
- ¹³Tang X., Huang L., Qi C., Wu, X. Wu W., Jiang H., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 6102-6104.
- ¹⁴Kadish K.M., Araullo-McAdams C., Han B.C., Franzen M.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8364-8368.
- ¹⁵Costa J.I.T., Tomé A.C., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2011**, 15, 1116–1133.
- ¹⁶Turro N. J., *In Modern Molecular Photochemistry*; University Science Books: Sausalito, CA, **1991**, 191-195.
- ¹⁷Rocha Gonsalves A.M., Varejão J. M.T.B., Pereira M.M., *J. Heterocyclic Chem*, **1991**, 28, 635-640.
- ¹⁸Silva M., Fernandes A., Bebiano S.S., Calvete M. J. F., Ribeiro M. F., Burrows H. D., Pereira M. M., *Chem Commun (Camb)*, **2014**, 50, 6571-6573.
- ¹⁹Monteiro C., *Design, Síntese e estudos fotofísicos de novos corantes para células solares*, tese de doutoramento, Coimbra, **2012**, 43.
- ²⁰Giraudeau A., Callot H.J., Jordan J., Ezhar I., Gross M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 3857-3862.

- ²¹Hombrecher H.K., Gherdan V.M., Ohm S., Cavaleiro J.A.S., Neves M., Condesso M.D., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 8569-8578.
- ²²V.I.V. Serra, Pires S.M.G., Alonso C.M.A., Tomé A.C., Cavaleiro J.A.S., *Top Heterocycl. Chem.*, **2014**, 33, 35–78.
- ²³Nicholas A. Meanwell, *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 2529–2591.
- ²⁴Catalano M.M., Crossley M.J., Harding M.M., King L.C., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1984**, 1535-1536.
- ²⁵Vicente M.G.H., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., Hombrecher H.K., Koll D., *Tetrahedron Lett*, 1996, 37, 261.
- ²⁶Králová J., Briza T., Moserová I., Dolensky B., Vasek P., Poucková P., Kejik Z., Kaplánek R., Martásek P., Dvorák M., Král V., *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 5964-5973.
- ²⁷Samaroo D., Soll C.E., Todaro L.J., Drain C.M., *Org. Lett.*, **2006**, 8, 4985-4988.
- ²⁸Samaroo D., Vinodu M., Chen X., Drain C.M., *J. Comb. Chem.*, **2007**, 9, 998-1011.
- ²⁹Kvícala J., Benes M., Paleta O., Král V., *J. Fluorine Chem.*, **2010**, 131, 1327-1337.
- ³⁰Pedrosa L.F., Souza M.C., Faustino M.A.F., Neves M.G.P.M.S., Silva A.M.S., Tomé A.C., Ferreira V.F., Cavaleiro J.A.S., *Aust. J. Chem.*, **2011**, 64, 939-944.
- ³¹Henriques C.A, Pinto S.M.A, Aquino G.L.B, Pineiro M., Calvete M.J.F, Pereira, M.M., *ChemSusChem*, **2014**, 7, 10, 2821-2824.
- ³²Lamani M., Ravikumara G.S., K.R. Prabhu, *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, 354, 1437 – 1442.
- ³³Pereira M.M., Arnaut L.G., Formosinho S.J., Monteiro C.J.P., Universidade de Coimbra, French patent n° 0412149, **2004**.
- ³⁴Pereira 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, 1666-1672.
- ³⁵Whitlock Jr H.W., Hanauer R., Oester M.Y., Bower B.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 7485-7489.
- ³⁶Platt P.R., *J. Chem. Phys.*, **1950**, 18, 1168-1173.
- ³⁷Gouterman M., *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138-163.
- ³⁸Gouterman M., *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 1139-1161.
- ³⁹Minaev B., Wang Y.-H., Wang C.-K., Luo Y., Agren H., *Spectrochim. Acta Part A*, **2006**, 65, 308-323.
- ⁴⁰Stern A., Wenderlein H., *Phys. Chem.*, **1936**, 176A, 81-124.
- ⁴¹Socoteanu R., Boscencu R., Nacea V., Oliveira A.S., Ferreira L.F., *Rev. Chim.*, 2008, 59, 969-972.

- ⁴²Arnaut L.G., *Advances in Inorganic Chemistry: Inorganic Photochemistry*, ed. R. S. G. VanEldik, **2011**, 63, 187–233.
- ⁴³Valeur B., “*Molecular Fluorescence-Principles and Applications*”, Wiley-VCH, Germany, **2001**.
- ⁴⁴Higgins H.C.L., Rector C.W., Platt J.R., *J. Chem. Phys.*, **1950**, 18, 1174-1181.
- ⁴⁵Kasha M., *Disc. Faraday Soc.*, **1950**, 9, 14-19.
- ⁴⁶Gensch T., Viappiani C., *Photochem. Photobiol.Sci.*, **2003**, 2, 699-721.
- ⁴⁷Taniguchi M., Cramer D.L., Bhise A.D., Kee H.L., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., *New J. Chem.*, **2008**, 32, 947–958.
- ⁴⁸Parker C. A., Rees W. T. *Analyst.*, **1960**, 1013, 587-600.
- ⁴⁹Murov S.L., Carmichel I., Hug G.L. *Handbook of Photochemistry*: Dekker, USA, **1993**.
- ⁵⁰Pinto S., *Estudos de transferência de energia entre um polieletrólito e porfirinas hidrofílicas em sistemas self-assembly*, Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, **2008**.
- ⁵¹Lipstman S., Muniappan S., George S., Goldberg I., *Dalton Trans.*, **2007**, 30, 3273-3281.
- ⁵²Giguère J.B., Morin J.F., *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 1047-1051.
- ⁵³Tanielian C., C. Wolff, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 9825–9830.
- ⁵⁴Schmidt R., Tanielian C., Dunsbach R., Wolff C., *J.Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1994**, 79, 11-17.
- ⁵⁵Azenha E. G., Serra A. C., Pineiro M., Pereira M.M., de Melo J.S., Arnaut L.G., Formosinho S.J., Gonsalves A., *Chem. Phys.*, **2002**, 280, 177-190.
- ⁵⁶Cunderlíková B., Kaalhaus O., Cunderlík R., Mateásik A., Moan J., Kongshaug M., *Photochem. Photobiol.*, **2004**, 79 , 242-247.
- ⁵⁷Ribeiro M.M.B., *Trends in Pharmacological Science*, **2010**, 31, 449–454.
- ⁵⁸Péhourcq F., Thomas J., Jarry C., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2000**, 23, 443-453.
- ⁵⁹Collander R., *Acta Chem. Scand.*, **1951**, 5, 774-780.
- ⁶⁰Hansch C., Fujita T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1616-1626.
- ⁶¹Gonçalves N., *Metilação de porfirinas para marcação com carbono-11 e potencial aplicação em imagiologia PET*, Dissertação de mestrado, Universidade de Coimbra, **2010**.
- ⁶²Bruce E. Smart, *Organofluorine Chemistry*, Springer US, **1994**, 57-88.
- ⁶³Wolber P.K., Hudson B.S., *Biophys. J.*, **1979**, 28, 197-210.
- ⁶⁴Brown R. S., Brennan J.D., Krull U.J., *J. Chem. Phys.*, **1994**, 100, 6019-6027.
- ⁶⁵Edward J. T., *J. Chem. Edu.*, **1970**, 47, 261-270.
- ⁶⁶Santos A., Rodrigues A. M., Sobral A., Monsanto P. V., Vaz W. L. C., Moreno M., J. *Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85, 1409-1417.

Capítulo 3

Sistemas supramoleculares via self-assembly de sulfonamido-porfirinos de zinco (II) cationizados

A eficiência de um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica antibacteriana é dependente de diversos fatores, destacando-se a permeação da membrana destes microorganismos. Encontra-se descrito a existência de uma diferença significativa na capacidade dos PSs permearem as bactérias do tipo Gram-positivo e Gram-negativo, devido às diferenças estruturais que estas apresentam. Assim, nas bactérias do tipo Gram-positivo, a parede celular não atua como uma barreira à permeabilidade para a maioria dos PSs comumente utilizados. Pelo contrário, as bactérias Gram-negativas externamente à rede formada pelo peptidoglicano possuem um elemento estrutural denso com composição heterogênea, formando uma barreira de permeabilidade efetiva, restringindo a permeação da maioria dos PSs.¹ Com intuito de possibilitar a inativação fotodinâmica de bactérias pertencentes a ambas as classes, surge como estratégia principal, a utilização de uma molécula fotossensibilizadora com uma ou mais cargas positivas intrínsecas, habitualmente geradas por átomos de azoto quaternários.²

Neste capítulo descreve-se uma nova metodologia de preparação de moléculas que possuem na sua estrutura porfirinas catiónicas, descritas na inativação de bactérias e uma sulfonamida com atividade bacteriostática comprovada, a sulfadiazina. Esta recorre à formação espontânea de estruturas organizadas por meio de um processo estocástico reversível que envolve componentes pré-existentes, baseando-se no conceito de *self-assembly*³ introduzido por Lehn⁴ em 1978. Um dos melhores exemplos de *self-assembly* ocorre na Natureza, na dupla hélice de ADN. Neste, as duas cadeias simples são mantidas através de pontes de hidrogénio, envolvendo átomos de hidrogénio (doadores) e átomos de oxigénio e azoto (aceitantes) das bases de purina e de pirimidina.⁵ Este conceito já se encontra introduzido no âmbito da química medicinal,^{6,7,8} nomeadamente na área do drug-delivery.⁹

3.1 Síntese de porfirinas catiónicas

O trabalho apresentado neste capítulo iniciou-se com a síntese das porfirinas que irão servir como base para os restantes estudos.

A 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina **3.1** foi sintetizada com recurso a três métodos distintos: o método do nitrobenzeno¹⁰, a sua otimização recente recorrendo à presença de NaY¹¹ e o método recorrendo à síntese por micro-ondas utilizando como solvente a água.¹² Os dois primeiros

encontram-se descritos no capítulo 2, pelo que apenas me vou centrar no último. A um copo reacional de 10 mL foi adicionado o 4-piridinacarboxaldeído, o pirrol e a água. Este foi colocado no ultra-sons, de forma a garantir a completa dissolução do aldeído. De seguida, a mistura foi sujeita a radiação micro-ondas por 10 minutos, usando um programa dinâmico com temperatura de 200°C e potência máxima de 300W. Após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, o crude foi purificado por extração por solventes, usando como fase aquosa uma solução saturada de bicarbonato de sódio e como fase orgânica o diclorometano, seguido de secagem e cromatografia usando como eluente diclorometano/metanol (19:1). Por último realizou-se ainda uma recristalização utilizando diclorometano e hexano. Os mesmo métodos, excepto o do nitrobenzeno convencional, foram aplicados para a síntese da 5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirina **3.2**. Os respetivos rendimentos encontram-se descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Métodos de síntese das porfirinas 2.19 e 2.20 e respetivos rendimentos

Entrada	Porfirina	Método do nitrobenzeno	Método do NaY	Método água e micro-ondas
1	3.1	14.6%	9%	13 %
2	3.2	-----	8%	12%

Pela análise dos dados referentes à porfirina **2.19** (tabela 3.1, entrada 1), podemos observar que contrariamente ao descrito até ao momento, o rendimento não duplica empregando o método do NaY. Pensa-se que este efeito será devido à coordenação entre os núcleos ácidos do NaY e o reagente de partida que contem azotos conjugados no anel, uma vez que, por exemplo, é sabido que o NaY é um ácido de Lewis cuja acidez é calculada pela relação de adsorção de piridina aos seus centros.^{13,14} Desta forma pode-se afirmar que a coordenação/adsorção dos aldeídos contendo azotos aromáticos com o NaY reduz a sua reatividade.

A síntese assistida por micro-ondas usando como solvente a água, apresenta-se como um método bastante mais sustentável e rápido, contudo, no caso das porfirinas apresentadas não contribuiu para o aumento dos seus rendimentos de síntese.

Uma das estratégias para a obtenção de estruturas supramoleculares porfirínicas implica a coordenação de determinado substrato ao ião metálico presente no centro do macrociclo. Encontra-se patente em diversos artigos, que o ião metálico proporciona especificidade para o átomo coordenante. Deste modo, sabe-se que complexos de estanho (IV) de porfirinas coordenam preferencialmente com grupos carboxilatos ou com grupos fenolato enquanto as porfirinas complexadas com zinco (II) coordenam preferencialmente com compostos com átomos de azoto na sua constituição.^{15,16,17,18} Adicionalmente, estudos reportam que a presença de zinco em porfirinas aumenta as interações com a membrana bem como promovem um cruzamento intersistemas mais eficiente, conduzindo a um

aumento da eficiência da terapia fotodinâmica.¹⁹ Deste modo, prosseguiu-se com a metalação de ambas as porfirinas. Assim, numa experiência tipo dissolveu-se a porfirina em clorofórmio e aqueceu-se a mistura até 50 °C. O acetato de zinco previamente dissolvido em metanol foi adicionado, permanecendo a mistura sob aquecimento e agitação magnética até que, por UV-visível se observou a transformação das 4 bandas Q características em duas bandas Q, típicas dos compostos metálicos (figura 3.1). Após terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e o solvente foi removido sob vácuo. Redissolveu-se o sólido em diclorometano e realizou-se extração por solventes usando como fase orgânica o solvente referido e como fase aquosa uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água destilada, sucessivamente. De seguida, esta foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente posteriormente eliminado no evaporador rotativo. Verificou-se por RMN e TLC que não havia contaminação com a porfirina de partida. Os rendimentos obtidos foram de 80% para 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirinato de zinco(II) **3.3** e 92% para o 5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.4**.

No capítulo 2, abordei os espectros de porfirinas de base livre. Recapitulando, o espectro típico apresenta uma banda B, ou Soret e quatro bandas Q. Contrariamente, os complexos metálicos de porfirinas apresentam apenas uma banda B e duas Q, uma vez que a introdução do metal na porfirina altera a simetria do anel, passando de D_{2h} para D_{4h} (figura 3.1). Esta mudança de simetria tem implicações diretas na degeneração das orbitais HOMO e LUMO envolvidas nas transições eletrónicas que originam as bandas do espectro de absorção destes compostos.²⁰

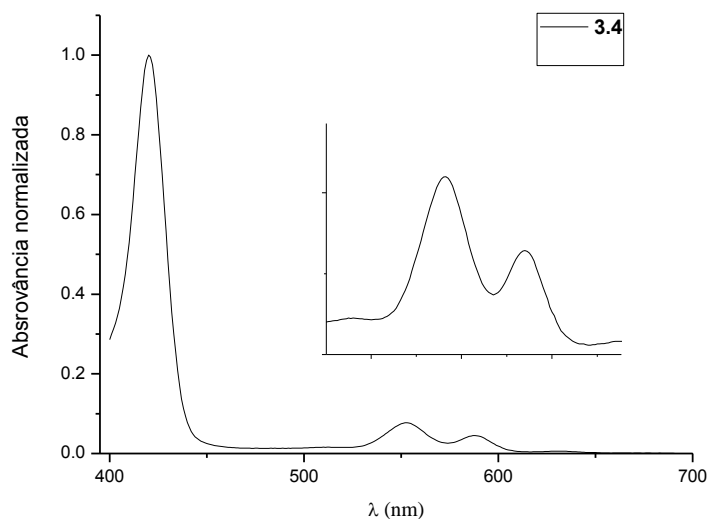


Figura 3.1- Espectro Uv visível do complexo metálico **3.4**

Aliando o objetivo de obter um fotossensibilizador com eficiência em ambos os tipos de bactérias com o interesse em compostos biocompatíveis, procedeu-se à cationização de ambas as

porfirinas anteriormente metaladas (**3.3** e **3.4**). Deste modo, dissolveu-se a porfirina em DMF e adicionou-se 0.1 mL de iodometano. A mistura foi aquecida e deixada em agitação a 25 °C. Procedeu-se ao longo do dia à adição de pequenas porções de iodometano até atingir um máximo de 300 equivalentes. No dia seguinte terminou-se a reação e adicionou-se éter dietílico para precipitar o composto. Por fim, filtrou-se. Obtiveram-se os compostos iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco(II) **3.5** e iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.6** com rendimentos de 90% e 92 %. A tetracationização foi confirmada por RMN de próton, encontrando-se estes dados descritos na secção experimental (capítulo 4).

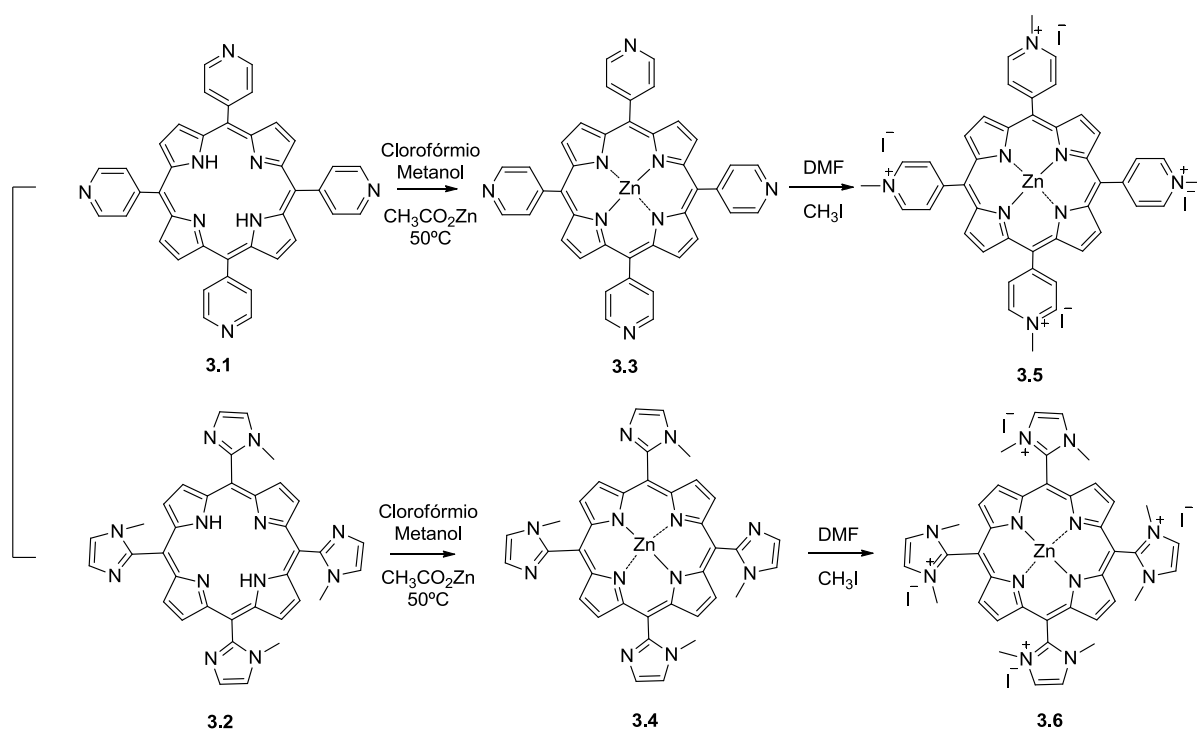


Figura 3.2- Metodologia sintética seguida na preparação das porfirinas catiónicas

3.2- Sulfonamida

Neste capítulo, a nossa estratégia consistiu na utilização de uma sulfonamida com efeito antibacteriano comprovado ao invés de sulfonamidas sintetizadas previamente, tal como referido no capítulo anterior. Na tabela 3.2 apresentam-se alguns exemplos selecionados de sulfonamidas comumente utilizadas na prática clínica. Para os objetivos pretendidos interessava-nos uma sulfonamida que não fosse pró-fármaco, de modo, a que a estrutura desta não sofresse alterações *in vivo* e consequentemente, a probabilidade das ligações se manterem fosse maior. Adicionalmente deveria possuir vários átomos de azoto na sua estrutura que pudessem coordenar com o zinco. De

entre as sulfonamidas com as características apropriadas aos estudos que pretendíamos seguir, seleccionámos a Sulfadiazina por questões económicas.

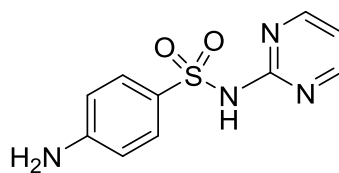


Figura 3.3- Estrutura da Sulfadiazina

3.3- Self-assembly

Para efetuar o estudo da capacidade dos complexos de zinco (II) estabelecerem ligações via self-assembly com a sulfonamida, utilizou-se como modelo o iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco(II) **3.5**. Para este efeito preparou-se uma solução da porfirina em PBS, com uma concentração de $8 \times 10^{-5} \text{M}$ e efetuou-se uma titulação com uma solução da sulfadiazina numa concentração de 0.33 M em PBS, com a adição da mínima quantidade de NaOH necessária para promover a dissolução desta (atingindo esta solução um pH de 11). Adquiriram-se os respetivos espectros de absorção de UV/Vis entre cada adição. Estes encontram-se representados na Figura 3.4.

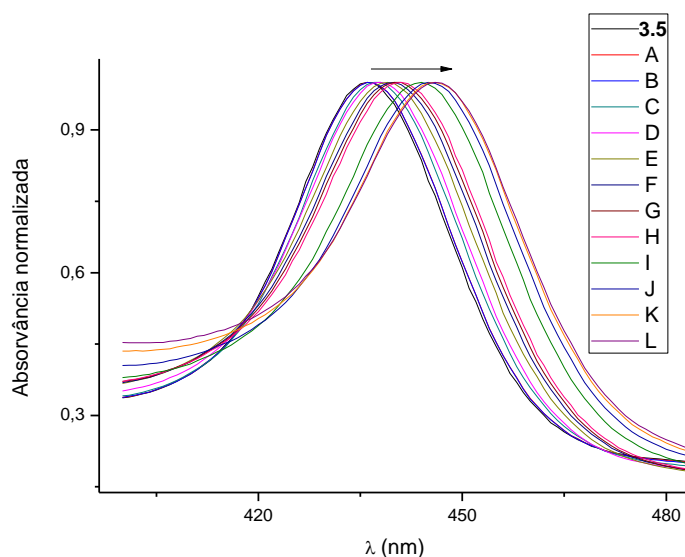


Figura 3.4.- Espectros de absorção ($\lambda=400-480\text{nm}$) do iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco(II) **3.5** à medida que se adiciona: Sulfadiazina [A) 1.65×10^{-6} mol, B) 6.60×10^{-6} mol, C) 1.32×10^{-5} mol D) 1.98×10^{-5} mol E) 2.64×10^{-5} mol, F) 4.29×10^{-5} mol, G) 5.94×10^{-5} mol H) 9.24×10^{-5} mol I) 1.25×10^{-4} mol, J) 2.90×10^{-4} mol, K) 4.55×10^{-4} mol, L) 6.20×10^{-4} mol]

Através da análise deste, podemos observar um desvio batocrômico de 10.5 nm, de $\lambda=436$ nm correspondente à porfirina **3.5** até $\lambda=446.5$ nm, após a adição de 6.20×10^{-4} moles de Sulfadiazina. Esta observação indica que ocorre coordenação com o metal central, uma vez que a presença da sulfonamida coordenada axialmente com o zinco pode conduzir a uma redução da separação entre as orbitais HOMO-LUMO, com o conseqüente desvio da banda de absorção para maiores comprimentos de onda.²¹

Na literatura encontra-se patente em diversos artigos que esta porfirina interage com o DNA induzindo citotoxicidade.^{22,23,24} Por este motivo decidiu-se sintetizar uma outra porfirina base para efetuar os mesmo estudos, o iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.6**, cuja síntese se encontra descrita anteriormente. Deste modo, realizou-se a titulação usando as concentrações previamente descritas. Os dados encontram-se ilustrados na figura 3.5.

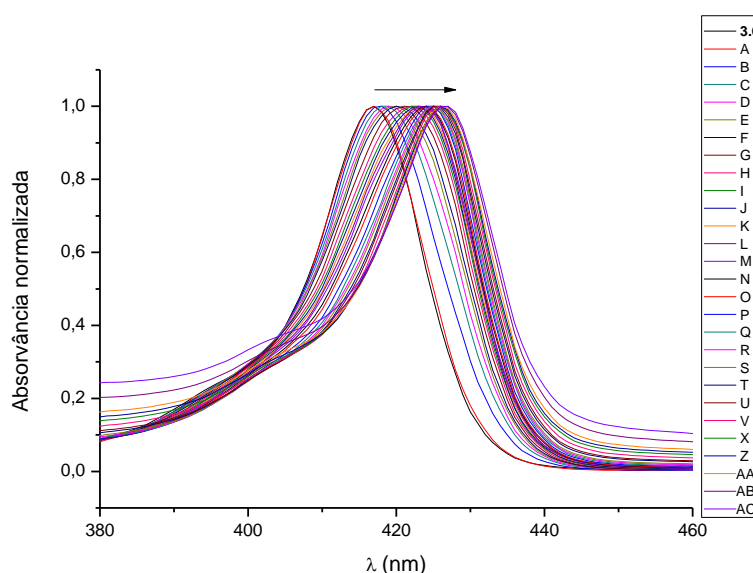


Figura 3.5- Espectros de absorção ($\lambda=380-460$ nm) do 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.6** à medida que se adiciona: Sulfadiazina [A) 3.30×10^{-7} mol, B) 1.98×10^{-6} mol, C) 3.63×10^{-6} mol, D) 5.28×10^{-6} mol, E) 6.93×10^{-6} mol, F) 8.58×10^{-6} mol, G) 1.19×10^{-5} mol, H) 1.52×10^{-5} mol, I) 1.85×10^{-5} mol, J) 2.18×10^{-5} mol, K) 2.51×10^{-5} mol, L) 2.84×10^{-5} mol, M) 3.17×10^{-5} mol, N) 3.83×10^{-5} mol, O) 4.49×10^{-5} mol, P) 6.14×10^{-5} mol, Q) 7.79×10^{-5} mol, R) 9.44×10^{-5} mol, S) 1.11×10^{-4} mol, T) 1.44×10^{-4} mol, U) 1.77×10^{-4} mol, V) 2.43×10^{-4} mol, X) 3.09×10^{-4} mol, Z) 3.75×10^{-4} mol, AA) 4.41×10^{-4} mol, AB) 6.06×10^{-4} mol, AC) 7.71×10^{-4} mol]

Mais uma vez observamos que ocorre coordenação entre a sulfonamida e o metal central, que é responsável pelo desvio batocrômico de 9.5 nm observado no espectro de absorção apresentado na figura 3.5. A banda Soret da porfirina **3.6** varia de $\lambda=417$ nm até $\lambda=426.5$ nm, após a adição de 4.4×10^{-4} moles de sulfadiazina.

Por fim, numa tentativa de perceber se a interação com o metal ocorria preferencialmente por algum dos átomos de azoto da estrutura da Sulfadiazina, realizamos o mesmo estudo utilizando a 3,5-dimetilanilina e o imidazol de modo a mimetizar os fragmentos pretendidos e a 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.6**. No entanto este estudo teve de ser realizado em metanol devido à solubilidade dos compostos intervenientes.

Neste estudo observamos que a coordenação ocorre de um modo ligeiramente superior pelo anel imidazólico, necessitando este de 1.29×10^{-3} moles para obter o desvio de 3 nm, enquanto que a anilina para obter um menor desvio (2.5 nm) necessita da adição de 1.88×10^{-3} moles. No entanto a diferença não é substancial, pelo que se conclui que a coordenação ocorre através dos dois fragmentos.

Tabela 3.2- Estudos de self-assembly com os fragmentos anilina e imidazol

Fragmento	Moles porfirina	Moles do fragmento	Desvio total
Imidazol		1.29×10^{-3}	3 nm
3,5-dimetilanilina	1.40×10^{-8}	1.88×10^{-3}	2.5 nm

3.4- Conclusão

O objetivo central deste capítulo consistiu no desenvolvimento de uma nova metodologia, baseada no conceito de self-assembly, para a preparação de estruturas contendo porfirinas catiónicas, descritas na inativação de bactérias e simultâneamente uma sulfonamida com atividade bacteriostática comprovada, a sulfadiazina. Para este efeito procedemos à síntese das porfirinas 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina **3.1** e 5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirina **3.2** e à sua posterior metalação com zinco e subsequente cationização.

De seguida foram realizados estudos de prova de conceito com a 5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco(II) **3.5**, tendo-se observado através de espectroscopia de absorção que a coordenação com a Sulfadiazina provoca um desvio batocrómico de cerca de 10.5 nm. Os resultados promissores induziram-nos a estender esta metodologia de estudo à 5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) **3.6** com a mesma sulfonamida. Estes apresentaram resultados semelhantes aos anteriormente descritos para a porfirina modelo. Efetuou-se também a titulação com fragmentos isolados da Sulfadiazina (3,5-dimetilanilina e imidazol) com o intuito de avaliar qual dos átomos de azoto da sulfonamida coordenava preferencialmente.

Em suma, os estudos preliminares efetuados no decorrer do trabalho que conduziu à escrita deste capítulo da dissertação, permitiram desenvolver uma metodologia para a preparação de

estruturas biocompatíveis e bimodais contendo na sua estrutura complexos de zinco (II) de porfirinas catiónicas e uma sulfonamida, com atividade antibacteriana comprovada, a Sulfadiazina. Estão em curso estudos adicionais para avaliar a força desta ligação, a sua sustentabilidade *in vivo* e a sua permeação em células bacterianas. Este tipo de estruturas podem ser utilizadas simplesmente para facilitar a administração simultânea de dois fármacos, para que um deles sirva de vetor para o local de actuação do outro, bem como para obter um efeito sinérgico no alvo respetivo. Estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o efeito sinérgico das sulfonamidas como antibacterianos seguidos de aplicação de PDT, estão perspectivados.

Referências

- ¹Pereira M.A., Faustino M.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, 680-690.
- ²Wainwright M., Hamblin M.R., Jori G., Hader D.P., *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, European Society for Photobiology, **2011**, 69-160.
- ³Tradução portuguesa de: Lehn J.M., *Supramolecular Chemistry – Concepts and Perspectives*, Wiley-VCH Verlag. GmbhGmbh& Co. Kгаа, **1996**, publicada por Calhorda M.J., Delgado R., Martins A.M., Machado V. G., Miranda N., *Química Supramolecular – Conceitos e Perspetivas*, IST Press– Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
- ⁴Lehn J.M., *Pure Appl. Chem.*, **1978**, 50, 871-892.
- ⁵Palesko J.A., *Self-assembly – The Science of things that put themselves together*, Chapman & Hall/CRC – Taylor & Francis Group, **2007**.
- ⁶Smith D.K., *Journal of Chemical Education*, **2005**, 82, 3, 393-400.
- ⁷Han L., Wang Z.-M., Lu X., Dong L., Xie C.-M., Wang K-F., Chen X.-L., Ding Y.-H., Weng L.-T., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, 126, 452-458.
- ⁸Fernandez-Lopez S., Kim H.S., Choi E.C., Delgado M., Granja J.R., Khasanov A., Kraehenbuehl K., Long G., Weinberger D. A., Wilcoxon K.M., Ghadiri M. R., *Nature*, **2001**, 412, 452–455.
- ⁹Mhashilkar A., Chada, S., Roth, J. A., Ramesh R., *Biotechnol. Adv.*, **2001**, 19, 279–297.
- ¹⁰Johnstone R.A.W., Nunes M.L.P.G., Pereira M.M., Gonçalves A.M.R., Serra A., *Heterocycles* **1996**, 43, 1423-1437.
- ¹¹Silva M., Fernandes A., Bebiano S.S., Calvete M.J.F., Ribeiro M.F., Burrows H.D., Pereira M. M., *Chem Commun (Camb)*, **2014**, 50, 6571-6573.
- ¹²Henriques C. A, Pinto S.M.A, Aquino G. L. B, Pineiro M., Calvete M. J. F, Pereira, M. M., *ChemSusChem*, **2014**, 7, 10, 2821-2824.
- ¹³Maugé F., Sahibed-Dine A., Gaillard M., Ziolk M., *J. Catal.*, **2002**, 207, 353-360.
- ¹⁴Emeis C.A., *J. Catalysis*, **1993**, 141, 347-354.
- ¹⁵Pinto S.M.A., Lourenço M.A.O., Calvete M.J.F., Abreu A.R., Rosado M.T.S., Burrows H.D., Pereira M.M., *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 7916-7918.
- ¹⁶Shetti V.S., Ravikanth M., *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 2692-2700.
- ¹⁷Khan T.K., Ravikanth M., *Tetrahedron*, **2012**, 68, 830-840.
- ¹⁸Shetti V.S., Ravikanth M., *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 1713-1722.

- ¹⁹Pavani C., Uchoa A.F., Oliveira C. S., Iamamoto Y., Baptista M.S., *Photochem.Photobiol.Sci.*, **2009**, 8, 233-240.
- ²⁰Arnaut L. G., *Advances in Inorganic Chemistry: Inorganic Photochemistry*, **2011**, 63, 187–233.
- ²¹ D'Souza F., Deviprasad G.R., Zandler M.E., Hoang V.T., Klykov A., VanStipdonk M., Perera A., El-Khouly M.E., Fujitsuka M., Ito O., *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 3243-3252.
- ²²Ezzeddine R., Al-Banaw A., Tovmasyan A. , Craik J. D. , Batinic-Haberle I., Benov L. T., *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 36579-36588.
- ²³Bork M. A., Gianopoulos C. G., Zhang H., Fanwick P. E., Choi J.H., McMillin D. R., *Biochemistry*, **2014**, 53, 714–724.
- ²⁴Yaku H., Murashima T. , Tateishi-Karimata H., Nakano S., Miyoshi D., Sugimoto N., *Methods*, **2013**, 64, 19–27.

Capítulo 4

Experimental

Este capítulo encontra-se dividido em quatro secções experimentais, a **4.1** referente aos reagentes e solventes; a **4.2** onde se encontra descrita a instrumentação utilizada ao longo do trabalho descrito nesta dissertação; a **4.3** onde se encontra descrita a síntese e caracterização dos compostos sintetizados presentes no **capítulo 2** e por fim, a **4.4** que se refere aos compostos sintetizados e apresentados no **capítulo 3**. De notar que a numeração de todos os compostos encontra-se de acordo com o capítulo onde é discutida a respetiva síntese.

4.1. Solventes e Reagentes

Todos os reagentes foram usados tal como fornecidos pela *Sigma-Aldrich* e os solventes fornecidos pelo *José M. Vaz Pereira*, exceto o dioxano pela Merck. Estes foram purificados ou secos, sempre que necessário, de acordo com os métodos descritos na literatura.¹ O clorofórmio deuterado, utilizado nos espectros de RMN foi neutralizado numa coluna de alumina de grau I antes da sua utilização. 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (POPS), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino-1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (NBD-DMPE) foram obtidos na Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

4.2. Instrumentação

I-Cromatografia de camada fina

O controlo das reações foi feito por cromatografia em camada fina (TLC) usando placas de sílica 60 (Merck), com indicador de fluorescência UV₂₅₄. O eluente usado varia dependendo da reação em causa.

II-Cromatografia de adsorção em placa

As porfirinas sintetizadas, sempre que necessário, foram purificadas por cromatografia de adsorção em coluna, usando gel de sílica G (MN-Kieselgel G), contendo indicador de fluorescência UV₂₅₄ como fase estacionária e o eluente apropriado tal como descrito nas respetivas secções.

III-Cromatografia de adsorção em coluna

Algumas das porfirinas sintetizadas foram purificadas por cromatografia de adsorção em coluna, usando gel de sílica 60 (Merck) como fase estacionária. O eluente usado é variável dependendo da reação em causa.

IV- Cromatografia de exclusão molecular

Para a porfirina tetrassubstituída **2.14** foi realizada uma tentativa de purificação por cromatografia de exclusão usando uma coluna de Sephadex G-10 (limite de exclusão molecular de 700 g/mol)

V-Filtração por tamanho

A porfirina tetrassubstituída foi purificada com recurso a um dispositivo Amicon equipado com uma membrana de 1KDa (retém compostos com peso molecular superior a 1000 Daltons).

VI-Ultra-sons

Com o objetivo de facilitar a dissolução dos compostos usou-se o *Bandelin Sonorex TK52*.

VIII-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H), de carbono (^{13}C) e de fluor (^{17}F) foram obtidos num espectrómetro *Bruker Avance 400* (400, 101 e 376,5 MHz respetivamente) do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra. Nos dois primeiros usa-se como padrão interno o tetrametilsilano ($\delta=0,00$ ppm) e no terceiro TFA ($\delta=-76,55$ ppm). Encontra-se descrito em cada experiência o solvente deuterado utilizado, dependendo da solubilidade dos compostos.

IX-Espectrometria de massa

Os espectros de massa ESI-TOF foram realizados num espectrómetro *Bruker Microtof* e os de MALDI-TOF num espectrómetro *Bruker Autoflex*, na Unidade de Espectrometria de Massa da Universidade de Santiago de Compostela.

X-Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível

Os espectros de UV-Visível foram obtidos no espectrofotómetro Hitachi U-2001, usando células de vidro de 1 cm óptico. Os coeficientes de absorção molar foram determinados após a preparação de soluções entre 10^{-5} e 10^{-7} M nos solventes apresentados no capítulo 2, utilizando sempre estes como referência. Representou-se graficamente a absorção para o máximo da banda considerada em função da concentração das diferentes soluções, obtendo-se uma reta cujo valor do declive corresponde ao valor do coeficiente de absorvância molar. Esta analogia é transmitida pela lei de Beer-Lambert, $A=\epsilon bc$, onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvância molar, b é o caminho óptico percorrido pela luz e c é a concentração da solução.

XI-Espectroscopia de emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos num espectrofotômetro Horiba-Jobin-Ivon Spex Fluorog 3-22 corrigido para a resposta do comprimento de onda do sistema, utilizando células de quartzo de quatro faces com percurso ótico de 1cm. Relativamente aos estudos de permeação membranar, medições no estado estacionário foram realizadas num espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Varian) equipado com um porta amostras termostaticado.

XII-Espectroscopia de absorção transiente

A aquisição dos espectros de absorção transiente foi efetuada utilizando um espectrómetro de fotólise por relâmpago da Applied Photophysics LKS.60, equipado com um laser Nd-YAG Spectra-Physics Quanta Ray GCR-130 e um osciloscópio digital Hewlett Packard Infinium (1GS/s). Todos os compostos analisados foram irradiados com a terceira harmónica do laser (355nm).

XIII-Rendimento quântico de oxigénio singuleto

A determinação do rendimento quântico de oxigénio singuleto foi realizada no aparelho referido acima e com o mesmo comprimento de onda de irradiação. O comprimento de onda de 1270nm é detetado num fotomultiplicador *Hamamatsu R5509-42*, arrefecido a 193K numa câmara de azoto líquido.

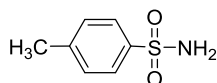
XIV-Determinação do tamanho das vesículas lipídicas unilamelares

O tamanho médio dos LUVs a 25⁰C foi medido num Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.3-Secção experimental referente ao capítulo 2

4.3.1. Síntese de Sulfonamidas

Num balão de fundo redondo contendo cloreto de *para*-tolueno sulfonilo (2 g; 0,011 mol) adiciona-se à temperatura ambiente, 200 mL de diclorometano e de seguida a amina pretendida (1,2 mol). A mistura foi deixada à temperatura ambiente sob agitação (4 a 5 horas), até se verificar por cromatografia de camada fina o consumo total do material de partida. Verificou-se que as sulfonamidas precipitam no meio da reação pelo que se procedeu à sua filtração e posterior dissolução em diclorometano de modo a realizar a extração sequencial com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (4 vezes) e de seguida, com água (4 vezes). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo.

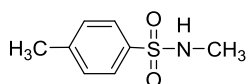
***para*-toluenosulfonamida 2.1**

Rendimento: 48 % (0,88 g).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ , ppm: 7,78 (d; $J = 7,8$ Hz; 2H); 7,35 (d; $J = 7,7$ Hz; 2H); 2,42 (s; 3H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ , ppm: 144,17; 130,55; 127,19; 21,46.

MS (ESI-TOF): m/z 172,0422 [M+H]⁺ calcd. for C₇H₁₀NO₂S 172,0427. Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.²

***N*-metil-*p*-toluenosulfonamida 2.2**

Rendimento: 94% (1,87 g).

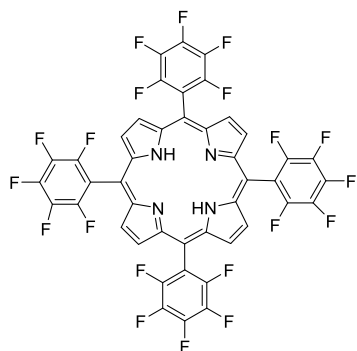
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 7,75 (d; $J = 8,1$ Hz; 2H); 7,31 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H); 4,59 (s; 1H); 2,63 (d; $J = 5,3$ Hz; 3H); 2,43 (s; 3H).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ , ppm: 143,49; 135,74; 129,74; 127,28; 29,28; 21,51.

MS (ESI-TOF): m/z 186,0575 [M+H]⁺ calcd. For C₈H₁₂NO₂S 186,0583. Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.³

4.3.2. Síntese de porfirinas**5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina 2.3**

A porfirina foi sintetizada com umas pequenas alterações ao método do nitrobenzeno.⁴ Num balão de fundo redondo contendo 8,4250 g (42,97 mmol) de pentafluorobenzaldeído adicionou-se 140 mL ácido acético e 70 mL de nitrobenzeno. Aqueceu-se a mistura até 120 °C e posteriormente adicionou-se 3 mL de pirrol gota a gota. Colocou-se a solução em refluxo durante uma hora, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de extração com diclorometano e água (6 vezes). Realizaram-se três colunas cromatográficas, usando como eluente éter de petróleo/diclorometano 5:1, 10:1, 20:1 respetivamente. De seguida procedeu-se a várias precipitações usando metanol e por fim recristalização deixando repousar durante vários dias no frio com o mesmo solvente.



Rendimento: 4,9 % (0,5126 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,92 (s; 8H); -2,91(s; 2H).

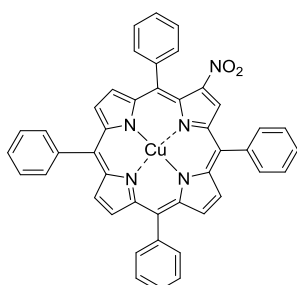
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ, ppm: -135,35 a -135,43 (dd; *J* = 23,3; 7,7 Hz; 8F); -150,06 a -150,16 (t; *J* = 20,8 Hz; 4F); -160,14 a -160,28 (m; *J* = 22,7; 7,6 Hz; 8F).

UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs} (ε), nm 416 (2,3x10⁵); 508 (1,7x10⁴); 538; 586 (5,4 x10³); 639 (8,1 x10²); 656 (5,9 x10²). Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.⁵

A porfirina foi também sintetizada de acordo com o método do NaY.⁶ Num balão de fundo redondo contendo 8,4250 g (42,97 mmol) de pentafluorobenzaldeído adicionou-se 340 mL ácido acético, 190 mL de nitrobenzeno e 18,0314 g de NaY. Aqueceu-se a mistura até 130⁰C e posteriormente adicionou-se 3 mL de pirrol gota a gota. Colocou-se a solução em refluxo durante duas horas, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração da suspensão e lavagem do material sólido resultante, primeiramente com uma mistura de diclorometano/metanol 5:1 e de seguida com THF, até este não apresentar cor. Os passos de purificação foram semelhantes aos descritos anteriormente. Obteve-se o composto com um rendimento de 9,11 % (0,955 g).

2-Nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II) (Cu(II)-βNO₂TPP) 2.4

A síntese decorreu segundo modificações ao método descrito por Jordan e colaboradores.⁷ A uma solução de TPP (0,70g; 1,14mmol) em clorofórmio (0,6 L), foram adicionados 0,7 g de nitrato de cobre tri-hidratado, previamente dissolvido numa solução de anidrido acético (70 mL) e de ácido acético (15 mL). A reação foi mantida sob agitação a 40°C. Após 3 horas, no controlo por TLC não se observou a presença de material de partida. O solvente foi eliminado no evaporador rotativo, no entanto, verificaram-se dificuldades na eliminação do anidrido. Deste modo, procedeu-se á sua hidrólise usando água e ácido acético. A mistura reacional foi então concentrada sob vácuo e de seguida extraída usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 vezes) e de seguida água (6 vezes), secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo. O crude redissolvido em diclorometano foi aplicado numa coluna de gel de sílica e eluído com diclorometano/hexano 1:1.



Rendimento: 79% (0,65 g).

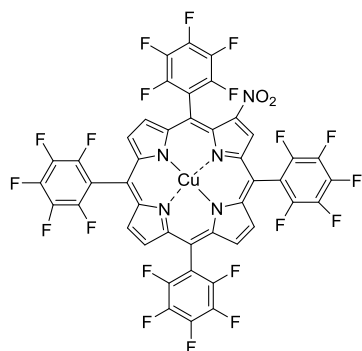
MS (ESI-TOF): *m/z* 721,1502 [M+H]⁺ calcd for C₄₄H₂₈N₅O₂Cu
721, 1534.

UV-Vis (CH₂Cl₂) λ_{max} (nm): 422; 548; 590.

A caracterização do produto obtido encontra-se de acordo com os dados encontrados na literatura.⁷

2-nitro-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinato de cobre (II) 2.5

A síntese decorreu segundo modificações ao método descrito por Jordan e colaboradores.⁷ A uma solução de TFPP (0,85 g, 0,0871 mmol) em clorofórmio (66 mL), foram adicionados 0,0535 g de nitrato de cobre tri-hidratado, previamente dissolvido numa solução de anidrido acético (5,35 mL) e de ácido acético (1,15 mL). A reação foi mantida sob agitação a 40°C. Após 3 horas, no controlo por TLC observou-se que apenas tinha ocorrido a metalação da porfirina, deste modo, a temperatura foi aumentada para 60°C. Após 27 horas, deixou de se observar qualquer evolução da reação pelo que se procedeu ao seu término. O solvente foi eliminado no evaporador rotativo, no entanto, verificaram-se dificuldades na eliminação do anidrido. Deste modo, procedeu-se á sua hidrólise usando água e ácido acético. A mistura reacional foi então concentrada sob vácuo e de seguida extraída usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 vezes) e de seguida água (6 vezes), secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo. O crude redissolvido em diclorometano foi aplicado numa coluna de gel de sílica e eluído com diclorometano/hexano 1:1.



Rendimento: 30,8% (0,29 g).

MS (ESI-TOF): m/z 1079,9571 [M]⁺ calcd for C₄₄H₇F₂₀N₅O₂Cu
1079,95709.

UV-Vis (CH₂Cl₂) λ_{\max} (nm): 415; 543; 589.

A caracterização do produto obtido encontra-se de acordo com os dados encontrados na literatura.⁸

4.3.3. Síntese de sulfonamido-5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinas

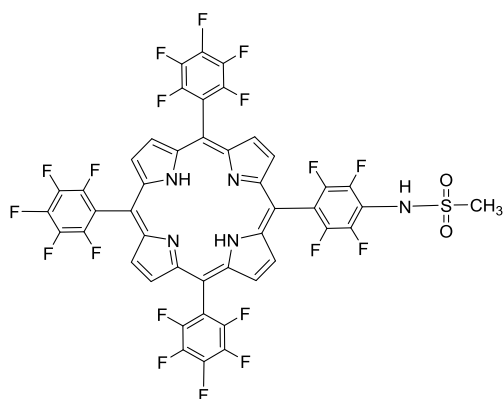
Método A

Num balão de fundo redondo contendo 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (100 mg; 1,02x10⁻⁴ mol), a sulfonamida pretendida (Porfirina/ Sulfonamida 1:6) e carbonato de céσιο adicionou-se 20 mL de dioxano. De seguida, a mistura é aquecida até 100 °C e deixada em agitação até que a análise por cromatografia de camada fina indique o consumo total do material de partida (72-96 horas). A mistura é extraída usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 vezes) e de seguida com água (6 vezes), secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo. De seguida foi realizada

purificação por cromatografia de adsorção em coluna utilizando como eluente acetato de etilo/hexano (1:2). Com o intuito de obter frações puras de porfirina, cada amostra foi subsequentemente sujeita a cromatografia de adsorção em placas preparativas revestidas de gel de sílica usando como eluente um gradiente crescente de hexano / acetato de etilo, permitindo o isolamento de algumas frações, variáveis com a sulfonamida utilizada. Deste modo, obtiveram-se duas frações no caso da *p*-tolueno-sulfonamida (2.1), três para a *N*-metil-*p*-tolueno-sulfonamida (2.2) e uma para metanosulfonamida.

a) Derivadas da metanosulfonamida

5-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina 2.6



Rendimento: 18,47% (0,020 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,93 (sl; J=13,5 Hz; 8H); 3,53 (s; 3H); -2,92 (s; 2H).

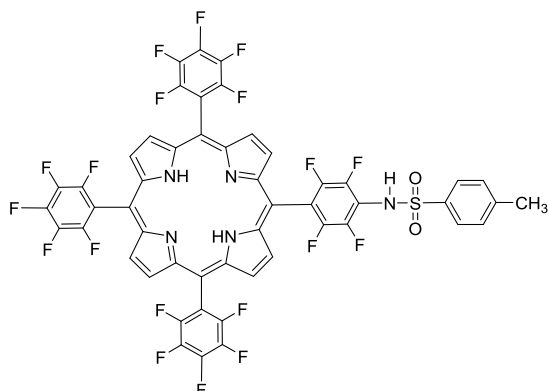
RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ, ppm: -136,47 (dd; J = 15,3; 7,9 Hz; 6F); -136,54 (d; J=7,3 Hz; 2F); -147,82 (dd; J= 23,7; 10,7 Hz; 2F); -151,22 (td; J=20,9; 7,1 Hz; 3F); -161,26 a -161,37 (m; 6F).

UV-vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) 411 (2,4x10⁵); 505 (1,4x10⁴); 582 (4,5x10³); 636 (6,6x10²).

MS (MALDI-TOF): m / z 1049,0549 [M] + calcd for C₄₅H₁₄F₁₉N₅O₂S 1049,0559.

b) Derivadas da *p*-toluenosulfonamida

5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina (2.7)



Rendimento: 4,53% (0,016 g).

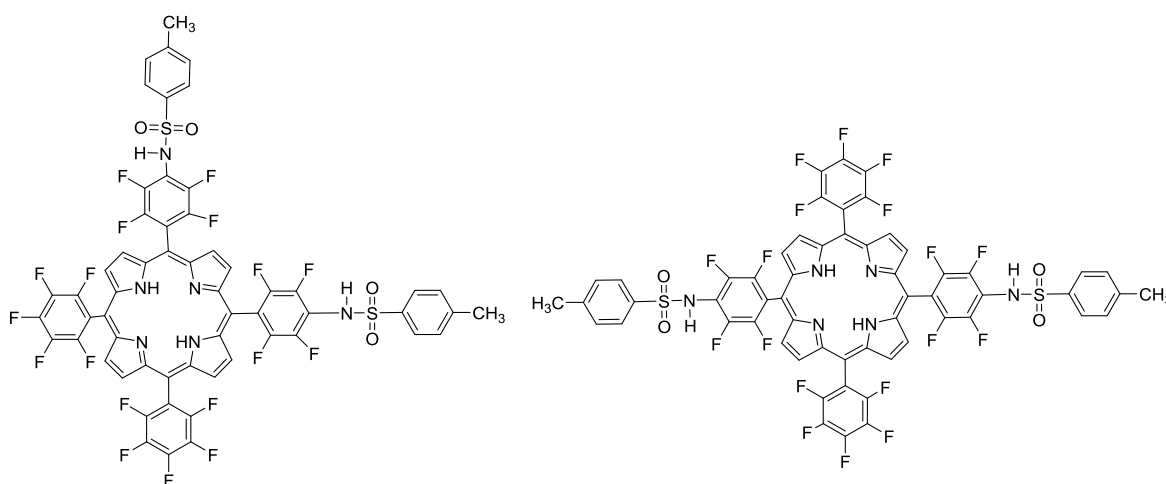
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,94 (s; 8H); 8,05 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 7,47 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 7,08 (s; 1 H); 2,51 (s; 3H); -2,89 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, $\text{CD}_3\text{CO CD}_3$) δ , ppm: -134,73 (dd; $J=21,8$; 5,1 Hz; 6F); -135,45 (dd; $J=102,1$; 51,0 Hz; 2F); -142,13 (dd; $J=67,3$; 33,5 Hz; 2F); -150,20 a -150,34 (m; 3F); -159,35 (td; $J=22,8$; 7,5 Hz; 6F).

UV-vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 411 ($2,1\times 10^5$); 506 ($1,7\times 10^4$); 583 ($5,4\times 10^3$); 637 ($8,2\times 10^2$).

MS (MALDI-TOF): m/z 1125,0869 [M] + calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{18}\text{F}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 1125,0872.

5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina 2.8 e 2.9



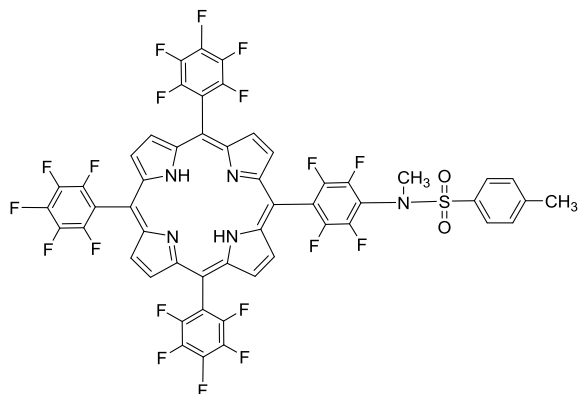
Rendimento: 0,69% (0,0027 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,89 (s; 8H); 8,01 (d; $J=8,1$ Hz; 2H); 7,46 (d; $J=7,9$ Hz; 2H); 6,86 (s; 2H); 2,51 (s; 6H); -2,94 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ , ppm: -134,73 (dd; $J=23,2$; 7,1 Hz; 4F); -135,27 (dd; $J=23,4$; 10,4 Hz; 4F); -142,01 (dd; $J=23,3$; 10,4 Hz; 4F); -150,24 (t; $J=20,4$ Hz; 2F); -159,34 (td; $J=22,3$; 6,8 Hz; 4F).

UV-vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 412 ($1,1\times 10^5$); 506 ($9,2\times 10^3$); 583 ($3,0\times 10^3$); 644 ($7,2\times 10^2$).

MS (MALDI-TOF): m/z 1276,1165 [M] + calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{26}\text{F}_{18}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ 1276,1164.

c) Derivadas da *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida5-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,15,20-tri-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina 2.10

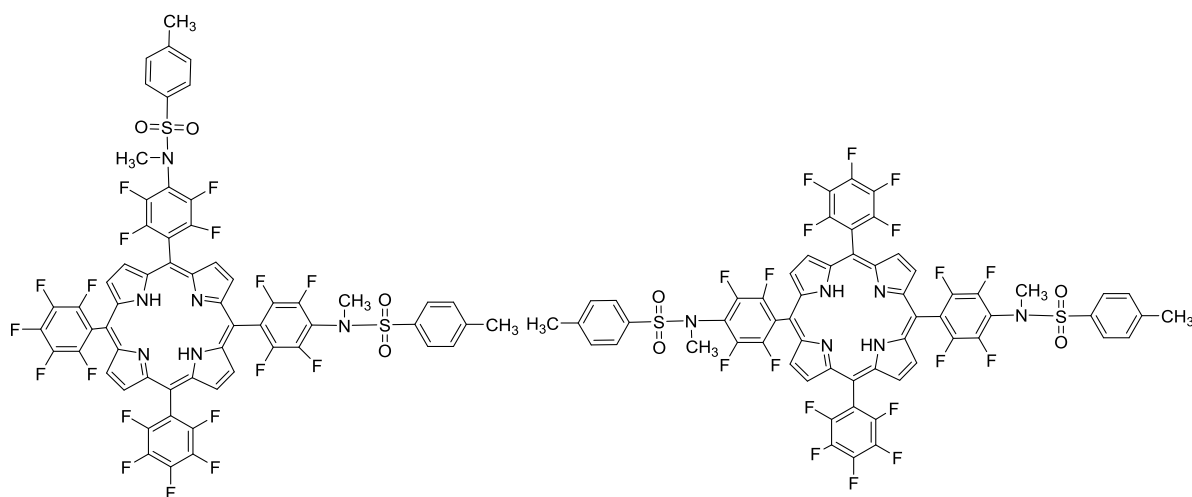
Rendimento: 3,11% (0,015 g).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ, ppm: 8,92 (s; 8H); 7,97 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 7,47 (d; J = 8,1 Hz; 2H); 3,50 (s; 3H); 2,51 (s; 3H); -2,91 (s; 2H).

RMNM ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ, ppm: -135,40 (dd; J = 23,2; 7,3 Hz; 6F); -135,69 (dd; J = 23,7; 10,9 Hz; 2F); -141,80 (dd; J = 23,7; 10,9 Hz; 2F); -150,12 (t; J = 20,6 Hz; 3F); -160,15 a -160,26 (m; 6F).

UV-vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (ε, M⁻¹.cm⁻¹) 411 (2,7x10⁵); 505 (1,7x10⁴); 582 (5,3x10³); 636 (8,3x10²).

MS (ESI-TOF): m / z 1140,1078 [M+H]⁺ calcd. for C₅₂H₂₁F₁₉N₅O₂S 1140,1107.

5,10-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-15,20-dis-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina e 5,15-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-10,20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina 2.11 e 2.12

Rendimento: 1,45% (0,008 g).

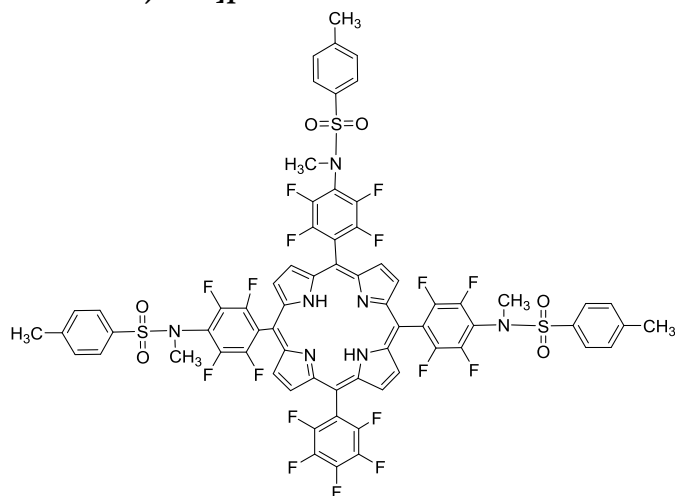
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,85 (d; $J = 51,6$ Hz; 8H); 7,96 (d; $J = 7,6$ Hz; 4H); 7,47 (d; $J = 7,5$ Hz; 4H); 3,50 (s; 6H); -2,90 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ , ppm: -136,50 (d; $J = 16,1$ Hz; 4F); -136,79 (dd; $J = 23,4; 10,5$ Hz; 4F); -142,9 (d; $J = 12,9$ Hz; 4F); -151,19 (t; $J = 20,7$ Hz; 2F); -161,25 a -161,35 (m; 4F).

UV-vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 412 nm ($2,3 \times 10^5$); 506 ($1,8 \times 10^4$); 583 ($5,7 \times 10^3$); 642 ($1,1 \times 10^3$).

MS (MALDI-TOF): m/z 1304,1485 $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{30}\text{F}_{18}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ 1304,1477.

5,10,15-tri-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil]-20-[(2',3',4',5',6'-pentafluoro)fenil]porfirina 2.13



Rendimento: 0,64% (0,004 g).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,96 (s; 8H); 7,96 (d; $J = 8,1$ Hz; 6H); 7,47 (d; $J = 8,0$ Hz; 6H); 3,51 (s; 9H); 2,51 (s; 9H); -2,89 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, CD_3CO) δ , ppm: -136,57 (dd; $J = 23,2; 7,1$ Hz; 2F); -136,95 a -137,07 (m; 6F); -141,52 (dd; $J = 23,2; 10,0$ Hz; 6F); -152,05 (s; 1F); -161,14 a -161,26 (m; 2F).

UV-vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 413 ($2,9 \times 10^5$); 505 ($1,4 \times 10^4$); 583 ($5,6 \times 10^3$); 640 ($9,6 \times 10^2$).

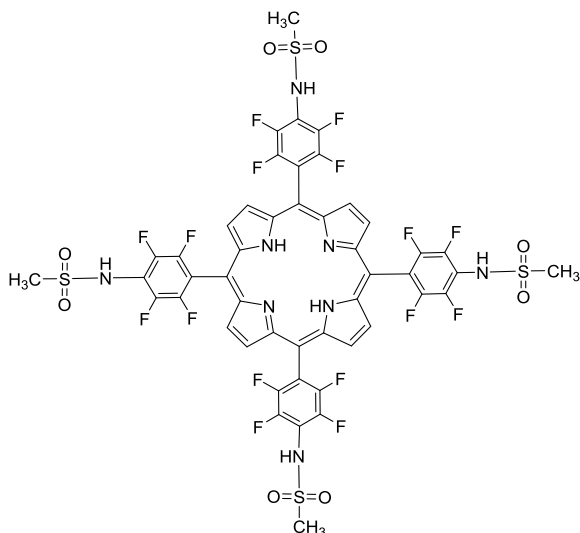
MS (MALDI-TOF): m/z 1469,1946 $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{68}\text{H}_{40}\text{F}_{17}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}_3$ 1469,1925.

Método B

Num balão de fundo redondo contendo 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (30 mg; $3,07 \times 10^{-5}$ mol), a sulfonamida pretendida (Porfirina/ Sulfonamida 1:18) e carbonato de césio adicionou-se 2 mL de dioxano. De seguida, a mistura é aquecida até 100°C e deixada em agitação até que a análise por cromatografia de camada fina indique o consumo total do material de partida (48 horas).

a) Derivadas da metanosulfonamida

5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina 2.14



O crude foi lavado com acetona recorrendo ao auxílio de ultra-sons para facilitar a dissolução e de seguida o sólido resultante foi purificado usando o dispositivo Amicon (1kDa).

Rendimento: 70% (0,027 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ , ppm: 9,11 (s; 8H); -3,04 (s; 2H).

RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO) δ , ppm: -144,71 (d; 17,7; 8F); -152,19 (d; 19,1; 8F).

UV-vis (DMSO): λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) 413 (5,8x10⁴); 509 (6,65x10³); 585 (2,75x10³); 638 (6,3x10²).

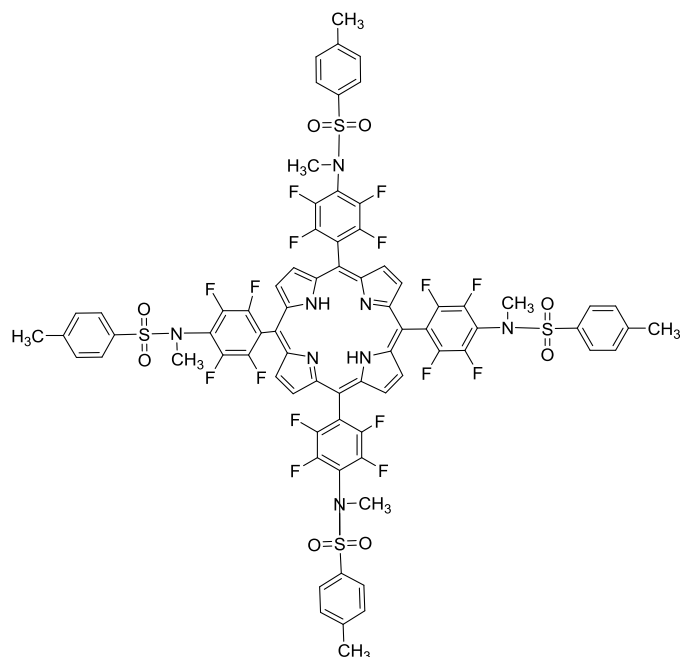
MS (MALDI-TOF): m / z 1274,04778 [M] + calcd for C₄₈H₂₆F₁₆N₈O₈S₄ 1274,04955.

Nota: O pico referente ao grupo metilo apresenta um desvio químico de 3.28 ppm em DMSO e 3.66 ppm em metanol. Além disso, é um pico alargado e a integração não apresenta os valores expectáveis, variando mesmo entre espectros da mesma amostra. A possível ocorrência de fenómenos de troca em grupos constituídos por prótons ácidos, é uma justificação viável. Estes verificam-se com o uso de solventes próticos, sendo acentuados na presença de água. Encontram-se em curso estudos de RMN com variação da temperatura de modo a corroborar a explicação supracitada.

b) Derivadas da *N*-metil-*p*-toluenosulfonamida5,10,15,20-tetra-[(2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-*N*-metil-*p*-toluenosulfamoil)fenil] porfirina 2.15

A mistura é extraída usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio (6 vezes) e de seguida com água (6 vezes), secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e retirou-se o solvente no evaporador rotativo. De seguida foi realizada purificação por cromatografia de adsorção em coluna utilizando como eluente acetato de etilo/hexano (1:2). Com o intuito de obter a fração recolhida pura, esta foi sujeita a

cromatografia de adsorção em placas preparativas revestidas de gel de sílica usando como eluente um gradiente crescente de hexano / acetato de etilo.



Rendimento: 20% (0,010 g).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ , ppm: 8,99 (s; 8H); 7,97 (d; $J=6,1$ Hz; 8H); 7,48 (d; $J=6,1$ Hz; 8H); 3,52 (s; 12H); 2,52 (s; 12H); -2,85 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO) δ , ppm: -136,53 a -137,79 (m; 8F); -141,52 a -142,90 (m; 8F).

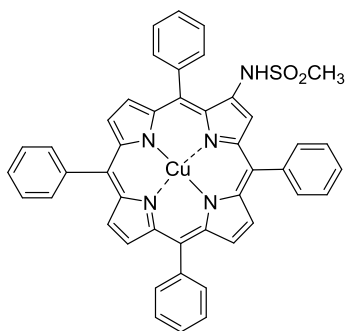
UV-vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 413; 506; 584; 637.

MS (MALDI-TOF): m/z 1634,23386[M] + calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{50}\text{F}_{16}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ 1634,23069.

Método C

Num balão de fundo redondo contendo 2-nitro-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II) (**2.4**) (100 mg; $1,02 \times 10^{-4}$ mol), a metanosulfonamida (Porfirina/ Sulfonamida 1:3) e carbonato de césio adicionou-se 20 mL de dioxano. De seguida, a mistura é aquecida até 100°C e deixada em agitação. Após 48 horas, verificou-se a presença de material de partida em grande quantidade, pelo que se adicionaram mais 2 equivalentes de metanosulfonamida ao meio reacional, e a reação permaneceu à mesma temperatura (100°C) por mais 24 horas. Após o arrefecimento da mistura reacional até à temperatura ambiente, realizou-se a extração da mistura, usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa, sequencialmente uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado a pressão reduzida. O resíduo foi retomado em diclorometano e procedeu-se à sua purificação por cromatografia de adsorção em coluna utilizando como eluente *n*-hexano/diclorometano (2:1) e sílica como fase estacionária. Foi recolhida uma primeira fração identificada como a porfirina de partida metalada com cobre (Cu(II)TPP) e uma segunda fração correspondente ao produto pretendido.

2-*N*-metanosulfamoil-5,10,15,20-tetrafenilporfirinato de cobre (II) 2.16



Rendimento: 14,56% (0,011 g).

MS (MALDI-TOF): m/z 768,003 [M]⁺ calcd for

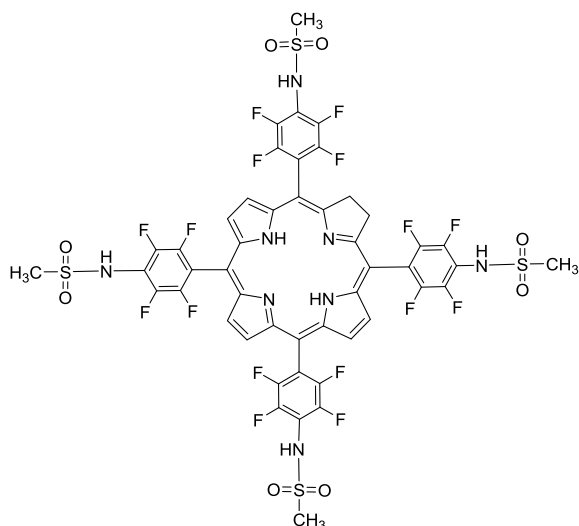
C₄₅H₃₁CuN₅O₂S 768,150.

UV-vis (CH₂Cl₂): λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) 417 (2,3x10⁵); 540 (1,2x10⁴); 612 (1,4x10³).

4.3.4. Síntese de Hidroporfirinas

5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]clorina 2.17

Num balão de fundo redondo contendo 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina **2.14** (23 mg; 1,81x10⁻⁵ mol) e FeCl₃.6H₂O (245 mg; 5% mol) dissolvidos em 2 mL de etanol, adicionou-se hidrazina hidratada (11,6 μ L; 1,81x10⁻⁴ mol). A mistura foi aquecida até 25^oC e deixada em agitação até que a análise por cromatografia de camada fina indique o consumo total do material de partida. O solvente foi removido no evaporador rotativo e o crude redissolvido em diclorometano. De seguida foi realizada purificação por cromatografia de adsorção em coluna utilizando como eluente diclorometano/acetato de etilo 3:1.



Rendimento: 65% (0,015 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ , ppm: 9,19 (s; 2H); 8,975 (d; 2H); 4,33 (s; 4H); 3,07 (t; 12H); -1,61 (s; 2H).

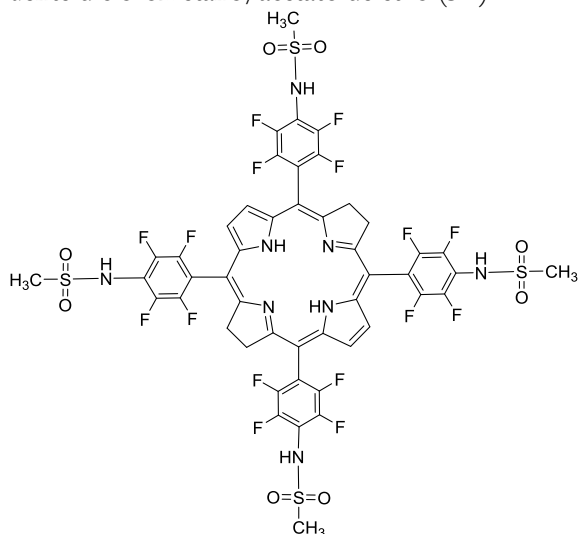
RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO) δ , ppm: -143,51 (s; 6F); -144,24 (s; 2F); -150,17 (s; 2F); -151,05 (s; 6F).

UV-vis (DMSO): λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) 417 (3,6x10⁴); 512 (4,4x10³); 543 (2,1x10³); 596 (1,4x10³); 655 (5,3x10³).

MS (ESI-TOF): m/z 1277,0731 [M+H]⁺ calcd. for C₄₈H₂₉F₁₆N₈O₈S₄ 1277,0730.

5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]bacterioclorina 2.18

A 5,10,15,20-tetra-[2',3',5',6'-tetrafluoro-4'-metanosulfamoil)fenil]porfirina **2.14** (25 mg; $1,96 \times 10^{-5}$ mol) e *p*-toluenosulfonilhidrazina (0,146 mg; $7,85 \times 10^{-4}$ mol) foram misturadas num almofariz, tendo-se obtido um pó finamente dividido. O pó foi introduzido num tubo de Schlenk, que foi mantido sob vácuo (0,1 Torr), durante 20 minutos. O tubo foi aquecido até 140°C e mantido com agitação durante 20 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, o sólido resultante foi redissolvido em diclorometano e de seguida purificado por coluna de cromatografia em gel de sílica usando-se como eluente diclorometano/acetato de etilo (3:1).



Rendimento: 70% (0,018 g).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ , ppm: 8,45 (s; 4H); 4,12 (s; 8H); 2,91 (s; 12H); -1,41 (s; 2H).

RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO) δ , ppm: -145,36 - -145,45 (dd; $J = 25,1$ Hz; 8F); -140,54—140,64 (dd; $J = 25,1$ Hz; 8F).

UV-vis (DMSO): λ_{max} , nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 348 ($1,4 \times 10^4$); 375 ($1,3 \times 10^4$); 507 ($3,3 \times 10^3$); 751 ($8,7 \times 10^3$).

MS (ESI-TOF): m/z 1279,0870 $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{31}\text{F}_{16}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_4$ 1279,0887.

4.3.5- Caracterização fotofísica e fotoquímica

Rendimentos quânticos de fluorescência

Para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência seguiu-se a metodologia proposta por Parker et al⁹. A referência utilizada foi a TPP em tolueno ($\phi_{\text{F}}=0,11^{10}$) no caso das porfirinas e clorina e a 5,5,10,15,20-tetraquis(2,6-difluoro-3-*N*-metilsulfamoil)fenil)bacterioclorina (luz11) como referência ($\phi_{\text{F}}=0.138^{11}$ em etanol) em tolueno para a bacterioclorina. Foram preparadas soluções das referências e dos compostos cujo rendimento se quer determinar em tolueno ou em DMSO, consoante a solubilidade dos compostos, de forma a apresentarem no espectro de absorção UV-visível uma absorvância de aproximadamente 0,1 para a banda Soret. Diluíram-se estas soluções num fator de 1/10, procedeu-se ao seu desarejamento durante cerca de 15 minutos e de seguida, registaram-se os respetivos espectros de emissão excitando a 418nm no caso das porfirinas e clorina e 510nm no caso da bacterioclorina. Por fim, os rendimentos quânticos de fluorescência foram então calculados com recurso à equação:

$$\phi^F(\text{amostra}) = \frac{\text{Área}(\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Área}(\text{ref})} * \frac{\eta^2(\text{amostra})}{\eta^2(\text{ref})} * \phi^F(\text{ref})$$

Nesta, a área refere-se à integração do espectro de emissão, Abs à absorvância correspondente ao comprimento de onda de excitação e η ao índice de refração do solvente no qual a amostra e a referência se encontram dissolvidos, podendo este termo ser anulado quando o solvente utilizado é o mesmo.

Espectroscopia de absorção transiente

De forma a obter o espectro de absorção singuleto-triplete dos compostos sintetizados acertou-se a absorvância a 0,2 a 355nm, uma vez que no espectrómetro de fotólise por relâmpago se iria irradiar as amostras com a terceira harmónica do laser (355nm). Os espectros de absorção singuleto-triplete foram adquiridos entre 270-750nm na presença e na ausência de O₂. Para as experiências realizadas na ausência de oxigénio, o desarejamento foi efetuado durante 20 minutos com recurso a azoto. Os tempos de vida do tripleto foram obtidos ajustando os decaimentos com uma exponencial, utilizando o programa *OriginLab*.

Rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto

A fosforescência do oxigénio singuleto a 1270 nm foi detetada à temperatura ambiente após excitação das soluções contendo os compostos pretendidos na concentração necessária para produzir uma absorvância de 0,2 a 355nm. A excitação das amostras foi realizada neste comprimento de onda, correspondente à terceira harmónica do laser. O comprimento de onda de 1270nm foi selecionado para deteção no fotomultiplicador arrefecido a 193K com azoto líquido. Como padrão utilizou-se a fenalona, que possui um $\phi\Delta = 1,08^{12}$ em tolueno. Para os dados referentes a cada energia do laser é ajustada uma exponencial, utilizando, mais uma vez, o programa *OriginLab*. De cada uma destas, é retirado o valor referente ao pré-exponencial (A) e construído um novo gráfico deste em função da energia do laser. Por fim, ajusta-se uma função linear a estes dados e retira-se o valor do declive. Calcula-se assim o rendimento quântico de oxigénio singuleto com recurso à equação:

$$\phi\Delta(\text{amostra}) = \frac{\text{Declive}(\text{amostra})}{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{amostra})}} * \frac{1 - 10^{-\text{Abs}(\text{ref})}}{\text{Declive}(\text{ref})} * \phi\Delta(\text{ref})$$

4.3.6- Determinação de coeficientes de partição

Volumes iguais de n-octanol e PBS são misturados e deixados a repousar. No dia seguinte, dissolve-se o composto em 5 mL de octanol saturado com PBS e em seguida, adicionam-se a este 5 mL de PBS saturado com octanol. Agita-se a mistura vigorosamente e centrifuga-se a 3700 rpm. A um volume de 2mL da parte do PBS adiciona-se 0,5 mL de octanol puro e procede-se à evaporação do primeiro a pressão reduzida (cerca de 50°C). Após evaporação, adicionam-se 2,5 mL de octanol puro a este. Por outro lado, a um volume de 2 mL da parte do octanol adiciona-se 1 mL de octanol puro de modo a

manter diluições iguais na fase orgânica e aquosa. Por fim, efetuam-se espectros UV-Vis de cada uma das fases, dos quais se regista a absorvância para o cálculo do coeficiente de partição a partir da equação:

$$\log P_{OW} = \log(Abs_{n-oct}/Abs_{PBS})$$

4.3.7- Estudos de permeação em membranas

Solução tampão

Neste trabalho foi utilizada uma solução tampão HEPES, preparada através de uma mistura de HEPES (10 mM), azida de Sódio (0.02% m/v), cloreto de sódio (15 mM) e EDTA (1 mM), o pH foi ajustado a 7.4 adicionando hidróxido de sódio.

Preparação de LUVs

As bicamadas lipídicas utilizadas encontravam-se sob a forma de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs) e continham o lípido fluorescente NBD-DMPE numa razão molar de 1: 100. Prepararam-se previamente soluções stock contendo os lípidos de interesse, neste caso, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (POPS), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino-1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (NBD-DMPE), através da sua dissolução numa mistura azeotrópica de Clorofórmio:Metanol (87:13 (v/v)) e deixou-se equilibrar durante 1 h. Após o equilibrar da solução, evaporou-se o solvente recorrendo a um fluxo de ar quente que incidia na parte externa do tubo de ensaio. Durante este processo a solução foi mantida sob constante agitação por intermédio de um vortex e sob um fluxo continuado de azoto. O filme foi deixado num exsiccador de vácuo durante pelo menos 8 horas para eliminar vestígios de solventes orgânicos e, em seguida hidratado com tampão HEPES. O lípido hidratado permaneceu à temperatura ambiente durante pelo menos 1 hora com agitação pontual, de modo a produzir uma suspensão de vesículas multilamelares que foram, em seguida, submetidas a três ciclos de freeze/thaw (congelamento/aquecimento) seguidos por 13 extrusões através de dois filtros de policarbonato com um diâmetro de poro de 0,1 µm. Nas três primeiras passagens pelo extrusor, realizou-se também um ciclo de congelação seguida de aquecimento.

Determinação do coeficiente de partição

Uma pequena alíquota de porfirina dissolvida em metanol foi adicionada à solução aquosa de LUV na concentração de lípidos necessária para se obter uma concentração final de porfirina igual a 100, 200 ou 400 nM e 0,5% (v/v) de metanol. As soluções foram deixadas a equilibrar durante 10 min e a fluorescência do NBD-DMPE foi medida com um comprimento de percurso de 10 mm. Soluções independentes contendo porfirina foram preparadas para cada uma das concentrações de lípidos

considerados. O cálculo do coeficiente de partição foi executado recorrendo a uma aproximação analítica para a transferência de energia em duas dimensões.¹³

4.3.8-Estudos *in vitro*

Viabilidade celular

Células da linha 3T1 (fibroblastos de murganho) colocadas no meio de cultura (formulation for Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEAM) ATCC 30-202), foram lavadas com PBS e posteriormente foi adicionada tripsina. Após ocorrer o destaque, estas foram centrifugadas. De seguida, procede-se à sua contagem com recurso ao corante Trypan Blue e a uma câmara de Neubauer. Posteriormente as células foram plaqueadas (placas de 96 poços) com uma concentração de 7,000 células por poço. Incubaram-se estas até atingirem cerca de 80% de confluência (24 horas). A porfirina **2.6** foi adicionada numa gama de concentrações entre 1,25 μM e 80 μM em poços triplicados e incubados a 37°C durante 24 e 48 horas. Células controlo, sem adição de porfirina, são incubadas nas mesmas condições. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células lavadas com PBS. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico Alamar blue com recurso a medição de fluorescência.

4.4-Secção experimental referente ao capítulo 3

4.4.1- Síntese de porfirinas

5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina **3.1**

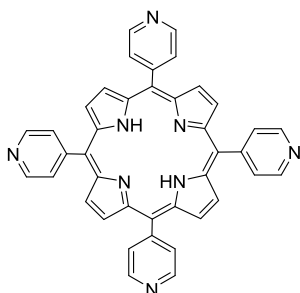
A porfirina **3.1** foi sintetizada com recurso a três métodos distintos: o método do nitrobenzeno⁴ a sua otimização recente recorrendo à presença de NaY⁶ e o método recorrendo à síntese por micro-ondas utilizando como solvente a água.¹⁴

Método do Nitrobenzeno: A um balão de fundo redondo contendo 4 mL (43 mmol) de 4-piridinacarboxaldeído adicionou-se 140 mL ácido acético e 70 mL de nitrobenzeno. Aqueceu-se a mistura até 120 °C e posteriormente adicionou-se 3 mL de pirrol gota a gota. Colocou-se a solução em refluxo durante uma hora, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de extração usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água sucessivamente (6 vezes). De seguida, realizaram-se duas colunas cromatográficas, usando como eluente diclorometano/metanol 9:1 seguidas de uma precipitação usando diclorometano e hexano. Obteve-se o composto com um rendimento de 14,6% (0,969 g).

Método do NaY: Num balão de fundo redondo contendo 0,24 mL (2,5 mmol) de 4-piridinacarboxaldeído adicionou-se 7 mL ácido acético, 5 mL de nitrobenzeno e 1 g de NaY. Aqueceu-se a mistura até 130 °C e posteriormente adicionou-se 0.17 mL de pirrol gota a gota. Colocou-se a solução em

refluxo durante duas horas, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração da suspensão e lavagem do material sólido resultante, primeiramente com uma mistura de diclorometano/metanol 5:1 e de seguida com THF, até este não apresentar cor. Os restantes passos de purificação foram semelhantes aos descritos anteriormente. Obteve-se o composto com um rendimento de 9 % (0,035 g).

Método recorrendo a água e Mw: A um copo reacional de 10 mL foi adicionado o 4-piridinacarboxaldeído (0,923 mL; 9,8 mmol), o pirrol (0,68 mL; 9,8 mmol) e a água (0.2 mL). A mistura foi sujeita a radiação microondas com potência máxima de 300W durante 10 min, a uma temperatura de 473K. Após arrefecimento, os passos de purificação foram semelhantes aos supracitados. Obteve-se o composto com um rendimento de 13 % (0,197 g).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 9.07 (d; $J = 3.8$ Hz; 8H), 8.87 (s; 8H), 8.17 (d; $J = 4.8$ Hz; 8H), - 2.92 (s; 2H).

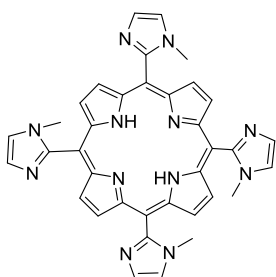
UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (ϵ), nm 416; 513; 545; 588; 645.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.

5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirina 3.2

Método do NaY: Num balão de fundo redondo contendo 275,3 mg (2,5 mmol) de 1-metilimidazol-2-carboxaldeído adicionou-se 7 mL ácido acético, 5 mL de nitrobenzeno e 1 g de NaY. Aqueceu-se a mistura até 130 $^{\circ}\text{C}$ e posteriormente adicionou-se 0.17 mL de pirrol gota a gota. Colocou-se a solução em refluxo durante duas horas, desligou-se o aquecimento e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração da suspensão e lavagem do material sólido resultante, primeiramente com uma mistura de diclorometano/metanol 5:1 e de seguida com THF, até este não apresentar cor. Procedeu-se a uma destilação a pressão reduzida seguida de extração usando como fase orgânica diclorometano e como fase aquosa uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água sucessivamente (6 vezes). De seguida, realizaram-se duas colunas cromatográficas, usando como eluente clorofórmio/metanol 19:1 seguidas de uma precipitação usando clorofórmio e hexano. Obteve-se o composto com um rendimento de 8% (0.032 g).

Método recorrendo a água e Mw: A um copo reacional de 10 mL foi adicionado o 1-metilimidazol-2-carboxaldeído (1,08 g; 9,8 mmol), o pirrol (0,68 mL; 9,8 mmol) e a água (0.2 mL) . A mistura foi sujeita a radiação micro-ondas com potência máxima de 300W durante 10 min, a uma temperatura de 473K. Após arrefecimento, os passos de purificação foram semelhantes aos supracitados. Obteve-se o composto com um rendimento de 12 % (0,185 g).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ , ppm: 8,91-8,86 (sl; 8H); 7,69 (dd; $J = 1.3; 5.7$ Hz; 4H); 7,49 (dd, $J = 1,4; 3,2$ Hz, 4H); 3,55-3,38 (sl; 12H) , -2,84 a -2,95 (sl; 2H).

UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (ϵ), nm 420; 513; 587; 658.

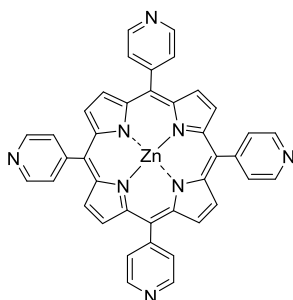
Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁵

4.4.2- Metalação de porfirinas

Procedimento geral: A porfirina é dissolvida em clorofórmio e colocada num balão de fundo redondo. A mistura é aquecida até 50°C e o acetato de zinco (10 equivalentes), previamente dissolvido em metanol foi adicionado. A reação foi controlada por UV-vis até as 4 bandas Q características se transformaram em 2 bandas Q, típicas do complexo metálico. Após terminada a reação, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. De seguida o solvente foi removido sob vácuo e o sólido obtido redissolvido em diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e água destilada, sucessivamente. Por fim, foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente posteriormente eliminado no evaporador rotativo. Verificou-se por UV-vis e TLC que não havia contaminação com a porfirina de partida. Estes compostos não puderam ser caracterizados por RMN devido às interações intermoleculares entre os átomos de azoto e de zinco das diferentes moléculas.¹⁶

5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirinato de zinco(II) 3.3

De acordo com o procedimento geral referido, a 5,10,15,20-tetraquis(4-piridil)porfirina (125 mg; 0,20 mmol) foi dissolvida em 50 mL de clorofórmio. O acetato de zinco (0,444 g; 2 mmol) previamente dissolvido em 12,5 mL de metanol.

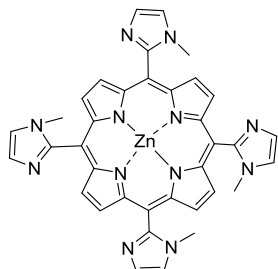


Rendimento: 80 % (0,109 g).

UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{abs} (ϵ), nm 422; 588; 598.

5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) 3.4

De acordo com o procedimento geral referido, a 5,10,15,20-tetraquis(1-metilimidazol-2-il)porfirina (20 mg; 0,0317 mmol) foi dissolvida em 5 mL de clorofórmio. O acetato de zinco (0,070 mg; 0,317 mmol) previamente dissolvido em 2 mL de metanol.



Rendimento: 92 % (0,020 g).

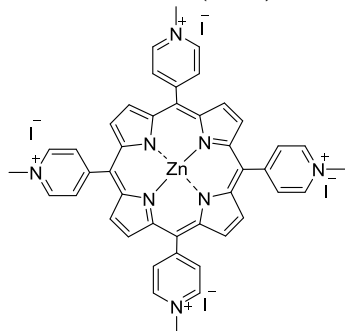
UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{abs} (ε), nm 424; 559; 634.

4.4.3- Síntese de porfirinas catiónicas

Procedimento geral: Num balão de fundo redondo contendo o complexo metálico de porfirina em DMF adicionaram-se faseadamente 300 equivalentes de iodeto de metilo. A mistura reacional foi mantida em agitação durante 24 horas a 25°C. Terminado este período, precipitou-se o produto com éter dietílico. Para ajudar a formação do precipitado a solução foi deixada no frigorífico durante 24 horas. O sólido foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco sob vácuo.

5,10,15,20-tetraquis(4-metilpiridil)porfirinato de zinco(II) 3.5

Seguindo o procedimento geral acima descrito, o composto **3.3** (15,7 mg; 0,0253 mmol) foi dissolvido em DMF (2 mL), e o iodeto de metilo (0,47 mL; 7,59 mmol) foi adicionado a esta solução.



Rendimento: 90% (0,028 g).

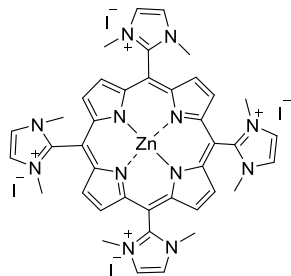
RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ, ppm: 9,42 (d; *J* = 6,4 Hz; 8H); 9,08 (s; 8H); 8,91 (d; *J* = 6,4 Hz; 8H); 3,44 (s; 12H).

UV-Vis (PBS): λ_{abs} (ε), nm 436; 560; 605.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁷

5,10,15,20-tetraquis(1,3-dimetilimidazol-2-il)porfirinato de zinco (II) 3.6

Seguindo o procedimento geral acima descrito, o composto **3.4** (10 mg; 0,0158 mmol) foi dissolvido em DMF (2 mL), e o iodeto de metilo (0,30 mL; 1,58 mmol) foi adicionado a esta solução.



Rendimento: 92% (0,080 g).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO) δ , ppm: 9,23 (d; $J = 8,8$ Hz; 8H); 8,52 (d; $J = 9,4$ Hz; 8H); 3,70 (d; $J = 8,7$ Hz; 24H).

UV-Vis (PBS): λ_{abs} (ϵ), nm 417; 550; 587.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.¹⁸

Referências

- ¹Burrows H.D., Pereira M.M., Química: Síntese e Estrutura- Uma abordagem prática, Escolar Editora, 2006.
- ²Gerhard B., Waltraud P., Monika I., Mohammad A.T., Renate D., Reinhold R., *Monatshefte für Chemie*, **1985**, 116, 1209-1220.
- ³Tang X., Huang L., Qi C., Wu X., Wu W., Jiang H., *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 6102-6104.
- ⁴Johnstone R.A.W., Nunes M.L.P.G., Pereira M.M., Gonçalves A.M.R., Serra A., *Heterocycles* **1996**, 43, 1423-1437.
- ⁵J. C. P. Grancho, M. M. Pereira, M. da G. Miguel, A. M. Rocha Gonsalves, H. D. Burrows. *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75, 249–256.
- ⁶Silva M., Fernandes A., Bebiano S.S., Calvete M.J.F., Ribeiro M.F., Burrows H.D., Pereira M.M., *Chem Commun (Camb)*, **2014**, 50, 6571-6573.
- ⁷Giraudeau A., Callot H.J., Jordan J., Ezhar I., Gross M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 3857-3862.
- ⁸Vicente M.G.H., Neves M.G.P.M.S., Cavaleiro J.A.S., *Tetrahedron*, **1996**, 37, 2, 261-262.
- ⁹Parker C. A., Rees W. T., *Analyst.*, **1960**, 1013, 587-600.
- ¹⁰Murov S.L., Carmichel I., Hug G.L., *Handbook of Photochemistry*, Dekker, USA, **1993**.
- ¹¹Arnaut L.G., Pereira M.M., Dabrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbanska K., Stochel G., Brett C.M.A., *Chem Eur. J.*, **2014**, 20, 5346-5359.
- ¹²Schmidt R., Tanielian C., Dunsbach R., Wolff. C., *J.Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1994**, 79, 11-17.
- ¹³Wolder P.K., Hudson B.S., *Biophys. J.*, **1979**, 28, 197-210.
- ¹⁴Henriques C.A, Pinto S.M.A, Aquino G.L.B, Pineiro M., Calvete M.J.F, Pereira, M.M., *ChemSusChem*, **2014**, 7, 10, 2821-2824.
- ¹⁵Tjahjono D.H., Akutsu T., Yoshioka N., Inoue H., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1472, 333-343.
- ¹⁶Lipstman S., Goldberg I., *CrystEngComm*, **2010**, 12, 52-54.
- ¹⁷Ezzeddine R., Al-Banaw A., Tovmasyan A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T., *J. Biol. Chem*, **2013**, 288, 36579-36588.
- ¹⁸Machado A.E.H., Gomes W.R., Araújo D.M.S., Miglio H.S., Ueno L.T., De Paula R., Cavaleiro J.A.S., Neto N.M. B., *Molecules*, **2011**, 16, 5807-5821.