

Rafael Tiago Pereira Martins Aroso

SÍNTESE E ESTUDO DE NOVOS FOTOSENSIBILIZADORES COM POTENCIAL PARA TERAPIA ANTIMICROBIANA

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

FCTUC

Junho de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Rafael Tiago Pereira Martins Aroso

**SÍNTESE E ESTUDO DE NOVOS
FOTOSENSIBILIZADORES COM POTENCIAL
PARA TERAPIA ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal

Orientador: Prof. Doutora Mariette Pereira

Co-orientador: Doutor Mário Calvete

Junho de 2017

Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta dissertação contou com o apoio direto ou indirecto de um conjunto de pessoas, às quais gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Mariette Pereira o meu profundo agradecimento pela orientação deste trabalho e por todo o valioso conhecimento que me transmitiu ao longo deste percurso. Apesar de ter sido por vezes demasiado determinado na tentativa de solucionar sozinho os problemas que me foram aparecendo pelo caminho, sabia sempre que poderia contar com a sua ajuda para a resolução dos mesmos.

Ao Doutor Mário Calvete pela co-orientação deste trabalho e por toda a experiência que me transmitiu ao longo deste ano relativamente às, por vezes “teimosas”, ftalocianinas. Muito obrigado pela informalidade de como nos relacionamos, pelas conversas sempre bem-dispostas e por ter sempre demonstrado disponibilidade em me ajudar.

Ao Professor Doutor Luís Arnaut por me ter despertado o gosto pela Química Medicinal quando ainda completava o meu ensino secundário na Escola Secundária Infanta Dona Maria. Obrigado por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo destes anos enquanto seu aluno e pela sua valiosa ajuda e espírito crítico na interpretação dos resultados de fotofísica e fotoquímica deste trabalho.

Ao Doutor Carlos Serpa pela enorme disponibilidade na explicação de alguns conceitos de fotofísica e fotoquímica e pelo auxílio no manuseamento dos aparelhos.

My greatest gratitude to Dr. Janusz M. Dabrowski, Barbara Pucelik and Robert Paczynski of the Jagiellonian University of Krakow for the invaluable ongoing cooperation with our group and for providing all the biological tests that are presented in this thesis, which otherwise wouldn't be possible to obtain.

Aos meus colegas do grupo de Catálise e Química Fina: César, Fábio, Giusy, Liliana, Lucas, Rui, Sara Almeida e Sara Pinto pelo companheirismo, pelos bons momentos passados e por toda a ajuda prestada. À Vanessa, a minha companheira na área da química das ftalocianinas, pelo especial espírito de entajuda que se estabeleceu entre nós e que nos permitiu lidar com as injustiças e frustrações que ela nos trazia.

À Carolina pelas nossas longas conversas e incessante troca de ideias que me enriqueceram a nível pessoal e profissional. Espero ter contribuído e continuar a contribuir para o teu trabalho tanto quanto contribuíste para o meu. Sempre pude contar contigo para me ouvires e me levantares a moral nos muitos percalços que ocorreram ao longo deste ano e tenho a certeza que tudo teria sido muito mais difícil sem o teu apoio.

Ao André, o campeão da boa-disposição, que durante o pouco tempo passado no nosso laboratório trouxe uma alegria contagiante capaz de me animar mesmo naqueles dias em que as coisas não corriam tão bem.

Ao Alexandre e à Catarina Lobo por toda a ajuda nas medições de fluorescência.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra e, em especial, ao Pedro por toda a sua disponibilidade na obtenção dos espectros de RMN e pela preciosa ajuda na interpretação dos espectros de RMN 2D.

Aos meus amigos por todo o apoio e em especial ao João pelas nossas “bilharadas” de sábado.

Aos meus familiares sem os quais dificilmente este trabalho seria possível e em especial aos meus pais por sempre me apoiarem nesta minha decisão de estudar Química e me terem ajudado em tudo o que necessitei durante estes 5 anos. Um agradecimento especial ao meu irmão por me ter ajudado sempre, pelas inúmeras boleias que me deu e vezes que consertou ambos os meus computadores de trabalho.

Índice

Índice.....	i
Abreviaturas e símbolos	iii
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Nomenclatura.....	xi
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1 – Resistência antimicrobiana.....	2
1.1.1 – Perspetiva histórica.....	2
1.1.2 – Mecanismos de resistência.....	3
1.2 – Macro ciclos tetrapirrólicos	5
1.2.1 – Ftalocianinas	7
1.3 – Uso de fotossensibilizadores em PDI.....	9
1.3.1 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica.....	10
1.3.2 – Obstáculos e alvos biológicos em PDI	11
1.3.3 – Características importantes para um fotossensibilizador.....	14
1.4 – Proposta de trabalho.....	17
1.5 – Referências	19
Capítulo 2: Síntese e caracterização estrutural de metalofalocianinas.....	27
2.1 – Síntese e modelação dos precursores das ftalocianinas.....	27
2.1.1 – Síntese do 4-(1H-imidazol-1-il)ftalonitrilo.....	28
2.1.2 – Síntese do 4-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)ftalonitrilo	33
2.2 – Síntese de ftalocianinas tetrassubstituídas com o grupo imidazol.....	38
2.2.1 – Síntese da metalofalocianina de Zn(II)	38
2.2.2 – Síntese da metalofalocianina de In(III)	41
2.2.3 – Síntese da metalofalocianina de Al(III).....	43
2.3 – Cationização das metalofalocianinas.....	45
2.3.1 – Metalofalocianinas tetracatiónicas	45
2.3.1 – Metalofalocianina octacatiónica de Zn(II).....	48
2.4 – Conclusão	50
2.5 – Referências	51
Capítulo 3: Estudos fotofísicos, fotoquímicos e biológicos das metalofalocianinas sintetizadas	55
3.1 – Espectroscopia de UV-Vis	57
3.1.1 – Análise dos espectros de UV-Vis.....	57

3.1.2 – Determinação dos coeficientes de absorção molar	61
3.2 – Espectroscopia de fluorescência.....	62
3.2.1 – Espectros de excitação de fluorescência	63
3.2.2 – Espectros de emissão de fluorescência e determinação dos respectivos rendimentos quânticos	66
3.3 – Determinação do rendimento quântico de oxigênio singuleto.....	69
3.4 – Estudos biológicos.....	72
3.5 – Referências	76
Capítulo 4: Conclusão.....	79
4.1 – Referências	82
Capítulo 5: Experimental.....	83
5.1 – Solventes e reagentes.....	83
5.2 – Instrumentação e metodologia.....	83
5.3 – Síntese e caracterização estrutural de compostos.....	86
5.3.1 – Modelação de ftalonitrilos.....	86
5.3.2 – Síntese de metaloftalocianinas neutras	87
5.3.3 – Tetracationização de metaloftalocianinas	89
5.3.4 – Octacationização da metaloftalocianina de Zn(II)	91
5.4 – Referências	93

Abreviaturas e símbolos

[M]⁺- íão molecular

[M+H]⁺- íão molecular protonado

A - Absorvância

A₁ – Fator pré-exponencial

A_{Ref} – Absorção da referência

c – Concentração

CCC – Cloreto de (2-cloroetil)trimetilamônio

ci – Conversão interna

cis – Cruzamento intersistemas

COSY – Espectroscopia de correlação (do inglês *correlation spectroscopy*)

d – Duplete

Da - Dalton

DBN - 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene

DBU - 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DCM - Diclorometano

dd – Duplo duplete

DEPT - Incremento sem Distorção por Transferência de Polarização (do inglês *Distortionless enhancement by polarization transfer*)

DMAE - Dimetilaminoetanol

DMF – Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

e⁻ - elétron

EI – Impacto eletrônico (do inglês *electron impact*)

ESI – Ionização por *electrospray* (do inglês *electrospray ionization*)

F – Integral da emissão de fluorescência da amostra

FDA – *Food and Drug Administration*

F_{Ref} – Integral da emissão de fluorescência da referência

HMBC - Correlação heteronuclear de múltiplas ligações (do inglês *Heteronuclear multiple bond coherence*)

HOMO - Orbital molecular ocupada de maior energia (do inglês *highest occupied molecular orbital*)

HSQC - Correlação heteronuclear de quantum-simples (do inglês *Heteronuclear single quantum coherence*)

I – Intensidade de luz após passar pela amostra

I_0 – Intensidade de luz antes de passar pela amostra

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

J – Constante de acoplamento

l – Comprimento ótico

LPS - lipopolissacarídeos

LUMO - Orbital molecular desocupada de menor energia (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*)

m - Multiplete

m/z – Razão massa/carga

MeOH - Metanol

MS – Espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*)

NOESY – Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (do inglês *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*)

OMP – Proteínas da membrana externa (do inglês *outer membrane proteins*)

PcH₂ – Ftalocianina de base livre

PcM – Metaloftalocianina

PDI – Inativação fotodinâmica (do inglês *photodynamic inactivation*)

PDT – Terapia fotodinâmica (do inglês *photodynamic therapy*)

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

q – Quarteto

R_f – Fator de retenção (do inglês *retention factor*)

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear de próton

RMN ¹H-¹³C - Ressonância magnética nuclear bidimensional de acoplamento próton-carbono

RMN ¹H-¹H – Ressonância magnética nuclear bidimensional de acoplamento próton-próton

RMN 2D – Ressonância magnética nuclear bidimensional

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

rv – Relaxação vibracional

S - Declive da reta que relaciona o fator pré-exponencial do decaimento do oxigênio singleto com a intensidade do laser para a amostra

s - Singuleto

S_0 – Estado singuleto fundamental

S_1 – Estado singuleto excitado de primeira ordem

sl – Singuleto largo

S_n – Estado singuleto excitado de ordem n

S_N2 – Substituição nucleofílica bimolecular

S_{Ref} – Declive da reta que relaciona o fator pré-exponencial do decaimento do oxigênio singuleto com a intensidade do laser para a referência

T - Transmitância

t - Triplete

t.a. – Temperatura ambiente

T_1 – Estado triplete excitado de primeira ordem

TFA – Ácido trifluoroacético (do inglês *trifluoroacetic acid*)

THF - Tetrahydrofurano

TLC – Cromatografia de camada fina (do inglês *thin layer chromatography*)

TMS – Tetrametilsilano

TOF – Tempo de voo (do inglês *time of flight*)

UV-Vis – Espectroscopia de ultravioleta-visível

$ZnPC_{ref}$ – Metalofalocianina de Zn(II) não substituída

Φ_F – Rendimento quântico de fluorescência

Φ_F^{Ref} – Rendimento quântico de fluorescência da referência

Φ_Δ – Rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto

ϵ - Coeficiente de absorvidade molar

η_{Ref} – Índice de refração da referência

η – Rendimento/Índice de refração da amostra

λ - Comprimento de onda

Resumo

O crescente aparecimento de casos de bactérias multi-resistentes, para os quais a indústria farmacêutica oferece poucas soluções, tem levado à necessidade de síntese de novas entidades químicas com mecanismos de ação preferencialmente diferentes aos actualmente disponíveis no mercado. A inativação fotodinâmica (PDI) combina o uso de um fotossensibilizador com uma fonte de luz apropriada, tendo-se revelado uma alternativa terapêutica promissora. As ftalocianinas, pelas suas boas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, nomeadamente no que diz respeito à sua elevada absorção na janela fototerapêutica (650-900 nm) e elevado rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto têm sido estudadas em processos de inativação de microorganismos, nos quais os seus derivados catiónicos demonstram maior atividade e seletividade. O trabalho apresentado nesta dissertação diz respeito à síntese, caracterização estrutural e estudos fotofísicos, fotoquímicos e biológicos de novas ftalocianinas com potencial para PDI.

No capítulo 1 são abordados a origem e os mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana. De seguida, são apresentadas as propriedades dos macrociclos tetrapirrólicos, em particular das ftalocianinas, e os mecanismos associados à PDI. São ainda discutidas as propriedades ideais para um fotossensibilizador mediante uma análise das estruturas dos alvos terapêuticos e de resultados previamente reportados na literatura.

No capítulo 2 são discutidos os métodos de síntese e caracterização estrutural de dois ftalonitrilos e oito ftalocianinas, das quais cinco são catiónicas. Esta família de metaloftalocianinas catiónicas foi idealizada com o propósito de efectuar um estudo de estrutura/propriedades e estrutura/actividade ao nível de influência de três características: tamanho da cadeia cationizante, grau de cationização e modelação do metal central. Em primeiro lugar, são explorados os métodos de modelação de ftalonitrilos a partir do 4-nitroftalonitrilo e respectiva caracterização estrutural dos produtos. Foram obtidos o 4-(1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo ($\eta = 56\%$) e o 4-(2'-metil-5'-nitro-1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo ($\eta = 54\%$) utilizando o imidazol e o 2-metil-4(5)nitroimidazol como nucleófilos, respetivamente. Partindo do ftalonitrilo substituído com o grupo imidazol, foram sintetizadas três metaloftalocianinas com Zn(II), In(III) e Al(III) mediante a sua ciclotetramerização com $Zn(OAc)_2$ (71%), $InCl_3$ (67%), e $AlCl_3$ (60%), respectivamente. Neste trabalho são ainda descritos os métodos utilizados para a cationização das três metaloftalocianinas com iodoetano e da metaloftalocianina com Zn(II) com iodoetano e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio

No capítulo 3 são exploradas as bases para a compreensão dos fenómenos fotofísicos e fotoquímicos mais relevantes em macrociclos tetrapirrólicos. Numa primeira fase são apresentados os espectros de UV-Vis de todas as metaloftalocianinas sintetizadas no capítulo 2 e discutida a influência do metal central, tamanho da cadeia cationizante e grau de cationização no máximo de

absorção e nos valores de absorvidade molar. Na sua generalidade, as metalofteralocianinas apresentaram valores de ϵ relativos à sua banda Q superiores a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com máximos de absorção a se situarem nos 677-698 nm.

Foram efetuados estudos de fluorescência através da recolha de espectros de excitação e emissão e cálculo dos rendimentos quânticos de fluorescência de todas as metalofteralocianinas sintetizadas. Os valores de Φ_F obtidos para os complexos de Al(III) foram os mais altos (0,23-0,30) e para os de In(III) os mais baixos (0,01-0,02). De seguida, foram efetuados os estudos dos valores de Φ_Δ recorrendo a um método comparativo. Os complexos de Zn(II) demonstraram maiores valores de produção de $^1\text{O}_2$ (0,56-0,72) e os complexos de Al(III) os piores resultados (0,32-0,33).

As metalofteralocianinas de Zn(II) cationizadas com iodoetano e iodoctano foram alvo de estudos *in vitro*, o que permitiu avaliar o efeito do aumento da cadeia alquílica na atividade/citotoxicidade. A metalofteralocianina de Zn(II) cationizada com a cadeia mais curta demonstrou menor citotoxicidade no escuro (viabilidade celular próxima de 100% até 10 μM) para células HeLa e HaCaT, bem como uma maior taxa de inativação de bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), tendo sido possível uma inativação completa de colónias destas bactérias com concentrações a partir de 0,1 μM .

No capítulo 4 são efetuadas as principais conclusões dos resultados apresentados nesta dissertação.

No capítulo 5 são reportados os procedimentos experimentais envolvidos na síntese e caracterização estrutural dos compostos descritos nesta dissertação, bem como os respetivos estudos fotofísicos, fotoquímicos e biológicos efetuados.

Abstract

The increasing emergence of drug multi-resistant bacteria, for which the pharmaceutical industry offers few solutions, has led to the need of the development of new chemical entities with action mechanisms preferably different to commercially available drugs. Photodynamic inactivation (PDI), which combines the use of a photosensitizer with an appropriate light source, has shown to be a promising alternative therapy. Phthalocyanines, due to their good photophysical and photochemical properties, namely regarding their high absorption in the phototherapeutic window (650-900 nm) and high singlet oxygen quantum yield, have been studied for the inactivation of microorganisms, where their cationic derivatives have shown higher activity and selectivity. The work presented in this dissertation concerns the synthesis, structural characterization and photophysical, photochemical and biological studies of new phthalocyanines with potential for use in PDI.

In chapter 1 the origin and the mechanisms involved in the antimicrobial resistance are explored. Then, some properties of tetrapyrrolic macrocycles are presented, particularly regarding phthalocyanines and their potential application in PDI. Finally, some of the ideal properties of photosensitizers are discussed by means of a structural analysis of the therapeutic targets and results previously reported in literature.

In chapter 2, we describe the synthesis and structural characterization of two phthalonitriles and eight phthalocyanines, from which five are cationic. This family of cationic metallophthalocyanines allowed to perform studies of structure/properties and structure/activity, regarding the influence of three structural features: size of cationizing chain, degree of cationization and central metal modulation. Firstly, the methods of phthalonitrile modulation starting from 4-nitrophthalonitrile are explored and the structural characterization of the respective products is discussed. Using imidazole and 2-methyl-4(5)nitroimidazole as nucleophiles, we obtained 4-(1'H-imidazol-1'-yl)phthalonitrile ($\eta = 56\%$) and 4-(2'-methyl-5'-nitro-1'H-imidazol-1'-yl)phthalonitrile ($\eta = 54\%$), respectively. Starting with the imidazole-containing phthalonitrile, three metallophthalocyanines were synthesized with Zn(II), In(III) and Al(III) through its cyclotetramerization with $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (71%), InCl_3 (67%), e AlCl_3 (60%), respectively. In this work the methods used for the cationization of the three metallophthalocyanines with iodoethane and the Zn(II) metallophthalocyanine with iodoctane and (2-chloroethyl)trimethylammonium chloride are described.

In chapter 3, we explore the fundamentals for understanding the most relevant photophysical and photochemical phenomena of tetrapyrrolic macrocycles. Initially, the UV-Vis spectra of all metallophthalocyanines, whose synthesis is described in chapter 2, are presented as well as studies of the influence of the central metal, the size of the cationizing chain and the degree

of cationization in the absorption maximum and molar absorption coefficients are discussed. In general, the metallophthalocyanines displayed values of ϵ relating to their Q band higher than $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, with the absorption maxima in the range of 677-698 nm.

Next, fluorescence studies of all synthesized metallophthalocyanines were performed by means of excitation and emission spectra collection and fluorescence quantum yield calculation. The values of Φ_F obtained for the complexes with Al(III) were the highest (0.23-0.30) and with In(III) the lowest (0.01-0.02). Then, calculations of Φ_Δ were performed using a comparative method. The Zn(II) complexes showed generally higher production of $^1\text{O}_2$ (0.56-0.72) and the Al(III) complexes the worst results (0.32-0.33).

The Zn(II) metallophthalocyanines cationized with iodoethane and iodoctane were subjected to *in vitro* studies, to evaluate the effect of the alkylic chain in the activity/cytotoxicity. The Zn(II) metallophthalocyanine cationized with iodoethane showed less dark cytotoxicity (cellular viability close to 100% for concentrations until 10 μM) to HeLa and HaCaT cell lines, as well as a higher rate of inactivation of gram-negative cells (*E. coli* and *P. aeruginosa*), having displayed full inactivation of colonies in concentrations as low as 0.1 μM .

In chapter 4 the main conclusions of the results presented in this thesis are drawn.

In chapter 5 the experimental procedures involved in the synthesis and structural characterization of all the compounds described in this dissertation, as well as their respective photophysical, photochemical and biological studies are presented.

Nomenclatura

Nesta dissertação, salvo algumas exceções, foram seguidas as recomendações da IUPAC para a numeração e nomeação dos compostos.

Para os precursores de ftalocianinas sintetizados nesta tese, é utilizado o nome trivial “ftalonitrilo”¹ em oposição ao nome proposto pela IUPAC “1,2-dicianobenzeno”. O sistema de numeração utilizado nesta dissertação para ftalonitrilos encontra-se de acordo com a nomenclatura IUPAC para anéis aromáticos (Figura I).²

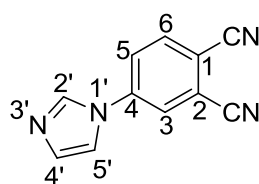


Figura I – Sistema de numeração utilizado para derivados de ftalonitrilos e imidazol.

A numeração utilizada para as ftalocianinas é efetuada de acordo com as regras da IUPAC (Figura II).³

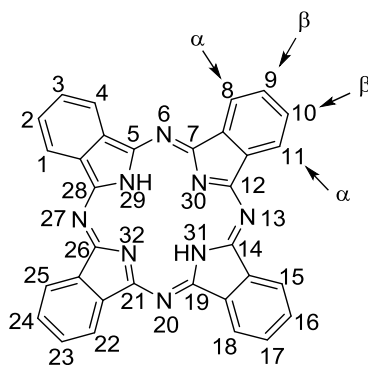


Figura II – Sistema de numeração IUPAC utilizado para ftalocianinas.

Todos os átomos são numerados com exceção dos carbonos de fusão entre o anel pirrólico e o anel benzênico. A numeração é iniciada num carbono do anel benzênico vicinal a um carbono de fusão entre o anel pirrólico e o anel benzênico. Após a numeração dos átomos que constituem o exterior do macrociclo (1-28), é efetuada a numeração dos quatro azotos pirrólicos interiores (29-32). Por simplicidade, as posições internas e externas do anel benzênico são muitas vezes denominadas de posições α e β , respetivamente.

Como todas as ftalocianinas sintetizadas neste trabalho constituem uma mistura de quatro isómeros posicionais, as posições alternativas dos grupos substituintes ocupadas em cada isômero são indicadas entre parêntesis. A título de exemplo, a molécula apresentada na Figura III será nomeada de 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrametilftalocianato de zinco(II).

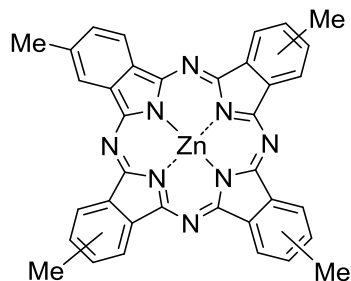


Figura III – Estrutura da 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrametilftalocianato de zinco(II).

- [1] Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors A2 - Kadish, Karl M. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 1-60.
- [2] Tomé, A., *Introdução à Nomenclatura dos Compostos Orgânicos*, Escolar Editora: Lisboa, **2010**
- [3] Merritt, J. E.; Loening, K. L. *Pure & Appl. Chem.*, **1979**, *51*, 2251-2304.

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas, conheceram-se importantes desenvolvimentos ao nível do tratamento de determinadas patologias, particularmente de tumores¹ e infeções virais.² A contrastar com estes avanços está o tratamento de infeções bacterianas, que tem sofrido um retrocesso preocupante.³ O surgimento de novas estirpes bacterianas multirresistentes constitui um grave problema mundial de saúde pública e anuncia o aproximar do fim da “era de ouro” dos antibióticos.⁴ Segundo um relatório recente da OMS, existem 12 famílias de bactérias resistentes para as quais é urgente a investigação e desenvolvimento de novos antibióticos.⁵ Estas bactérias já são atualmente responsáveis por um considerável encargo clínico e financeiro para os sistemas nacionais de saúde.⁶ Portugal ocupa um dos lugares de topo em termos de resistência a antibióticos a nível europeu, particularmente no que diz respeito à taxa de resistência à meticilina da espécie *Staphylococcus aureus* que, segundo dados da Direção Geral de Saúde, tem subido gradualmente em quase todos os anos desde 2000, situando-se atualmente em valores próximos dos 50%.⁷ Algumas projeções indicam que, se não forem tomadas quaisquer medidas, em 2050 ocorrerá uma mortalidade mundial anual de 10 milhões de pessoas devido a infeções multirresistentes.⁸

O uso intensivo e negligente de antibióticos aliado à falta de interesse da indústria farmacêutica em desenvolver novos fármacos tem levado ao esgotamento das soluções terapêuticas para infeções.⁹ A penicilina, outrora um antibiótico revolucionário, perdeu eficácia ao longo dos anos, fruto do aparecimento de inúmeras estirpes bacterianas com mecanismos de resistência à sua ação.¹⁰ A mesma tendência verifica-se para a maioria dos antibióticos descobertos posteriormente. Existe, assim, a necessidade de alterar o paradigma do tratamento de doenças infecciosas desenvolvendo fármacos com novos mecanismos de ação e, idealmente, menos passíveis de gerar resistência. Nas últimas décadas, a inativação fotodinâmica (PDI) tem-se revelado uma modalidade de tratamento promissora para infeções localizadas.¹¹ Esta terapia demonstrou boa capacidade de inativação de algumas estirpes de bactérias resistentes a antibióticos comercialmente disponíveis e o seu mecanismo de ação dificulta o desenvolvimento de resistência.¹²

Com o propósito de contribuir para esta necessidade de novos agentes antimicrobianos, o trabalho apresentado nesta dissertação visa a síntese e estudo de novas ftalocianinas utilizando heterociclos cationizáveis, mais concretamente o grupo imidazol. Este tipo de estruturas catiónicas já demonstrou bons resultados na inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes.¹³

1.1 Resistência antimicrobiana

1.1.1 Perspetiva histórica

A era moderna dos antibióticos iniciou-se em 1928 com a descoberta da penicilina (Figura 1.1) por Alexander Fleming.

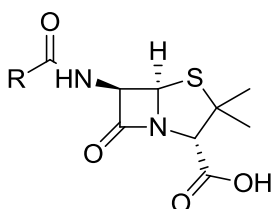


Figura 1.1 - Estrutura genérica da família das penicilinas.

Este fármaco contribuiu em grande medida para o controlo das infeções bacterianas durante a II Guerra Mundial, no entanto, a sua eficácia foi diminuindo ao longo das décadas subsequentes devido ao aparecimento de estirpes bacterianas resistentes.⁹ A necessidade de novos antibióticos levou à investigação e desenvolvimento de novas classes, particularmente através do estudo de micro-organismos do solo.¹⁴ A partir destes compostos pioneiros, foi possível desenvolver derivados com propriedades melhoradas no que diz respeito ao seu espectro de ação e atividade antimicrobiana. Apesar de todos estes esforços, verifica-se o aparecimento de resistência antimicrobiana transversal à quase totalidade dos antibióticos alguns anos após a sua descoberta ou introdução no mercado,¹⁵ como é ilustrado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Cronograma da descoberta, comercialização e identificação dos primeiros casos de resistência de um grupo exemplificativo de antibióticos pertencentes a diferentes classes.

Exemplo de antibiótico (classe)	Descoberta	Introdução no mercado	Identificação de resistência
Penicilina (β -lactâmicos)	1928	1938	1945
Estreptomicina (Aminoglicosídeos)	1943	1946	1946
Eritromicina (Macrólidos)	1948	1951	1955
Clortetraciclina (Tetraciclina)	1944	1952	1950
Vancomicina (Glicopeptídeos)	1953	1958	1960
Ciprofloxacina (Quinolonas)	1961	1968	1968
Linezolida (Oxazolidinonas)	1955	2000	2001

A sua utilização clínica generalizada levou inclusive ao desencadeamento de resistência a fármacos cuja indução em laboratório era difícil, como é o caso da vancomicina.⁹ No caso dos antibióticos β -lactâmicos, foram desenvolvidas combinações β -lactâmico/inibidor de β -lactamase, que permitem a administração destes fármacos mesmo em casos de infecções resistentes à sua ação por produção de β -lactamase.¹⁶ Apesar disso, esta estratégia poderá revelar-se ineficaz a médio prazo por desenvolvimento de mecanismos de resistência adicionais.¹⁷

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos antibióticos e, particularmente, de novas classes farmacológicas tem sido escasso. Desde 2000, trinta novos antibióticos foram introduzidos no mercado, dos quais cinco são os primeiros na sua respetiva classe.¹⁸ No entanto, qualquer uma das novas classes descobertas apenas tem eficácia contra bactérias Gram-positivas. Este reduzido espectro de ação também se verifica num novo fármaco em estudo denominado *teixocobactin*, que aparenta ter baixa propensão para gerar resistência.¹⁹ Para o tratamento de bactérias Gram-negativas, apenas foram introduzidos no mercado fármacos pertencentes a classes já conhecidas e novas combinações β -lactâmico/inibidor de β -lactamase.²⁰ Tendo em conta que as únicas contribuições no século XXI são baseadas em derivados de fármacos para os quais casos de resistência são amplamente conhecidos, existe uma urgência acrescida no desenvolvimento de moléculas eficazes contra este tipo de bactérias.

Atualmente, a aprovação de novos medicamentos necessita de um conjunto de estudos rigorosos e morosos, no entanto existem algumas características particulares dos antibióticos que estabelecem barreiras adicionais à sua investigação e desenvolvimento.⁹ O primeiro fator deve-se ao elevado desafio em desenvolver moléculas eficazes contra bactérias Gram-negativas que, pelas suas características morfológicas e fisiológicas, apresentam mecanismos intrínsecos de resistência adicional a antibióticos. Adicionalmente, existem fatores financeiros relacionados com o facto de os antibióticos serem tipicamente administrados durante curtos períodos de tempo, ao contrário dos fármacos para doenças crónicas. Além disso, a existência de novos antibióticos para os quais ainda exista uma baixa taxa de resistência faz com que a sua utilização seja excecional e altamente controlada. Todos os pontos enumerados fazem com que o retorno financeiro do desenvolvimento de antibióticos seja baixo quando comparado com fármacos para outras categorias terapêuticas.²¹ Dado que o investimento em novos medicamentos depende essencialmente do potencial retorno financeiro para a indústria farmacêutica, não é de estranhar o fraco interesse no desenvolvimento de novos antibióticos, mesmo considerando o benefício social a ele associado.

1.1.2 Mecanismos de resistência

A resistência antimicrobiana resulta da criação de mecanismos de tolerância²² à ação tóxica de um agente e, como tal, é favorecida pela utilização excessiva e indevida de antibióticos para o

tratamento de doenças infecciosas tanto em humanos como em animais.^{4c, 9, 23} As bactérias são dotadas de uma considerável plasticidade genética, que lhes confere capacidade de resposta a uma elevada gama de ameaças do meio, nas quais estão incluídos os antibióticos.²⁴ A resistência antimicrobiana pode ser explicada com base em três tipos de estratégias.^{22c} Por um lado, estes microrganismos podem ter uma resistência intrínseca a um determinado fármaco, como consequência de características estruturais e funcionais inerentes à própria espécie. Tal acontece, por exemplo, quando o microrganismo não possui o alvo do fármaco. As outras duas estratégias devem-se a fenómenos evolutivos que podem ser: i) mutações em genes que comprometem a interação do fármaco com o seu alvo; ii) aquisição de genes que conferem resistência por via da transferência horizontal de genes.

Numa população de indivíduos suscetíveis a um determinado agente tóxico, a aquisição de uma mutação que confere a um subgrupo um maior grau de tolerância levará a que, na presença desse agente, a população suscetível seja eliminada, deixando esse subgrupo resistente que posteriormente se irá multiplicar e formar uma população resistente.^{22d} Assim, a elevada taxa de mutação das bactérias combinada com o seu rápido crescimento resulta numa rápida seleção das estirpes e espécies mais bem adaptadas, ou seja, aquelas que possuem mecanismos capazes de resistir a um determinado antibiótico. A nível molecular, estas mutações podem alterar a atividade de antibióticos através de três mecanismos:^{22c}

- i) Diminuição da acessibilidade ao alvo, que pode ocorrer por diminuição do influxo ou por aumento do efluxo;
- ii) Modificações ao nível do alvo do antibiótico via mutações ou proteção por parte de outras estruturas;
- iii) Modificação direta dos antibióticos, nomeadamente através de reações de hidrólise e de transferência de grupos químicos.

Estas mutações podem posteriormente ser transferidas entre bactérias por um mecanismo denominado de transferência horizontal de genes.²⁵ Dado que vários antibióticos são obtidos de fontes naturais, bactérias que vivam no mesmo meio terão genes de resistência que posteriormente podem transferir a outras bactérias clinicamente relevantes. O mesmo acontece com as bactérias benígnas da flora intestinal que, ao estarem expostas à ação de antibióticos, desenvolvem mecanismos de resistência que podem transferir em contacto com bactérias patológicas, algo passível de acontecer em ambiente hospitalar.²⁴

No âmbito da resistência antimicrobiana, é necessário dar uma particular atenção às infeções nas quais as bactérias se encontram organizadas em biofilmes.²⁶ Estas estruturas são constituídas por aglomerados de bactérias embebidas numa matriz de polissacarídeos, proteínas e DNA. São muitas vezes responsáveis por infeções crónicas, já que apresentam mecanismos adicionais de resistência a antibióticos e desinfetantes, bem como células do sistema imunitário do

hospedeiro.²⁷ Alguns autores demonstraram um grau de inativação promissor de determinadas culturas de biofilmes utilizando fotossensibilizadores,²⁸ nos quais se incluem as ftalocianinas.²⁹

De modo a evitar o surgimento de resistência antimicrobiana, é necessário alterar o paradigma do desenvolvimento de antibióticos, já que fármacos que interajam seletivamente com um determinado alvo terapêutico, algo que acontece com a maioria dos antibióticos, irão mais facilmente desencadear mecanismos de resistência. Um antibiótico ideal, para além de uma baixa toxicidade, teria de ser capaz de atuar em múltiplos alvos, de modo a que mutações pontuais não fossem capazes de resultar numa total ineficácia do fármaco.¹⁵ Na tentativa de encontrar fármacos que preencham estes requisitos, tem sido estudada a aplicabilidade de macrociclos tetrapirrólicos para o tratamento de infeções localizadas.³⁰

1.2 Macrociclos tetrapirrólicos

Os macrociclos tetrapirrólicos são uma classe de compostos que desempenha papéis vitais e diferenciados em organismos vivos, desde os mais simples aos mais complexos.³¹ As porfirinas estão presentes no grupo heme dos glóbulos vermelhos, sendo responsáveis pelo transporte de oxigénio;³² as clorinas são o componente principal fotossensitivo dos cloroplastos e estão envolvidos na transformação da luz em energia;³³ as bacterioclorinas podem ser observadas em algumas bactérias fototróficas, o que lhes permite absorver luz na zona do infravermelho próximo.³⁴

A investigação da interação de macrociclos tetrapirrólicos com a luz deu os primeiros passos quando Hausmann descobriu que a adição de hematoporfirina a uma cultura de paramécias as tornava sensíveis à luz e, apesar de apresentarem uma proliferação normal no escuro, eram mortas por exposição à luz solar.³⁵ Desde essa serendipidade até à atualidade, novas utilidades médicas foram descobertas³⁶ e muito conhecimento foi adquirido sobre a sua química e as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas.³⁷ Este conhecimento levou ao surgimento de outros tipos de macrociclos tetrapirrólicos (Figura 1.2) obtidos unicamente por síntese, nomeadamente porfirinas substituídas nas posições *meso*,³⁸ sub-porfirinas,³⁹ porfirazinas,⁴⁰ ftalocianinas,⁴¹ naftalocianinas⁴² e sub-ftalocianinas.⁴³ Um grande marco no desenvolvimento das suas aplicações médicas foi a aprovação do *Photofrin* pela FDA em 1995, que constituiu o primeiro fotossensibilizador tetrapirrólico com utilização em clínica.⁴⁴ A Tabela 1.2 apresenta alguns exemplos de fotossensibilizadores clinicamente relevantes.⁴⁵ Nas seções seguintes ir-se-á dar particular ênfase às ftalocianinas.

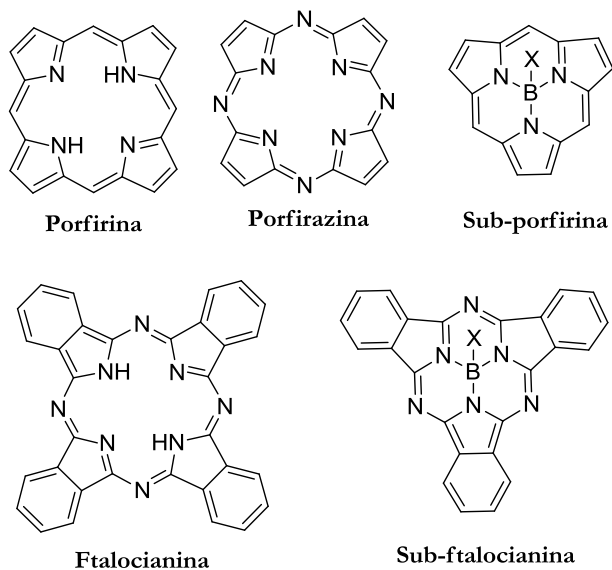
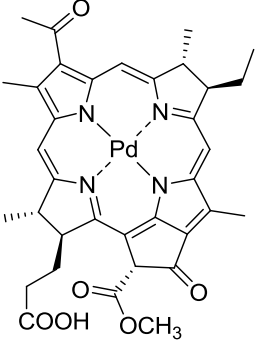
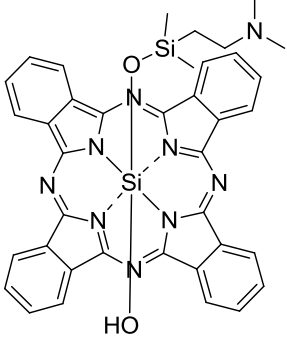
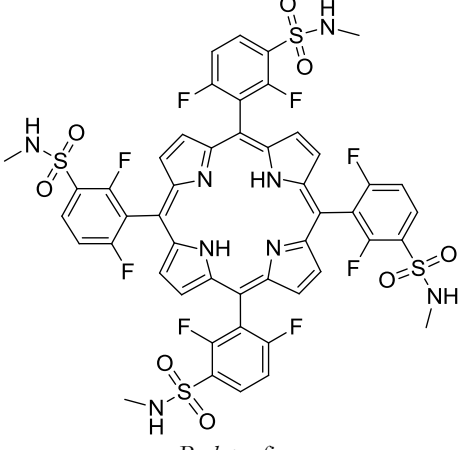


Figura 1.2 - Alguns exemplos de macrociclos tetrapirrólicos.

Tabela 1.2 - Alguns exemplos de fotossensibilizadores com utilização em clínica.

Fotossensibilizador	Indicação terapêutica
<p><i>Porfimer sodium (Photofrin)</i></p>	<p>Cancro do pulmão (FDA, 1998), esófago (FDA, 1995) e bexiga (Canadá, 1993)⁴⁶</p>
<p><i>Temoporfin (Foscan)</i></p>	<p>Cancro da cabeça e pescoço (EMA, 2001)⁴⁷</p>

Tabela 1.2 - Alguns exemplos de fotossensibilizadores com utilização em clínica. (cont.)

 <p><i>TOOKAD® Soluble</i></p>	<p>Cancro da próstata (México, 2016)⁴⁸</p>
 <p><i>Ftalocianina de silício (Pc4)</i></p>	<p>Neoplasias cutâneas (Ensaio clínico de fase I)⁴⁹</p>
 <p><i>Redaporfin</i></p>	<p>Cancro da cabeça e pescoço (Ensaio clínico de fase I/II)⁵⁰</p>

1.2.1 Ftalocianinas

As ftalocianinas são uma classe de macrociclos tetrapirrólicos sintéticos semelhantes às porfirinas. Estruturalmente distinguem-se destas pela presença de quatro anéis benzeno fundidos com os anéis pirrólicos e quatro átomos de nitrogénio nas posições *meso* em vez de quatro átomos de carbono. Isto leva a propriedades distintas, por exemplo, uma maior capacidade de coordenação com metais⁵¹ e características espectroscópicas melhoradas, já que apresentam absorção a comprimentos de onda maiores (650-750 nm), situados na janela fototerapêutica.⁵² Estas propriedades tornam a síntese e estudo destes compostos atrativa, tendo-se já desenvolvido várias estratégias sintéticas para a sua obtenção.⁵³

Desde a sua descoberta em inícios do século XX,⁵⁴ têm sido utilizadas como pigmentos industriais devido à sua intensa cor azul-verde.⁵⁵ Mais recentemente, têm-se descoberto novas aplicações,⁵⁶ nomeadamente como sensores químicos,⁵⁷ semicondutores,⁵⁸ polímeros funcionais,⁵⁹ catalisadores,⁶⁰ diagnóstico⁶¹ e terapia. Neste último campo, a sua capacidade de gerar espécies de oxigénio singuleto citotóxicas permite a sua utilização em terapia fotodinâmica (PDT),⁶² que pode ser direcionada para inativação de células tumorais⁶³ ou de agentes microbianos.⁶⁴ Neste último caso, o processo pode designar-se por inativação fotodinâmica (PDI).⁶⁵

Tipicamente, estes compostos, quando na forma de um complexo metálico, apresentam um espectro de absorção de UV-Visível (Figura 1.3) constituído por uma banda Q com absorção entre os 650-750 nm, correspondente à transição HOMO-LUMO, possuindo bandas satélite entre os 600-650 nm. Adicionalmente, apresentam uma banda mais larga mas menos intensa a aproximadamente 350 nm, que se denomina de Soret ou banda B.⁶⁶ As ftalocianinas na sua forma de base livre apresentam um desdobramento da banda Q, resultado da diminuição da simetria (passam de uma simetria D_{4h} para uma simetria D_{2h}).⁶⁷

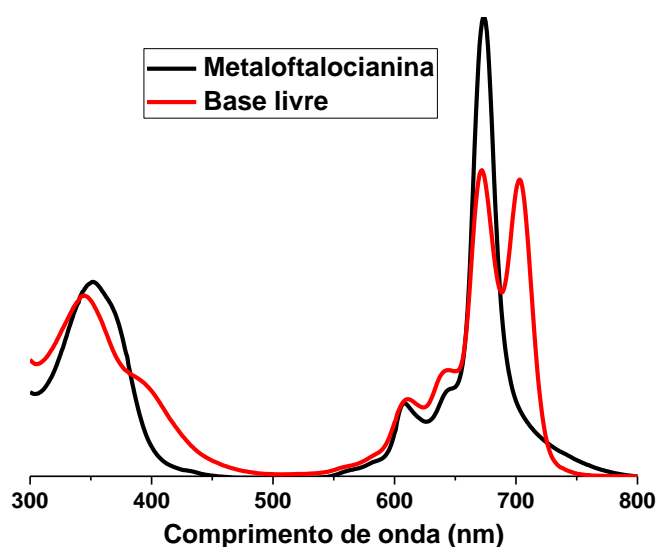


Figura 1.3 – Exemplo de espectro de UV-Vis de uma metaloftalocianina e de uma ftalocianina base livre.

Uma das propriedades características destes compostos é a sua baixa solubilidade.⁶⁸ Isto deve-se à hidrofobicidade do núcleo aromático e à sua planaridade, e tem a tendência de se empilhar (π - π *stacking*), resultando em estruturas sólidas altamente estáveis e de difícil solubilização. Esta solubilidade pode, no entanto, ser melhorada com adição de grupos funcionais simples como cadeias alquílicas, em particular cadeias volumosas,⁶⁹ ou grupos mais polares como aminas,⁷⁰ hidroxilos⁷¹ ou sulfidrilos.⁷²

A funcionalização destes compostos pode ser feita por duas vias:

i) a primeira consiste na funcionalização direta das ftalocianinas, tendo em conta a reatividade característica dos compostos aromáticos. No entanto, existem 16 posições que podem reagir, o que pode levar à formação de uma mistura de macrociclos com diferente número de substituintes ou com diferentes posições relativas.⁷³ Isto leva a rendimentos baixos e dificulta a separação do produto desejado, o que limita as áreas de utilização deste tipo de técnicas.

ii) o segundo método consiste na condensação de precursores já substituídos com os grupos desejados. Esta técnica leva a uma síntese mais seletiva em termos de grau/posição do grupo substituinte. No caso de precursores mono-substituídos, formar-se-ão ftalocianinas tetra-substituídas. No entanto, isto não exclui a formação de isómeros constitucionais (Figura 1.4), já que se parte de um precursor não simétrico. Apesar de ser teoricamente possível separar estes isómeros devido à sua diferente geometria, para a maioria das aplicações são utilizadas as misturas de isómeros. Mesmo com esta desvantagem, esta via continua a ser a preferida para a síntese de ftalocianinas funcionalizadas e, como tal, é crucial desenvolver o estudo das vias sintéticas para a obtenção destes precursores,^{53a, 74} algo que será discutido em mais detalhe no Capítulo 2.

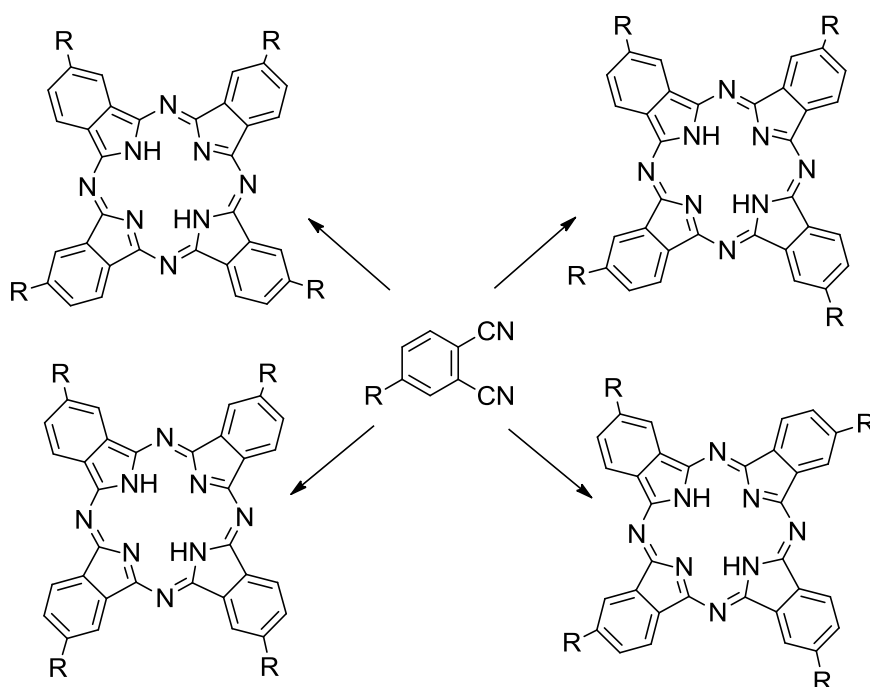


Figura 1.4 - Isómeros posicionais obtidos na ciclização de um ftalonitrilo (precursor de ftalocianina) mono-substituído.

1.3 Uso de fotossensibilizadores em PDI

A descoberta das propriedades antimicrobianas de alguns corantes fotossensíveis remonta ao início do século XX, no entanto este potencial permaneceu muitas décadas sem ser explorado dada a ineficácia dos fotossensibilizadores existentes em combater bactérias Gram-negativas e a

crença de que todas as doenças de origem microbiológica seriam tratáveis com os antibióticos clássicos.^{65, 75}

Um passo significativo na inativação de microrganismos por terapia fotodinâmica foi dado na década de 90 com a descoberta de que fotossensibilizadores catiónicos da classe das fenotiazinas,⁷⁶ porfirinas⁷⁷ e ftalocianinas⁷⁸ eram capazes de matar as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mais comuns,^{30b, 79} bem como fungos⁸⁰ e alguns vírus.⁸¹ Existem algumas características da PDI que lhe conferem vantagem relativamente aos antibióticos clássicos, nomeadamente o seu elevado espectro de ação microbicida,^{79, 82} menores casos de bactérias fotorresistentes após múltiplos tratamentos¹² e a possibilidade de ativação local do fotossensibilizador, evitando efeitos secundários sistémicos. Dado que a irradiação com luz é um processo localizado, o uso de PDI apenas parece ter potencial para infeções localizadas⁸³ em vez de infeções sistémicas como as bacteremias. Em contraste com a PDT para cancro, onde o fotossensibilizador é usualmente injetado na corrente sanguínea e se acumula no tumor, os fotossensibilizadores para infeções localizadas deverão ser entregues localmente ao local da infeção por aplicação tópica, injeção intersticial ou por aerossol.⁸⁴

1.3.1 Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica

Em terapia fotodinâmica, os fotossensibilizadores podem induzir efeitos citotóxicos por duas vias (Figura 1.5): produção de radicais (reação tipo I) ou conversão do estável oxigénio tripleto ($^3\text{O}_2$) ao altamente reativo oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) (reação tipo II).⁸⁵

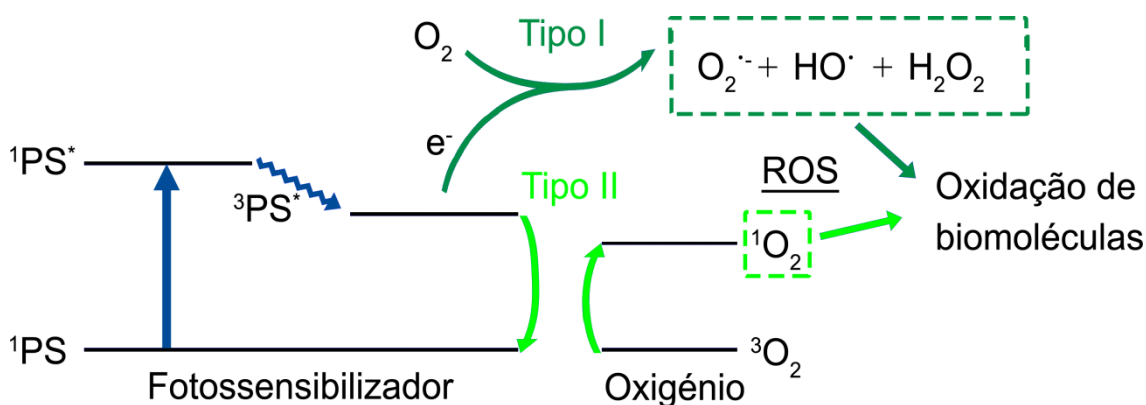
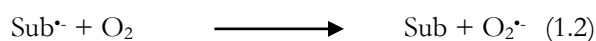


Figura 1.5 – Esquema simplificado das duas vias (Tipo I e II) envolvidas na oxidação de biomoléculas por parte de um fotossensibilizador.

Em qualquer um dos processos, ocorre primeiramente uma excitação radiativa do fotossensibilizador para o seu estado singuleto excitado ($^1\text{PS}^*$), que, por cruzamento intersistemas, origina o estado tripleto excitado ($^3\text{PS}^*$). Na via I, irá ocorrer uma transferência de eletrões entre

esta espécie e um substrato biológico gerando espécies radicalares do substrato (Sub) e do fotossensibilizador. Em meios oxigenados, a maioria destes radicais reage rapidamente com O₂, gerando o anião superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e radicais hidroxilo (HO[•]) que irão subsequentemente oxidar biomoléculas na sua proximidade. Este tipo de reação pode ser exemplificado por:



Nos processos do tipo II, a espécie ³PS* transfere energia para o oxigénio tripleto, originando oxigénio singuleto excitado, que é capaz de oxidar biomoléculas, podendo afetar um conjunto de organelos celulares, nomeadamente membranas celulares, DNA e mitocôndrias.⁸⁶ Apesar de existirem alguns estudos que demonstram uma sinergia de ambos os mecanismos em processos de terapia fotodinâmica,⁸⁷ é geralmente assumido que o mecanismo tipo II é o mais relevante no caso de porfirinas e ftalocianinas e, portanto, o oxigénio singuleto é, em geral, considerado como o agente citotóxico responsável pela inativação de células microbianas.^{65, 88}

1.3.2 Obstáculos e alvos biológicos em PDI

Para a síntese de fotossensibilizadores com boas propriedades antimicrobianas, é necessário ter em conta o tipo de alvos e obstáculos envolvidos na inativação fotodinâmica de bactérias. A Figura 1.6 apresenta de forma comparativa a morfologia das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular constituída por uma bicamada fosfolipídica interna, um polímero (peptidoglicano) que confere rigidez e polímeros aniónicos localizados à superfície (ácidos teicoicos). Esta constituição permite uma permeabilidade a macromoléculas e fotossensibilizadores, que geralmente não têm um peso molecular superior a 1000-1500 Da.⁶⁵

As bactérias Gram-negativas são caracterizadas por uma membrana externa adicional que é constituída no seu folheto interno por fosfolípidos e no seu folheto externo por glicolípidos, principalmente lipopolissacarídeos (LPS). A maioria das proteínas transmembranares (OMP) presentes nesta membrana apenas transportam pequenas moléculas como mono e dissacarídeos e aminoácidos. Adicionalmente, as cadeias acilo dos lípidos da membrana são maioritariamente saturadas, levando a um elevado empacotamento que dificulta a permeação passiva de moléculas.⁸⁹

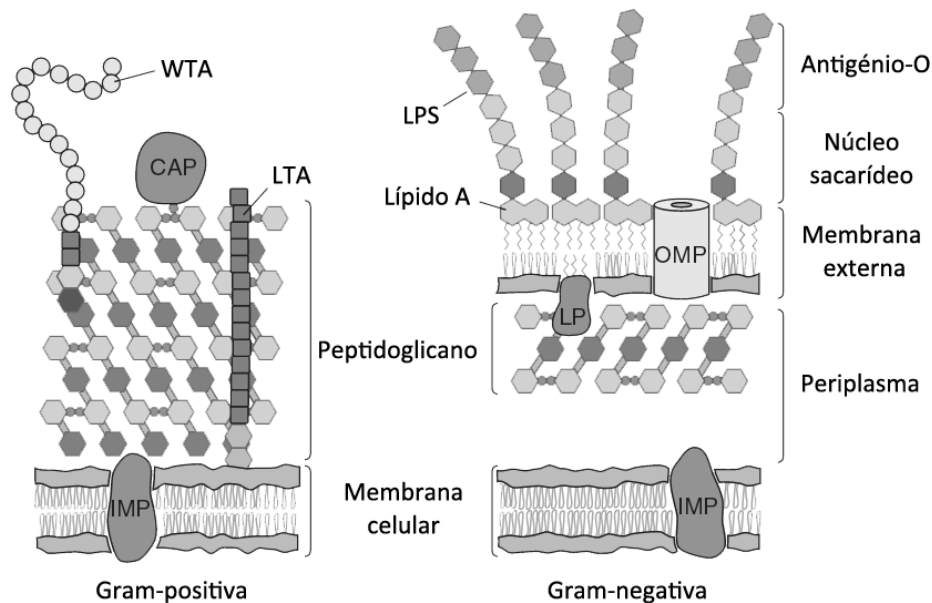


Figura 1.6- Esquema da estrutura típica das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. CAP – Proteína covalentemente ligada (*covalently attached protein*); IMP - Proteínas integrais da membrana (*integral membrane proteins*); LP – lipoproteína; LPS – lipopolissacarídeos; LTA – Ácido lipoteicoico (*lipoteichoic acid*); OMP - Proteínas da membrana externa (*outer membrane proteins*); WTA – Ácido teicoico de parede (*wall teichoic acid*). Adaptado de Silhavy, T. J. *et al.* (2010).⁸⁹

Estes atributos provocam uma diminuição acentuada da penetração de moléculas com peso molecular superior a 600-700 Da,⁹⁰ conferindo uma resistência adicional a muitos antibióticos e agentes fotossensibilizadores.⁹¹ Apesar disso, existem fotossensibilizadores de tamanhos moleculares superiores com boas propriedades microbicidas.⁹² Isto poderá dever-se a um mecanismo de internalização autopromovido, fruto de interações estabelecidas com a membrana que vão perturbar a sua organização e levar à formação de poros.⁹³

A presença de estruturas globalmente carregadas negativamente à superfície tais como os ácidos teicoicos (bactérias Gram-positivas, Figura 1.7a) e lipopolissacarídeos (bactérias Gram-negativas, Figura 1.7b), fruto da existência de grupos fosfato e carboxilato, abre a oportunidade para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seletivos. Assim, a utilização de fotossensibilizadores catiónicos permite interações eletrostáticas favoráveis com estes grupos, aproximando os fotossensibilizadores de tal forma às membranas que o oxigênio singuleto é capaz de difundir e interagir com as estruturas do micro-organismo.⁶⁵ Este tipo de interação faz com que a maioria dos fotossensibilizadores com ação antimicrobiana tenha uma localização preferencial ao nível da membrana plasmática e, como consequência, a sua ativação irá desencadear alterações morfológicas e funcionais por destruição de constituintes das membranas. Observações experimentais demonstram que a PDI provoca a inativação de várias enzimas que se encontram associadas às membranas celulares, diminuição da integridade membranar com consequente perda de gradientes iónicos e uma redução da capacidade transportadora de vários solutos essenciais para

as vias anabólicas e catabólicas.^{13b, 65, 94} A variedade de alvos e vias metabólicas afetadas torna mais difícil que células microbianas desenvolvam mecanismos que as tornem imunes a esta terapia.^{12, 65}

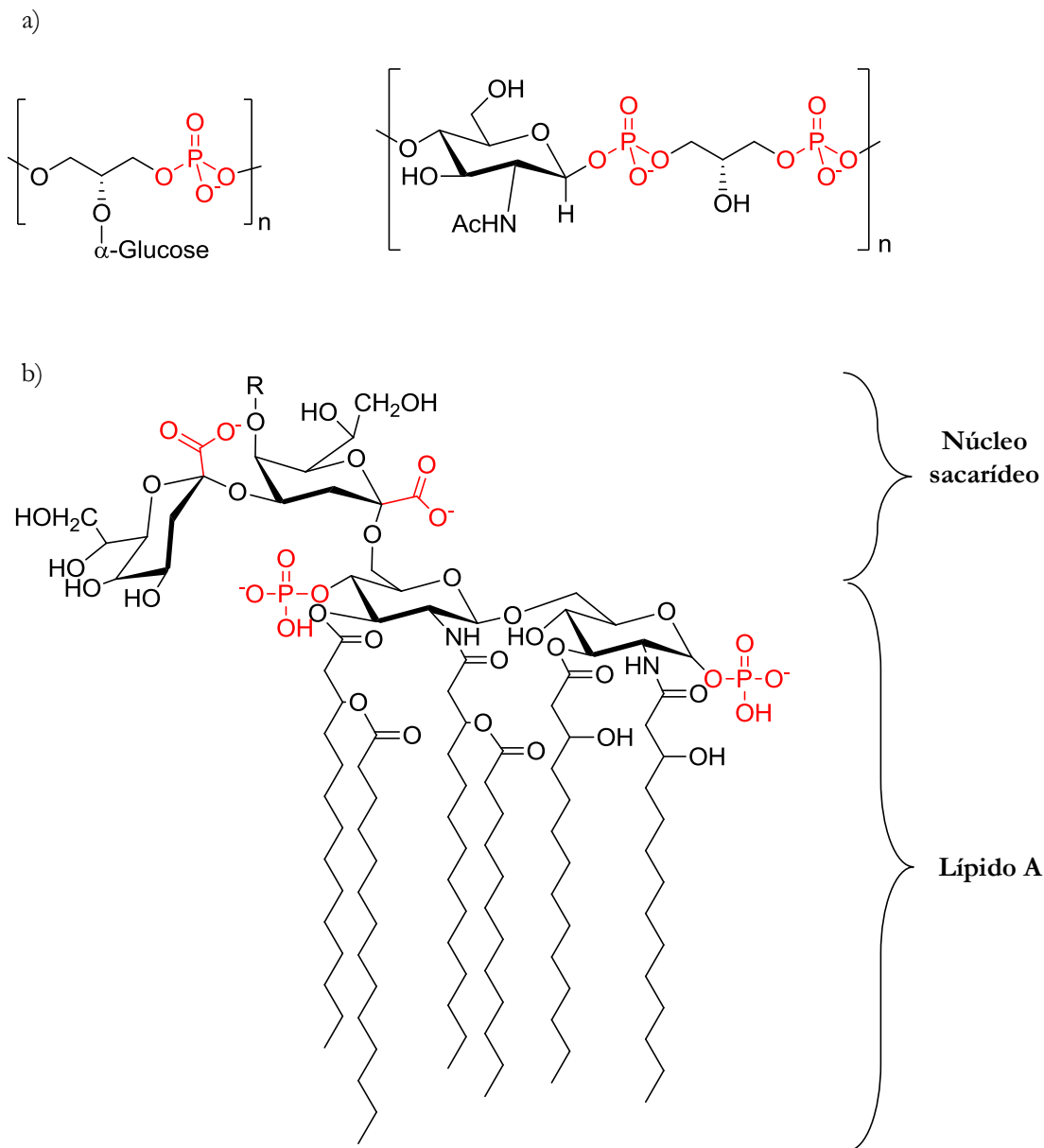


Figura 1.7 – Estruturas químicas de determinados constituintes membranares das bactérias. A vermelho estão assinalados grupos que, a pH fisiológico, se encontram na sua forma aniónica. a) Alguns exemplos de estruturas recorrentes nos polímeros de ácido teicoico (bactérias Gram-positivas);⁹⁵ b) Estrutura geral de parte do folheto externo da membrana externa das bactérias Gram-negativas.⁹⁶ Aqui está incluído o Lípido A e um núcleo sacarídeo interno ligado a cadeias de polissacarídeos (representadas genericamente por R), que constituirão o núcleo sacarídeo remanescente e o antigénio-O.

É de notar ainda que a presença de cargas positivas, para além de aumentar a atividade antimicrobiana, confere ao fotossensibilizador seletividade relativamente aos tecidos humanos. Isto deve-se ao facto de as interações eletrostáticas entre o composto e as paredes carregadas negativamente das bactérias serem muito mais fortes do que com as células humanas. Este

favorecimento cinético faz com que, em aplicações tópicas, a irradiação da zona infetada poucos minutos após a aplicação do fotossensibilizador seja capaz de causar diminuição acentuada da flora microbiana com poucos danos no tecido do hospedeiro.^{13b, 65}

1.3.3 Características importantes para um fotossensibilizador

Existe um conjunto de características ideais para um fotossensibilizador. Relativamente às suas características fotofísicas, deve possuir elevada absorção na janela fototerapêutica, (600-900 nm) e um elevado rendimento quântico de formação de espécies reativas de oxigénio quando exposto à luz.^{30a} Idealmente devem possuir um elevado espectro de ação antibacteriana, aproveitando a elevada permeabilidade de algumas paredes celulares (bactérias Gram-positivas) ou da presença de propriedades bioquímicas deste elemento estrutural (i.e. presença de paredes celulares densamente carregadas negativamente nas bactérias Gram-negativas).⁹³ Para serem eficazes nestas duas classes de micro-organismos, os fotossensibilizadores devem possuir grupos carregados positivamente.⁹⁷ Estes grupos podem ser ligandos axiais coordenados com o metal central⁹⁸ ou ser substituintes nas posições *meso* (apenas no caso das porfirinas) ou nos anéis pirrólicos do macrociclo.⁶⁵ Uma das estratégias comumente adotadas é a utilização de grupos com nitrogénios que podem ser posteriormente quaternizados por alquilação⁹⁹ (i.e. aminas alquílicas, aromáticas ou N-heterociclos).

Têm sido reportadas atividades antimicrobianas significativas para fotossensibilizadores tetra e/ou octa-substituídos com o grupo piridil,¹⁰⁰ aminofenil,^{92b} aminas alquílicas^{92d} e conjugados com cadeias peptídicas constituídas por poli-lisinas.¹⁰¹ As Tabelas 1.3 e 1.4 apresentam alguns exemplos de ftalocianinas catiónicas testadas como agentes antimicrobianos. O número e a posição das cargas positivas também parecem influenciar a sua atividade. Verifica-se que porfirinas ou ftalocianinas anfífilas com as cargas positivas restritas a uma determinada zona têm mais eficácia para bactérias Gram-positivas,^{90, 102} enquanto que os mais hidrofílicos derivados octa-catiônicos são mais eficientes para bactérias Gram-negativas.^{92b}

Tabela 1.3 – Exemplos de ftalocianinas catiónicas simétricas do tipo A₄ sintetizadas e testadas em PDI. Para simplificação das estruturas, apenas é representado um dos quatro isómeros constitucionais nas ftalocianinas que partem de precursores não simétricos.

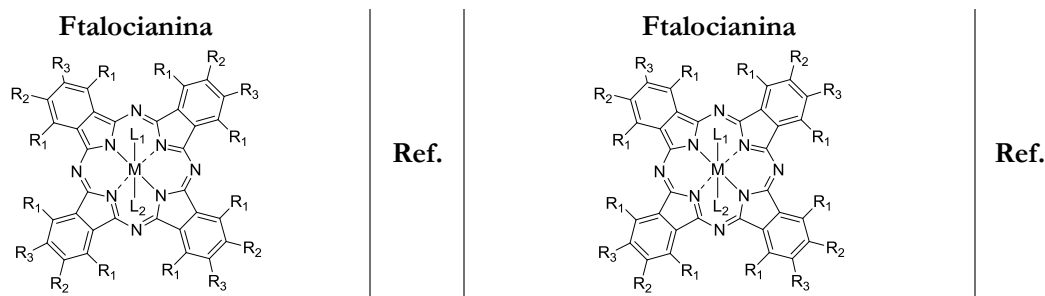


Tabela 1.3 – Exemplos de ftalocianinas catiônicas simétricas do tipo A₄ testadas em PDI (cont.)

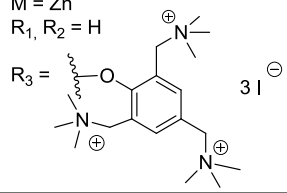
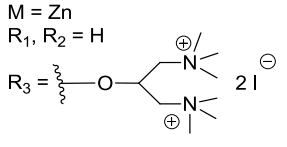
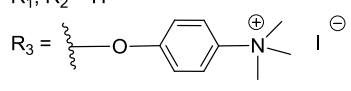
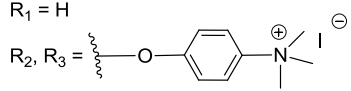
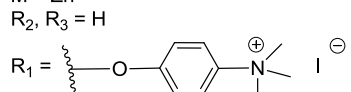
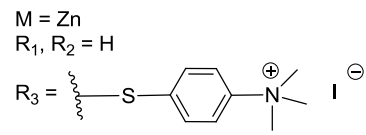
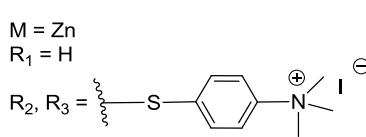
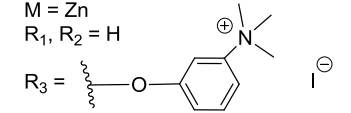
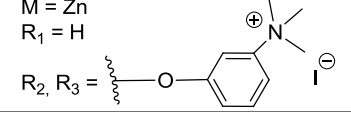
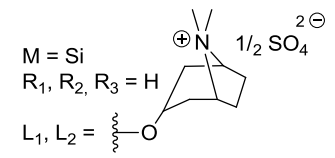
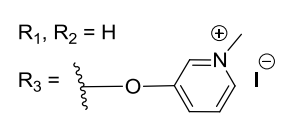
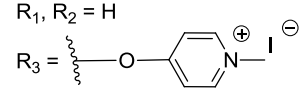
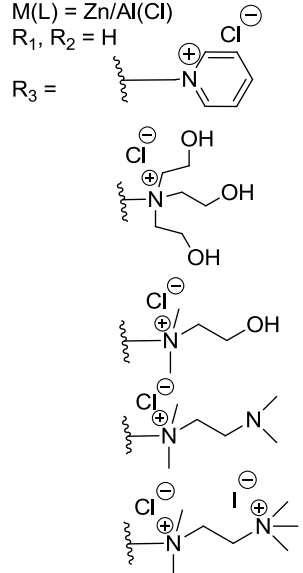
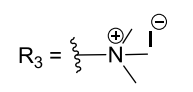
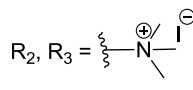
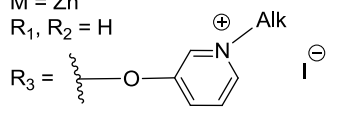
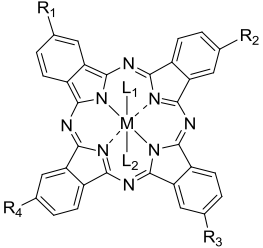
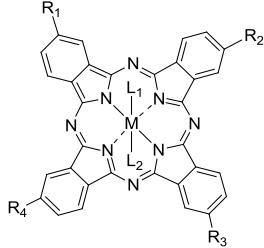
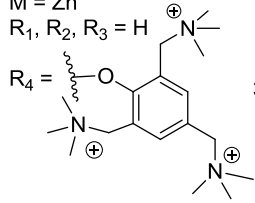
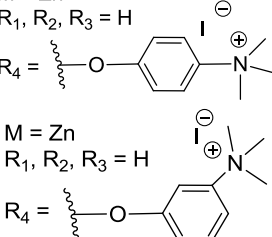
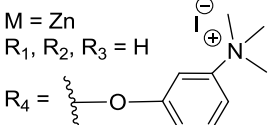
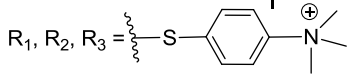
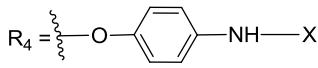
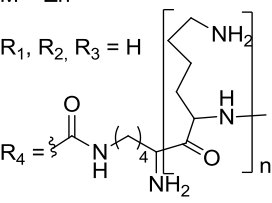
<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p>	103	<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p>	92d
<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p> <p>M = Zn R₁ = H R₂, R₃ = </p> <p>M = Zn R₂, R₃ = H R₁ = </p>	92b	<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p> <p>M = Zn R₁ = H R₂, R₃ = </p>	92c
<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p> <p>M = Zn R₁ = H R₂, R₃ = </p>	13b	<p>M = Si R₁, R₂, R₃ = H L₁, L₂ = </p>	98b
<p>M(L) = Zn/Al(OH)/In(OH)/ Ga(OH)₂/Ge(OH)₂ R₁, R₂ = H R₃ = </p>	104	<p>M(L₁) = In(Cl) R₁, R₂ = H R₃ = </p>	105
<p>M(L) = Zn/Al(Cl) R₁, R₂ = H R₃ = </p>	106	<p>M = Zn R₁ = H R₂ = F/Cl R₃ = </p> <p>M = Zn R₁ = F R₂, R₃ = </p>	107
<p>M = Zn R₁, R₂ = H R₃ = </p> <p>Alk = CH₃, (CH₂)₂CH₃, (CH₂)₅CH₃, (CH₂)₁₁CH₃</p>	108		

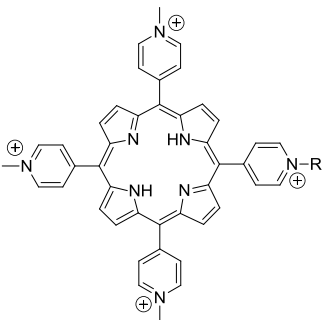
Tabela 1.4 - Exemplos de ftalocianinas catiónicas não simétricas do tipo A₃B sintetizadas e testadas em PDI. Para simplificação das estruturas, apenas é representado um dos quatro isômeros constitucionais.

<p style="text-align: center;">Ftalocianina</p> 	Ref.	<p style="text-align: center;">Ftalocianina</p> 	Ref.
<p>M = Zn R₁, R₂, R₃ = H R₄ =  3 I[⊖]</p>	81a	<p>M = Zn R₁, R₂, R₃ = H R₄ =  I[⊖]</p> <p>M = Zn R₁, R₂, R₃ = H R₄ =  I[⊖]</p>	13b
<p>M(L₁) = In(Cl) R₁, R₂, R₃ =  I[⊖] R₄ =  NH-X X = H ou Nanopartícula magnética</p>	109	<p>M = Zn R₁, R₂, R₃ = H R₄ = ]_n</p>	101

Existem ainda outras características estruturais relevantes reportadas na literatura. Partindo de uma *meso*-tetra-piridil-porfirina metilada em três azotos dos grupos piridil, os autores do trabalho¹¹⁰ puderam avaliar a influência do aumento da cadeia carbonada do grupo ligado ao quarto azoto dos grupos piridil na atividade bactericida. Os resultados obtidos estão reportados na Tabela 1.5. Os melhores resultados foram obtidos para cadeias com 10 e 14 carbonos, apresentado uma atividade várias ordens de grandeza superiores ao do grupo metilo. Outros autores¹¹¹ demonstraram maior eficácia na inativação de *E. coli* por parte de porfirinas de zinco tetra-piridil tetra-cationizadas com cadeias longas (seis e oito carbonos) do que com cadeias de tamanho inferior. A presença de uma cadeia hidrofóbica parece levar a dois efeitos. Por um lado, interfere com as forças que estabilizam a estrutura tridimensional da parede externa das bactérias, aumentando a sua permeabilidade. Adicionalmente, permite ancorar o fotossensibilizador aos domínios lipídicos da membrana citoplasmática, aumentando a força da sua interação com a célula microbiana.^{65, 110}

Tabela 1.5 – Resultados obtidos por Reddi, et al. ¹¹⁰ para a atividade antimicrobiana contra células de *E. coli* irradiadas durante 15 min por luz branca (150 mW/cm²) após incubação de 5 min no escuro com 0,8 µM de fotossensibilizador.

Porfírina



Diminuição de sobrevivência (log)

R = CH ₃	+ 0,28
R = C ₆ H ₁₃	+ 0,05
R = C ₁₀ H ₂₁	- 4,32 ± 0,34
R = C ₁₄ H ₂₉	- 4,35 ± 0,45
R = C ₁₈ H ₃₇	- 2,78 ± 0,62
R = C ₂₂ H ₄₅	+ 0,22 ± 0,07

1.4 Proposta de trabalho

O objetivo deste trabalho (Figura 1.8) é sintetizar novas ftalocianinas eficazes contra bactérias Gram-positivas e, particularmente, Gram-negativas, utilizando o grupo imidazol como modelador estrutural. Os grupos imidazol ligados às ftalocianinas permitem posterior cationização, o que resultará na obtenção de vários derivados com potencial para a inativação de microorganismos. Nesta etapa, pretende-se obter uma família de compostos que apresente diferenças ao nível do tamanho da cadeia alquílica cationizante, metal central e grau de cationização da molécula. Como foi discutido anteriormente, a variação destes elementos poderá resultar em alterações ao nível da produção de espécies reativas de oxigénio, internalização celular, seletividade para microorganismos e atividade antimicrobiana.

O passo seguinte consiste em estudar alguns parâmetros fotofísicos e fotoquímicos, incluindo a absorvidade molar e rendimentos quânticos de fluorescência e formação de oxigénio singuleto. Adicionalmente, alguns compostos serão submetidos a ensaios *in vitro* para testar a sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como a toxicidade para células humanas.

O objetivo final deste trabalho é fazer um estudo de estrutura/atividade, ou seja, relacionar as alterações estruturais promovidas em cada membro da família com as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas e os resultados dos ensaios *in vitro*.

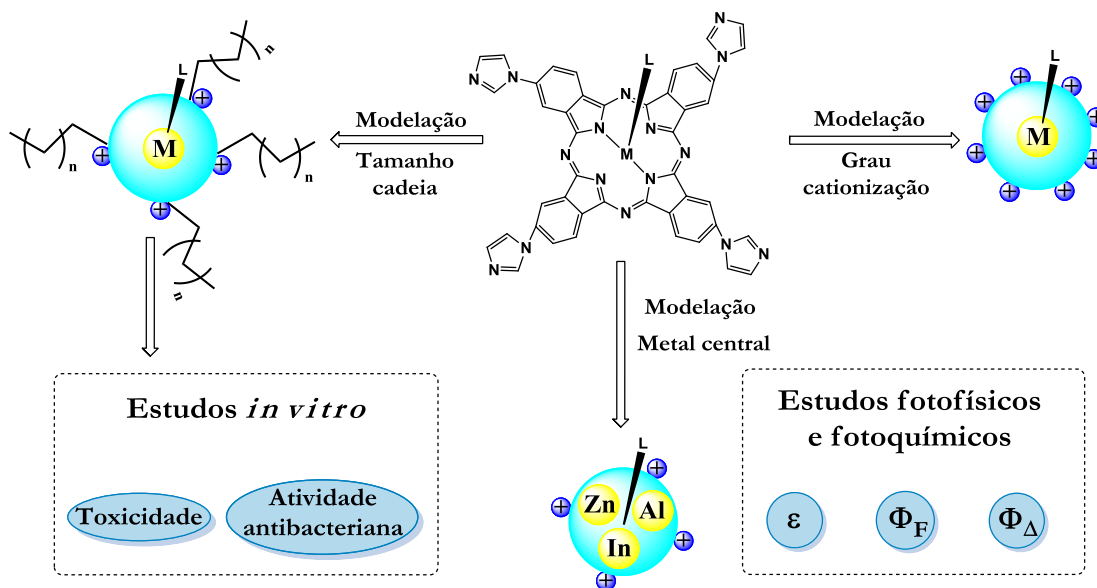


Figura 1.8 – Esquema da proposta de trabalho apresentada nesta dissertação.

1.5 Referências

- [1] Urruticochea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Vinals, F.; Capella, G., *Current Pharmaceutical Design*, **2010**, *16*, 3-10.
- [2] (a) Passaes, C. P.; Sáez-Ciri3n, A., *Virology*, **2014**, *454-455*, 340-352; (b) Elbaz, T.; El-Kassas, M.; Esmat, G., *Journal of Advanced Research*, **2015**, *6*, 301-310.
- [3] Berdy, J., *The Journal of Antibiotics*, **2012**, *65*, 385-395.
- [4] (a) Alanis, A. J., *Archives of Medical Research*, **2005**, *36*, 697-705; (b) Abdul Ghafur, K., *The Journal of the Association of Physicians of India*, **2010**, *58*, 143-144; (c) Davies, J.; Davies, D., *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, **2010**, *74*, 417-433.
- [5] World Health Organization, *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*; Geneva, 2017.
- [6] World Health Organization, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*; 2014.
- [7] Dire33o Geral de Sa3de, *Preven33o e Controlo de Infec33es e de Resist33ncia aos Antimicrobianos em N3meros*; 2015.
- [8] The Review on Antimicrobial Resistance, *Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations*; 2014.
- [9] Ventola, C. L., *Pharmacy and Therapeutics*, **2015**, *40*, 277-283.
- [10] (a) Peacock, S. J.; Paterson, G. K., *Annual review of biochemistry*, **2015**, *84*, 577-601; (b) Axel, D.; Christina, K.; Susanne, W.; Glenn, T., *Clinical Infectious Diseases*, **2001**, *32*, S22-S29; (c) Appelbaum, P. C., *Clinical Infectious Diseases*, **2007**, *45*, S165-S170.
- [11] B3uml, W., New Developments in Antimicrobial PDT. In *Handbook of Photodynamic Therapy*, World Scientific: **2016**; pp 501-519.
- [12] Maisch, T., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2015**, *14*, 1518-1526.
- [13] (a) Dimaano, M. L.; Rozario, C.; Nerandzic, M. M.; Donskey, C. J.; Lam, M.; Baron, E. D., *International journal of molecular sciences*, **2015**, *16*, 7851-7860; (b) Soncin, M.; Fabris, C.; Busetti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G.; Jori, G., *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **2002**, *1*, 815-819; (c) Gr3uner, M.; Tuchscher, L.; L3offler, B.; Gonnissen, D.; Riehemann, K.; Staniford, M. C.; Kynast, U.; Strassert, C. A., *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2015**, *7*, 20965-20971.
- [14] Saga, T.; Yamaguchi, K., *Japan Medical Association Journal*, **2009**, *52*, 103-108.
- [15] Lewis, K., *Nature Reviews Drug Discovery*, **2013**, *12*, 371-387.
- [16] Perez-Llarena, F. J.; Bou, G., *Current Medicinal Chemistry*, **2009**, *16*, 3740-3765.
- [17] Drawz, S. M.; Bonomo, R. A., *Clinical microbiology reviews*, **2010**, *23*, 160-201.
- [18] Butler, M. S.; Blaskovich, M. A. T.; Cooper, M. A., *The Journal of Antibiotics*, **2017**, *70*, 3-24.

- [19] Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schaberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K., *Nature*, **2015**, *517*, 455-459.
- [20] Ventola, C. L., *Pharmacy and Therapeutics*, **2015**, *40*, 344-352.
- [21] Fowler, T.; Walker, D.; Davies, S. C., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2014**, *1323*, 1-10.
- [22] (a) Oliphant, C. M.; Eroschenko, K., *The Journal for Nurse Practitioners*, **2015**, *11*, 79-86; (b) Li, X. Z.; Plesiat, P.; Nikaido, H., *Clinical microbiology reviews*, **2015**, *28*, 337-418; (c) Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V., *Nature Reviews Microbiology*, **2015**, *13*, 42-51; (d) Chang, H.-H.; Cohen, T.; Grad, Y. H.; Hanage, W. P.; O'Brien, T. F.; Lipsitch, M., *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, **2015**, *79*, 101-116.
- [23] Coates, A. R. M., *Antibiotic resistance*. Springer: Heidelberg ; New York, **2012**.
- [24] Munita, J. M.; Arias, C. A., *Microbiology Spectrum*, **2016**, *4*.
- [25] Soucy, S. M.; Huang, J.; Gogarten, J. P., *Nature Reviews Genetics*, **2015**, *16*, 472-482.
- [26] Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O., *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2010**, *35*, 322-332.
- [27] (a) Donlan, R. M., *Emerging infectious diseases*, **2002**, *8*, 881-890; (b) Flemming, H.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S., *Nature Reviews Microbiology*, **2016**, *14*, 563-575.
- [28] (a) Schneider, M.; Kirfel, G.; Berthold, M.; Frentzen, M.; Krause, F.; Braun, A., *Lasers in Medical Science*, **2012**, *27*, 615-620; (b) Lee, Y.; Park, H.; Lee, J.; Seo, H.; Lee, S., *International Journal of Oral Science*, **2012**, *4*, 196-201; (c) Taraszkievicz, A.; Fila, G.; Grinholc, M.; Nakonieczna, J., *BioMed Research International*, **2013**, *2013*, 13; (d) Meerovich, G. A.; Tiganova, I. G.; Makarova, E. A.; Meerovich, I. G.; Ju, M. R.; Tolordova, E. R.; Alekseeva, N. V.; Stepanova, T. V.; Koloskova, Y.; Luk'anets, E. A.; Krivospitskaya, N. V.; Sipailo, I. P.; Baikova, T. V.; Loschenov, V. B.; Gonchukov, S. A., *Journal of Physics: Conference Series*, **2016**, *691*, 012011.
- [29] (a) Ribeiro, A. P. D.; Andrade, M. C.; de Fátima da Silva, J.; Jorge, J. H.; Primo, F. L.; Tedesco, A. C.; Pavarina, A. C., *Photochemistry and photobiology*, **2013**, *89*, 111-119; (b) Junqueira, J. C.; Jorge, A. O. C.; Barbosa, J. O.; Rossoni, R. D.; Vilela, S. F. G.; Costa, A. C. B. P.; Primo, F. L.; Gonçalves, J. M.; Tedesco, A. C.; Suleiman, J. M. A. H., *Lasers in Medical Science*, **2012**, *27*, 1205-1212; (c) Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Avramov, L.; Popova, E.; Dimitrov, S. In *Al(III), Pd(II), and Zn(II) phthalocyanines for inactivation of dental pathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans as planktonic and biofilm-cultures*, **2012**; pp 84273X-84273X-84210; (d) Mantareva, V.; Kussovski, V.; Angelov, I.; Wohrle, D.; Dimitrov, R.; Popova, E.; Dimitrov, S., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2011**, *10*, 91-102.

- [30] (a) Rui, Y.; Michael, R. H., *Current Medicinal Chemistry*, **2015**, *22*, 2159-2185; (b) Hamblin, M. R., *Current Opinion in Microbiology*, **2016**, *33*, 67-73.
- [31] Lesage, S.; Xu, H.; Durham, L., *Hydrological Sciences Journal*, **1993**, *38*, 343-354.
- [32] Severance, S.; Hamza, I., *Chemical reviews*, **2009**, *109*, 4596-4616.
- [33] Aronoff, S., *Chemical reviews*, **1950**, *47*, 175-195.
- [34] Hunter, C. N.; Daldal, F.; Thurnauer, M. C.; Beatty, J. T., *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands: Dordrecht, **2008**.
- [35] (a) Daniell, M. D.; Hill, J. S., *The Australian and New Zealand journal of surgery*, **1991**, *61*, 340-348; (b) With, T. K., *The International journal of biochemistry*, **1980**, *11*, 189-200.
- [36] Huang, H.; Song, W.; Rieffel, J.; Lovell, J. F., *Frontiers in Physics*, **2015**, *3*.
- [37] Grove, J. F.; Zechmeister, L.; Reimann, E.; Roy, S.; Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W., *Progress in the chemistry of organic natural products*. 88. Springer: Wien, **2007**.
- [38] Pinto, S. M. A.; Henriques, C. A.; Tomé, V. A.; Vinagreiro, C. S.; Calvete, M. J. F.; Dąbrowski, J. M.; Piñeiro, M.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2016**, *20*, 45-60.
- [39] Shimizu, S., *Chemical reviews*, **2017**, *117*, 2730-2784.
- [40] (a) Lijewski, S.; Piskorz, J.; Kucinska, M.; Wierzchowski, M.; Czerniak, K.; Billert, H.; Murias, M.; Mielcarek, J.; Goslinski, T., *Inorganic Chemistry Communications*, **2013**, *29*, 97-100; (b) Song, Y.; Zong, H.; Trivedi, E. R.; Vesper, B. J.; Waters, E. A.; Barrett, A. G. M.; Radosevich, J. A.; Hoffman, B. M.; Meade, T. J., *Bioconjugate Chemistry*, **2010**, *21*, 2267-2275.
- [41] Claessens, C. G.; Hahn, U.; Torres, T., *The Chemical Record*, **2008**, *8*, 75-97.
- [42] (a) Ford, W. E.; Rodgers, M. A. J.; Schechtman, L. A.; Sounik, J. R.; Rihter, B. D.; Kenney, M. E., *Inorganic Chemistry*, **1992**, *31*, 3371-3377; (b) Zhang, Y.; Jeon, M.; Rich, L. J.; Hong, H.; Geng, J.; Zhang, Y.; Shi, S.; Barnhart, T. E.; Alexandridis, P.; Huizinga, J. D.; Seshadri, M.; Cai, W.; Kim, C.; Lovell, J. F., *Nature nanotechnology*, **2014**, *9*, 631-638.
- [43] Alexander Yu, T.; Larisa, G. T., *Russian Chemical Reviews*, **2011**, *80*, 531.
- [44] Huang, Z., *Technology in cancer research & treatment*, **2005**, *4*, 283-293.
- [45] (a) Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2015**, *14*, 1765-1780; (b) Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K., *Clinical Endoscopy*, **2013**, *46*, 7-23.
- [46] Usuda, J.; Kato, H.; Okunaka, T.; Furukawa, K.; Tsutsui, H.; Yamada, K.; Suga, Y.; Honda, H.; Nagatsuka, Y.; Ohira, T.; Tsuboi, M.; Hirano, T., *Journal of Thoracic Oncology*, **2006**, *1*, 489-493.
- [47] http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000318/human_med_000801.jsp (acedido em 14/06/2017).
- [48] <http://www.stebabiotech.com/index.php/TOOKAD-R-Soluble/Our-phase-III-trials2> (acedido em 14/06/2017).
- [49] Hutnick, M. A.; Ahsanuddin, S.; Guan, L.; Lam, M.; Baron, E. D.; Pokorski, J. K., *Biomacromolecules*, **2017**, *18*, 379-385.

- [50] <http://www.luzitin.pt/luz11.php> (acedido em 14/06/2017).
- [51] Gelir, A.; Yılmaz, İ.; Yılmaz, Y., *The Journal of Physical Chemistry B*, **2007**, *111*, 478-484.
- [52] Moreira, L. M.; Vieira dos Santos, F.; Lyon, J. P.; Maftoum-Costa, M.; Pacheco-Soares, C.; Soares da Silva, N., *Australian Journal of Chemistry*, **2008**, *61*, 741-754.
- [53] (a) Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guilard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 1-60; (b) McKeown, N. B., 98 - The Synthesis of Symmetrical Phthalocyanines. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guilard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 61-124; (c) Nemykin, V. N.; Dudkin, S. V.; Dumoulin, F.; Hirel, C.; Gurek, A. G.; Ahsen, V., *ARKIVOC*, **2014**, *1*, 142-204; (d) Mack, J.; Kobayashi, N., *Chemical reviews*, **2011**, *111*, 281-321; (e) Dumoulin, F.; Durmuş, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T., *Coordination Chemistry Reviews*, **2010**, *254*, 2792-2847; (f) de la Torre, G.; Torres, T., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2002**, *06*, 274-284.
- [54] A. Braun; Tcherniac, J., *Chemische Berichte*, **1907**, *40*, 2709.
- [55] Gregory, P., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2000**, *4*, 432-437.
- [56] Gregory, P., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **1999**, *3*, 468-476.
- [57] Parra, V.; Vilar, M. R.; Battaglini, N.; Ferraria, A. M.; Rego, A. M.; Boufi, S.; Rodriguez-Mendez, M. L.; Fonavs, E.; Muzikante, I.; Bouvet, M., *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, **2007**, *23*, 3712-3722.
- [58] Zhang, Y.; Cai, X.; Bian, Y.; Jiang, J., Organic Semiconductors of Phthalocyanine Compounds for Field Effect Transistors (FETs). In *Functional Phthalocyanine Molecular Materials*, Jiang, J., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2010**; pp 275-321.
- [59] Zhang, J.; Wang, L.; Li, C.; Li, Y.; Liu, J.; Tu, Y.; Zhang, W.; Zhou, N.; Zhu, X., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **2014**, *52*, 691-698.
- [60] Sorokin, A. B., *Chemical reviews*, **2013**, *113*, 8152-8191.
- [61] (a) Attia, A. B.; Balasundaram, G.; Driessen, W.; Ntziachristos, V.; Olivo, M., *Biomedical optics express*, **2015**, *6*, 591-598; (b) Lobo, A. C. S.; Silva, A. D.; Tomé, V. A.; Pinto, S. M. A.; Silva, E. F. F.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *59*, 4688-4696; (c) Zhou, Y.; Wang, D.; Zhang, Y.; Chitgupi, U.; Geng, J.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Cook, T. R.; Xia, J.; Lovell, J. F., *Theranostics*, **2016**, *6*, 688-697.
- [62] Allen, C. M.; Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, *05*, 161-169.
- [63] Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q., *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, *90*, 889-905.
- [64] Hamblin, M. R.; Hasan, T., *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **2004**, *3*, 436-450.

- [65] Hamblin, M. R.; Jori, G., *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2011**.
- [66] Isago, H., *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds*. Springer Japan: **2015**.
- [67] Rio, Y.; Salome Rodriguez-Morgade, M.; Torres, T., *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2008**, *6*, 1877-1894.
- [68] (a) Su, J.; Xue, M.; Ma, N.; Sheng, Q.; Zhang, Q.; Liu, Y., *Science in China Series B: Chemistry*, **2009**, *52*, 911-915; (b) Ghani, F.; Kristen, J.; Riegler, H., *Journal of Chemical & Engineering Data*, **2012**, *57*, 439-449.
- [69] Hamuryudan, E.; Merey, S.; Altuntas Bayir, Z., *Dyes and Pigments*, **2003**, *59*, 263-268.
- [70] Karaođlan, G. K.; Gümrukçü, G.; Koca, A.; Gül, A.; Avciata, U., *Dyes and Pigments*, **2011**, *90*, 11-20.
- [71] Li, H.; Nguyen, N.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H., *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3357-3363.
- [72] Mthethwa, T. P.; Tuncel, S.; Durmus, M.; Nyokong, T., *Dalton transactions*, **2013**, *42*, 4922-4930.
- [73] Linstead, R. P.; Weiss, F. T., *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, **1950**, 2975-2981.
- [74] Nemykin, V. N.; Lukyanets, E. A., *ARKIVOC*, **2010**, 136-208.
- [75] Sharma, S. K.; Dai, T.; Kharkwal, G. B.; Huang, Y.-Y.; Huang, L.; Bil De Arce, V. J.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., *Current pharmaceutical design*, **2011**, *17*, 1303-1319.
- [76] Wilson, M.; Burns, T.; Pratten, J.; Pearson, G. J., *Journal of Applied Bacteriology*, **1995**, *78*, 569-574.
- [77] (a) Merchat, M.; Spikes, J. D.; Bertolini, G.; Jori, G., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1996**, *35*, 149-157; (b) Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villaneuva, A.; Jori, G., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1996**, *32*, 153-157.
- [78] Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Howard Parish, J.; Brown, S. B., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1996**, *32*, 159-164.
- [79] Sperandio, F. F.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R., *Recent patents on anti-infective drug discovery*, **2013**, *8*, 108-120.
- [80] Calzavara-Pinton, P.; Rossi, M. T.; Sala, R.; Venturini, M., *Photochemistry and photobiology*, **2012**, *88*, 512-522.
- [81] (a) Ke, M.; Eastel, J.; Ngai, K. L. K.; Cheung, Y.; Chan, P. K. S.; Hui, M.; Ng, D. K. P.; Lo, P., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *84*, 278-283; (b) Sperandio, F. F.; Marotti, J.; Aranha, A. C.; Eduardo, C. P., *General Dentistry*, **2009**, *57*, 415-419.
- [82] Rosa, L. P.; Silva, F. C., *Journal of Medical Microbiology and Diagnosis* **2014**, *3*, 158.
- [83] Maisch, T.; Hackbarth, S.; Regensburger, J.; Felgenträger, A.; Bäumlner, W.; Landthaler, M.; Röder, B., *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, **2011**, *9*, 360-366.
- [84] Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2009**, *6*, 170-188.

- [85] (a) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K., *Nat Rev Cancer*, **2003**, *3*, 380-387; (b) Wainwright, M.; Maisch, T.; Nonell, S.; Plaetzer, K.; Almeida, A.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., *The Lancet Infectious Diseases*, **2016**.
- [86] (a) Li, Z.; Grant, K. B., *RSC Advances*, **2016**, *6*, 24617-24634; (b) Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2004**, *1*, 279-293.
- [87] Dąbrowski, J. M.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Urbańska, K.; Simões, S.; Stochel, G.; Cortes, L., *Free Radical Biology and Medicine*, **2012**, *52*, 1188-1200.
- [88] Huang, L.; Xuan, Y.; Koide, Y.; Zhiyentayev, T.; Tanaka, M.; Hamblin, M. R., *Lasers in surgery and medicine*, **2012**, *44*, 490-499.
- [89] Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2010**, *2*, a000414.
- [90] Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roncucci, G., *Lasers in surgery and medicine*, **2006**, *38*, 468-481.
- [91] Tavares, L. J.; Pavarina, A. C.; Vergani, C. E.; de Avila, E. D., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2016**, *17*, 236-244.
- [92] (a) Ke, M.; Eastel, J.; Ngai, K. L. K.; Cheung, Y.; Chan, P. K. S.; Hui, M.; Ng, D. K. P.; Lo, P., *Chemistry – An Asian Journal*, **2014**, *9*, 1868-1875; (b) Dei, D.; Chiti, G.; De Filippis, M. P.; Fantetti, L.; Giuliani, F.; Giuntini, F.; Soncin, M.; Jori, G.; Roncucci, G., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2006**, *10*, 147-159; (c) Pereira, J. B.; Carvalho, E. F. A.; Faustino, M. A. F.; Fernandes, R.; Neves, M. G. P. M. S.; Cavaleiro, J. A. S.; Gomes, N. C. M.; Cunha, Â.; Almeida, A.; Tomé, J. P. C., *Photochemistry and photobiology*, **2012**, *88*, 537-547; (d) Segalla, A.; Borsarelli, C. D.; Braslavsky, S. E.; Spikes, J. D.; Roncucci, G.; Dei, D.; Chiti, G.; Jori, G.; Reddi, E., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2002**, *1*, 641-648.
- [93] Liu, Y.; Qin, R.; Zaat, S. A. J.; Breukink, E.; Heger, M., *J Clin Transl Res*, **2015**, *1*, 140-167.
- [94] (a) Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Marle, J. V., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2005**, *49*, 2026-2034; (b) Bhatti, M.; Nair, S. P.; Macrobert, A. J.; Henderson, B.; Shepherd, P.; Cridland, J.; Wilson, M., *Current Microbiology*, **2001**, *43*, 96-99; (c) Malik, Z.; Babushkin, T.; Sher, S.; Hanania, J.; Ladan, H.; Nitzan, Y.; Salzberg, S., *International Journal of Biochemistry*, **1993**, *25*, 1399—1406.
- [95] Brown, S.; Santa Maria, J. P.; Walker, S., *Annual review of microbiology*, **2013**, *67*, 313-336.
- [96] Qiao, S.; Luo, Q.; Zhao, Y.; Zhang, X. C.; Huang, Y., *Nature*, **2014**, *511*, 108-111.
- [97] Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R., *Israel Journal of Chemistry*, **2012**, *52*, 691-705.
- [98] (a) Zheng, B.; Jiang, X.; Lin, T.; Ke, M.; Huang, J., *Dyes and Pigments*, **2015**, *112*, 311-316; (b) Demirkapı, D.; Şirin, A.; Turanlı-Yıldız, B.; Çakar, Z. P.; Sesalan, B. Ş., *Synthetic Metals*, **2014**, *187*, 152-159.
- [99] Caminos, D. A.; Durantini, E. N., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2005**, *9*, 334-342.

- [100] Angelov, I.; Mantareva, V.; Kussovski, V.; Woehrl, D.; Borisova, E.; Avramov, L. In *Improved antimicrobial therapy with cationic tetra- and octa-substituted phthalocyanines*, 15th International School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, SPIE: **2008**; pp 702717-702718.
- [101] Chen, J.; Chen, Z.; Zheng, Y.; Zhou, S.; Wang, J.; Chen, N.; Huang, J.; Yan, F.; Huang, M., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2011**, *15*, 293-299.
- [102] Giuntini, F.; Nistri, D.; Chiti, G.; Fantetti, L.; Jori, G.; Roncucci, G., *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 515-517.
- [103] Li, X.; Guo, J.; Zhuang, J.; Zheng, B.; Ke, M.; Huang, J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, *25*, 2386-2389.
- [104] Mantareva, V. N.; Angelov, I.; Wöhrle, D.; Borisova, E.; Kussovski, V., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2013**, *17*, 399-416.
- [105] Osifeko, O. L.; Durmuş, M.; Nyokong, T., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2015**, *301*, 47-54.
- [106] Makarov, D. A.; Yuzhakova, O. A.; Slivka, L. K.; Kuznetsova, N. A.; Negrimovsky, V. M.; Kaliya, O. L.; Lukyanets, E. A., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2007**, *11*, 586-595.
- [107] Rocha, D. M. G. C.; Venkatramiah, N.; Gomes, M. C.; Almeida, A.; Faustino, M. A. F.; Almeida Paz, F. A.; Cunha, A.; Tome, J. P. C., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2015**, *14*, 1872-1879.
- [108] Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Orozova, P.; Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Borisova, E.; Avramov, L., *FEMS Microbiology Letters*, **2009**, *294*, 133-140.
- [109] Osifeko, O. L.; Uddin, I.; Mashazi, P. N.; Nyokong, T., *New Journal of Chemistry*, **2016**, *40*, 2710-2721.
- [110] Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J. C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U., *Photochemistry and photobiology*, **2002**, *75*, 462-470.
- [111] Thomas, M.; Craik, J. D.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., *Future Microbiology*, **2015**, *10*, 709-724.

Capítulo 2

Síntese e caracterização estrutural de metaloftalocianinas

2.1 Síntese e modelação dos precursores das ftalocianinas

As ftalocianinas podem ser sintetizadas a partir de vários precursores aromáticos com dois grupos carboxílicos ou seus derivados em posições *orto*. Alguns exemplos são os ácidos ftálicos, os anidridos ftálicos, os ftalonitrilos, as ftalimidas e as 1,3-diiminoisoindolinas (Figura 2.1).¹ Apesar destes pré-requisitos restritos envolvidos na síntese de ftalocianinas, existe uma química rica e variada para a preparação destes precursores envolvendo a adição de grupos funcionais que conferem aos macrociclos propriedades químicas, fotofísicas e biológicas relevantes.²

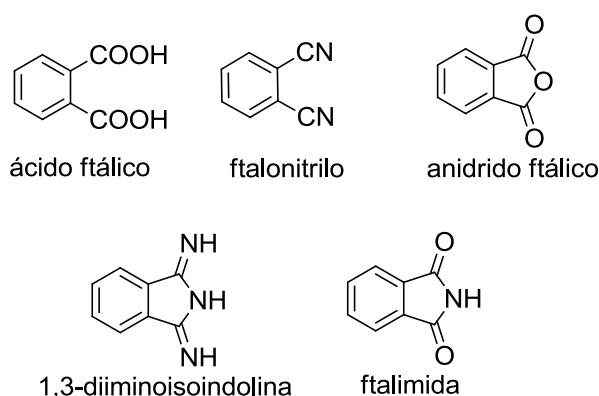
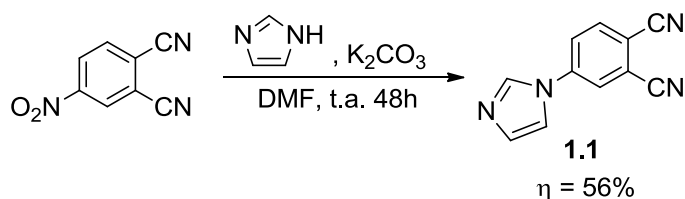


Figura 2.1 – Exemplos de alguns precursores utilizados para a síntese de ftalocianinas.

De todos os precursores mencionados, destacam-se os ftalonitrilos, que serão os únicos utilizados no decurso deste trabalho. A escolha destes compostos prende-se pela sua capacidade em formar complexos de ftalocianinas com a maioria dos metais com bons rendimentos.³ A nível sintético, os ftalonitrilos, para além de requererem temperaturas mais baixas, têm azotos capazes de participar na formação dos anéis pirrólicos e das pontes *meso*, ao contrário de outros reagentes como o ácido ftálico, os anidridos ftálicos e as ftalimidas, que requerem a presença de um reagente adicional dador de azoto.^{1a, 4} Finalmente, existe uma considerável facilidade em modelar estruturalmente estes compostos, abrindo a possibilidade para a introdução de grupos biocompatíveis e biologicamente ativos.⁵ De seguida serão discutidos os métodos de síntese e modelação de ftalonitrilos que permitirão obter metaloftalocianinas com grupos imidazol.

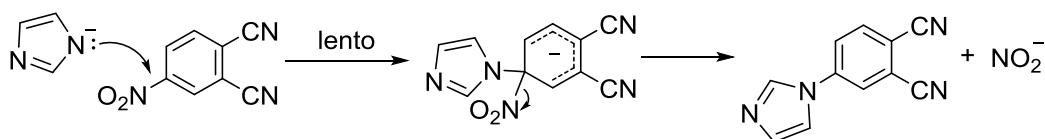
2.1.1 Síntese do 4-(1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo

Dado que todo o trabalho presente nesta dissertação tem como base ftalocianinas obtidas a partir do ftalonitrilo substituído na posição 4 com o grupo imidazol, será dada uma atenção especial à síntese e caracterização estrutural deste precursor. A reação efetuada encontra-se descrita no Esquema 2.1.



Esquema 2.1 – Reação de síntese do 4-(1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo.

Escolhemos partir do 4-nitroftalonitrilo devido à sua disponibilidade comercial e reatividade para o tipo de reação em causa (substituição nucleofílica aromática). Este substrato pode, no entanto, ser obtido sinteticamente partindo da 4-nitroftalimida.⁶ Apesar de a elevada densidade eletrónica dos sistemas aromáticos favorecer substituições eletrofílicas, a presença de dois grupos nitrilo retira densidade do anel suficiente para a ocorrência deste tipo de reações nucleofílicas. O mecanismo da reação (Esquema 2.2) consiste num ataque nucleofílico ao carbono diretamente ligado ao grupo abandonante (*ipso*), formando-se um intermediário tetraédrico, estabilizado tanto pela capacidade atratora de elétrons dos grupos nitrilo, como do grupo abandonante. De seguida, a reação prossegue com a regeneração da aromaticidade do sistema e saída do grupo abandonante.



Esquema 2.2 – Mecanismo da síntese de 1.1.

A reação foi feita à temperatura ambiente para evitar formação de ftalocianina ou de produtos secundários resultantes, nomeadamente, da presença de quantidades residuais de água no meio ou da degradação do solvente.

A reação foi controlada por TLC e, ao fim de 48h, foi possível identificar um desaparecimento quase completo do composto de partida. Na primeira tentativa, foi feita uma adição de mais imidazol e base e a reação foi deixada por mais 72h. Como após este tempo não foi

possível detetar diferenças ao nível da evolução da reação, esta foi dada como terminada. Dado que o DMF é miscível com água, a purificação do composto passou por uma precipitação por adição de uma mistura de água e gelo à mistura reacional. Este procedimento constitui uma forma rápida para a remoção do DMF da reação, bem como de K_2CO_3 e imidazol em excesso. O DMF, por ter um elevado ponto de ebulição, constitui por vezes uma dificuldade acrescida à purificação de produtos de reação em que este é utilizado como solvente. Foi assim possível evitar procedimentos mais complexos e morosos como extracções ou lavagens, dado que o DMF particiona tanto para a fase aquosa como para a fase orgânica, ou destilação a pressão reduzida, que poderia levar à formação de pequenas quantidades de ftalocianina.

A análise por TLC do precipitado (usando acetato de etilo como eluente) demonstrou a existência de uma mancha maioritária correspondente ao produto ($R_f = 0,94$) e uma segunda mancha ténue mais apolar ($R_f = 0,34$). Foi possível constatar que o composto apresentava uma solubilidade relativamente baixa em certos solventes de polaridade intermédia como diclorometano e clorofórmio e de polaridade mais elevada como etanol e metanol. Esta falta de solubilidade poderia dificultar a sua separação por coluna cromatográfica, pelo que se tenha procurado um método alternativo para a remoção desta impureza. Assim, o precipitado foi aquecido em metanol, o que permitiu a dissolução e conseqüente remoção da impureza do precipitado. A análise por TLC do metanol utilizado na lavagem demonstrou a presença da impureza, bem como uma pequena quantidade de produto, que foi desprezada. O rendimento da reação foi de 56%.

A estrutura do composto foi confirmada por RMN 1H (Figura 2.2). Devido à dificuldade de dissolução deste composto em vários solventes, como já foi referido, apenas foi possível obter um bom espectro de RMN utilizando DMSO como solvente.

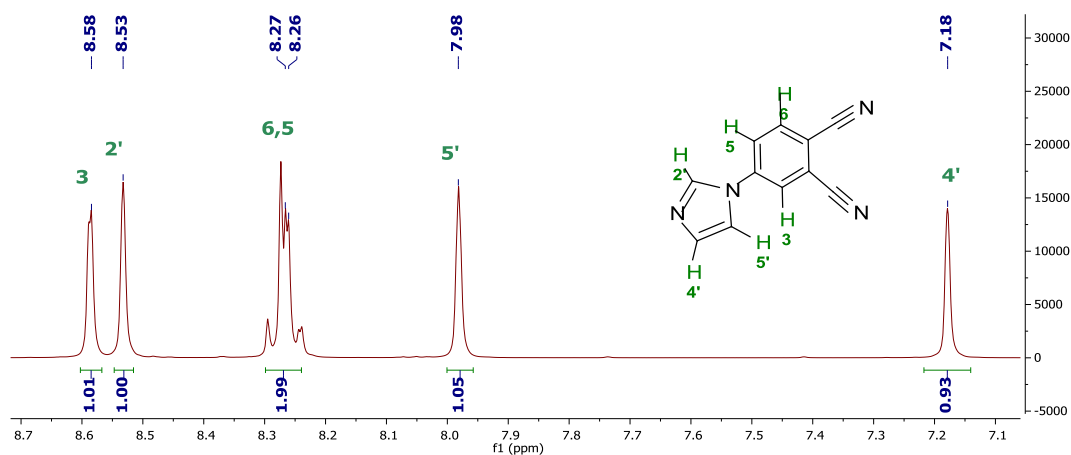


Figura 2.2 – Espectro de RMN 1H em DMSO- d_6 de 1.1.

O espectro de RMN 1H apresenta cinco picos, dos quais quatro apresentam integração unitária e um aparenta resultar da sobreposição dos sinais de dois prótons não equivalentes. Além

deste multipeto, apenas é possível identificar acoplamento protónico (dupleto, $J = 1,7$ Hz) para o sinal de maior desvio (8,58 ppm). Para os outros sinais, não é possível identificar acoplamento protónico, porventura devido a baixos valores de J . Para facilitar uma atribuição dos sinais, foram analisados os desvios dos espectros de RMN ^1H do imidazol, ftalonitrilo não substituído e 1,4-di(1-imidazolil)benzeno (Figura 2.3).

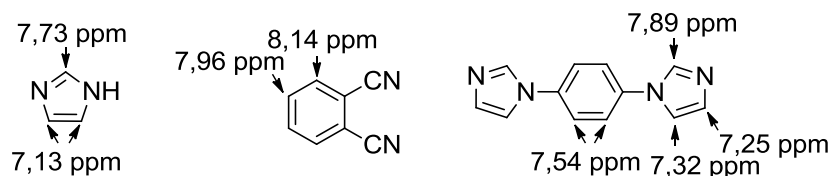


Figura 2.3 – Algumas moléculas com desvios químicos relevantes para a atribuição dos sinais de RMN ^1H de 1.1: imidazol (CDCl_3);⁷ ftalonitrilo não substituído ($\text{DMSO}-d_6$)⁷ e 1,4-di(1-imidazolil)benzeno (CDCl_3).⁸

A partir destes valores é possível afirmar que: i) o pico do composto a 7,18 ppm deverá corresponder ao protão do imidazol situado em posição *meta* relativamente ao anel benzénico (H_4'); ii) no ftalonitrilo não substituído, as posições *orto* relativamente a um dos grupos ciano têm um desvio químico superior; iii) o grupo imidazol, quando está ligado a um benzeno através da sua posição 1 aparenta ter um ligeiro efeito atrator de eletrões; iv) a combinação dos efeitos descritos nos dois pontos anteriores faz com que o protão simultaneamente em posição *orto* relativamente a um dos grupos ciano e ao grupo imidazol (H_3) tenha o maior desvio de entre os três pertencentes ao anel benzénico.

Para identificar quais dos restantes sinais pertenciam ao imidazol e ao anel benzénico, foi feito um RMN 2D $^1\text{H}-^1\text{H}$ do tipo COSY (*Correlation spectroscopy*) (Figura 2.4). Partindo de H_4' , que já foi atribuído, é possível identificar uma correlação com os sinais a 7,98 ppm e a 8,53 ppm, devendo estes dois sinais pertencer igualmente ao grupo imidazol. Por comparação com os desvios observados na molécula de imidazol, o maior desvio deverá corresponder ao protão entre os dois azotos (H_2'). Os sinais pertencentes ao anel benzénico (8,27 e 8,53 ppm) apresentam correlação entre si e, pelas considerações efetuadas previamente, o pico a 8,53 corresponderá ao H_3 e o sinal de integração dupla (8,27 ppm) aos outros dois protões do anel benzénico.

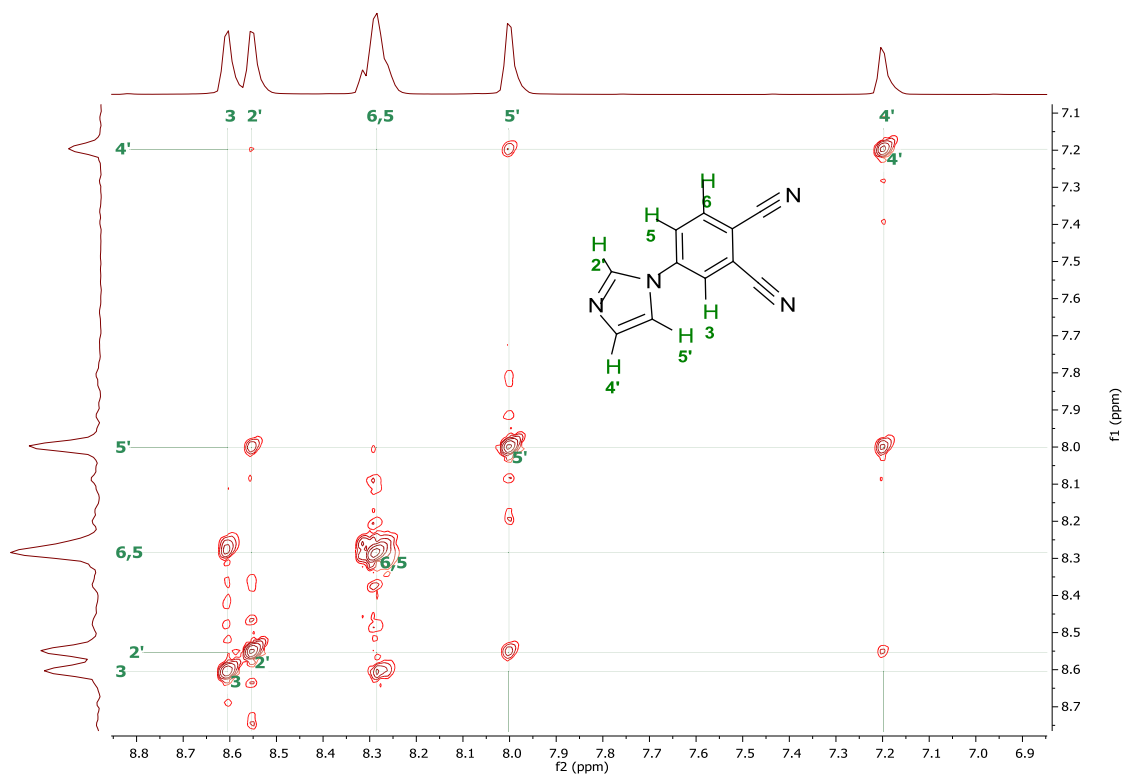


Figura 2.4 – Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY de **1.1** em DMSO-d_6 .

Com a atribuição dos sinais provenientes dos prótons efetuada, será feita uma análise semelhante para o espectro de RMN de ^{13}C . Numa primeira fase, foram estudados dois espectros unidimensionais: um de ^{13}C normal e outro DEPT-135 (Figura 2.5).

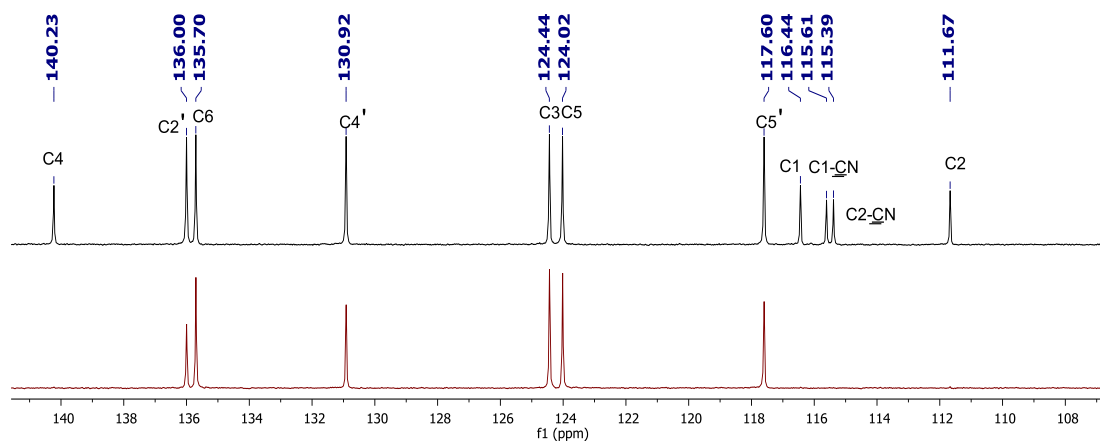


Figura 2.5 – Comparação entre o espectro de RMN ^{13}C (cima) com o espectro de DEPT-135 (baixo) em DMSO-d_6 .

O DEPT (*Distortionless enhancement by polarization transfer*) é uma técnica de RMN muito útil para diferenciar entre carbonos do tipo metilo (CH_3), metileno (CH_2), metino (CH) ou sem hidrogénios diretamente ligados. Através de uma sequência específica de pulsos, é possível promover a

transferência de polarização entre hidrogénios e carbonos e, como consequência, os sinais recolhidos terão diferentes propriedades consoante o número de hidrogénios ligados a um determinado carbono. Existem três tipos de DEPT que permitem dar informações diferentes mas complementares: o DEPT-45 mostra sinais positivos para todos os carbonos ligados a hidrogénios; o DEPT-90 apenas mostra os carbonos do tipo CH e o DEPT-135 mostra sinais positivos para os CH₃ e CH e negativos para os CH₂.⁹ A comparação entre o espectro de RMN ¹³C normal e o DEPT-135 permite assim identificar inequivocamente os carbonos sem ligação direta a hidrogénios (C1, C2, C4, C1-CN e C2-CN). Como todos os restantes carbonos são do tipo CH, não é possível extrair mais nenhuma informação dos espectros DEPT.

Dado que foi possível fazer uma atribuição inequívoca dos sinais protónicos, esta informação pode agora ser utilizada para a atribuição dos sinais de ¹³C mediante espectros bidimensionais. Para isso, foram efetuados espectros de acoplamento ¹H-¹³C do tipo HSQC e HMBC (Figura 2.6).

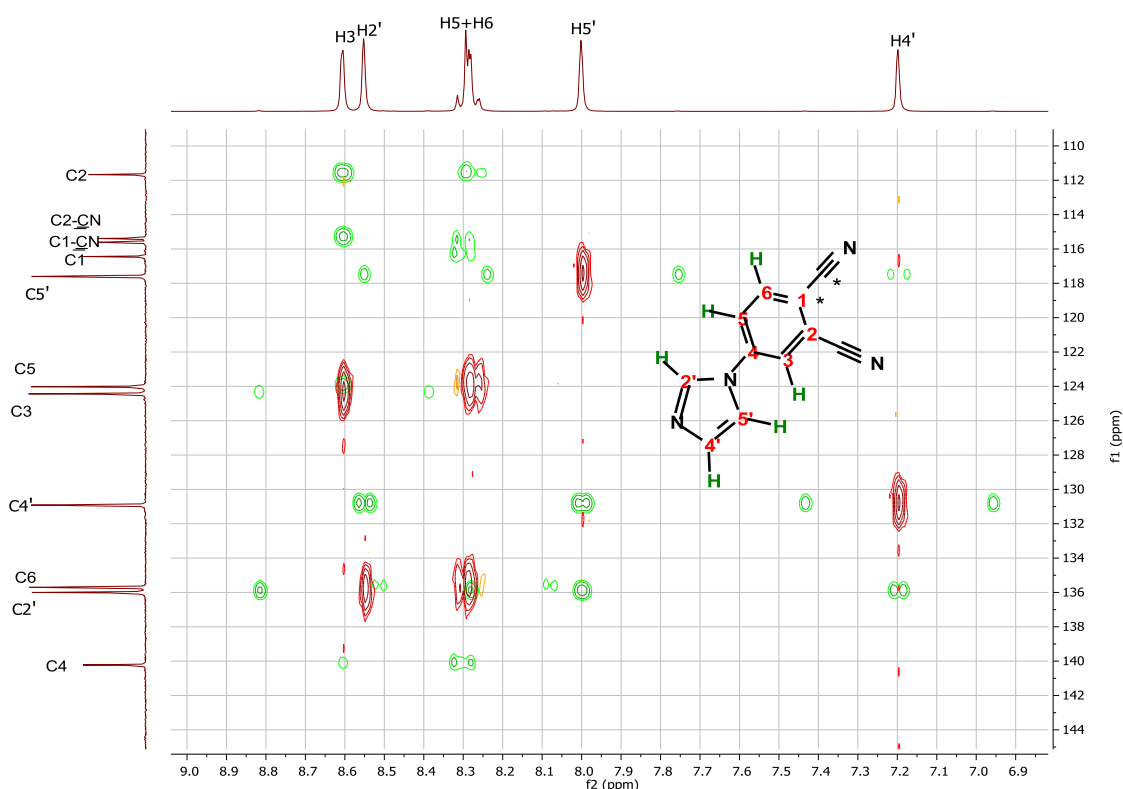


Figura 2.6 – Sobreposição do espectro ¹H-¹³C HSQC (vermelho) com o espectro ¹H-¹³C HMBC (verde) de 1.1 em DMSO-d₆ e respetivas atribuições dos picos correspondentes aos hidrogénios e carbonos. * - carbonos com alguma incerteza na atribuição.

O HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*) permite analisar correlações entre núcleos ¹³C e ¹H separados por uma ligação. Por outras palavras, permite efetuar uma correspondência imediata entre os sinais de ¹³C com os sinais dos ¹H que lhes estão diretamente ligados. O HMBC (*Heteronuclear multiple bond coherence*) permite analisar correlações entre núcleos ¹³C e ¹H separados por

várias ligações, o que na prática possibilita identificar CH's próximos entre si e/ou próximos de carbonos sem hidrogénios diretamente ligados.¹⁰

Dos carbonos sem hidrogénios diretamente ligados, o que apresenta maior desvio (140,23 ppm) poderá atribuir-se ao carbono do anel benzénico *ipso* relativamente ao grupo imidazol, dado que é o único carbono sp^2 ligado a um átomo eletronegativo. Os restantes carbonos, ao pertencerem a grupos nitrilos ou estarem diretamente ligados a estes, sofrem um efeito de escudamento típico de carbonos com ligações triplas. A atribuição destes carbonos foi efetuada com base nos acoplamentos observados por HMBC. Assim, é possível observar acoplamento (Figura 2.7) entre o H3 e os carbonos C2, C2- $\underline{C}N$, C4 e C5 e entre os H5/H6 e C1, C1- $\underline{C}N$, C3 (não perceptível no espectro) e C4. Não foi possível efetuar uma atribuição inequívoca aos sinais de C1 e C1- $\underline{C}N$. A atribuição proposta na Figura 2.6 baseia-se no facto de o sinal atribuído a C1- $\underline{C}N$ possuir um desvio e intensidade semelhantes ao carbono pertencente ao outro grupo nitrilo.

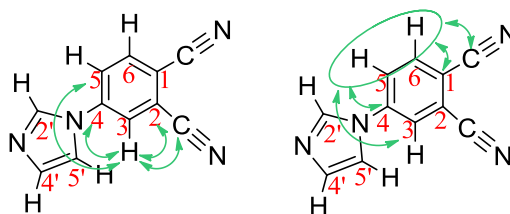


Figura 2.7 – Acoplamentos observados em HMBC para o H3 e H5/H6.

2.1.2 Síntese do 4-(2'-metil-5'-nitro-1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo

Para além do ftalonitrilo substituído com o grupo imidazol, também foi tentada a modelação de ftalonitrilos com o 2-metil-4(5)-nitroimidazol. Este motivo estrutural está presente em vários fármacos com atividade antibacteriana, que constituem a classe dos nitroimidazóis.¹¹

À semelhança do que aconteceu com **1.1**, foi utilizado o 4-nitroftalonitrilo como precursor. Esta reação apresenta, no entanto, um obstáculo adicional na medida em que o 2-metil-4(5)-nitroimidazol, pela presença de um grupo fortemente atrator de eletrões, é um pior nucleófilo que o imidazol. A repetição das condições de reação utilizadas para **1.1** não levou a uma conversão apreciável do substrato, mesmo com o aumento do tempo de reação (100 h) ou da temperatura (50°C). Observou-se que a 95°C ocorria total conversão do substrato em 24 h. A análise de RMN 1H (Figura 2.8) do crude revelou a presença de pelo menos dois ftalonitrilos substituídos na posição 4.

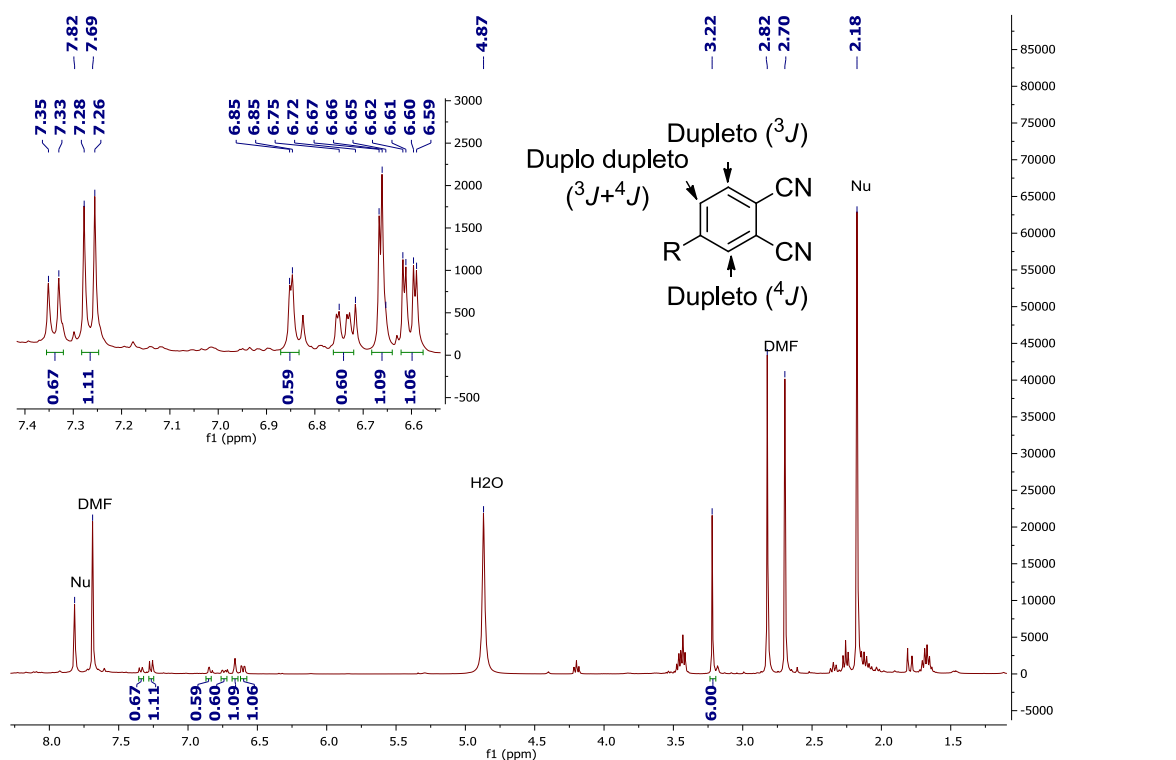


Figura 2.8 – Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do crude da reação da tentativa de síntese de **1.2** efetuada a 95°C , utilizando K_2CO_3 e DMF. São identificados os picos correspondentes ao solvente, água e 2-metil-4(5)-nitroimidazol (Nu).

Tal pode ser verificado pela presença de um padrão típico de acoplamento entre os seus 3 sinais protônicos: 1 duplete (3J) de maior constante de acoplamento ($J = 8,6\text{-}8,8$ Hz) um duplete (4J) de menor constante de acoplamento ($J = 2,3\text{-}2,6$ Hz) e um duplo duplete ($J = 2,3\text{-}2,6$ Hz, $J = 8,6\text{-}8,8$ Hz).

Não foi tentada a purificação do crude, no entanto o aparecimento de alguns dos picos aromáticos abaixo dos 7,33 ppm parece indicar a presença de grupos fortemente doadores de elétrons. Para além dos picos aromáticos, após exclusão dos picos provenientes dos solventes, é possível identificar um singuleto que integra na proporção de 6 para 3 relativamente a um dos conjuntos de três picos aromáticos. Este tipo de integração sugere que um dos produtos secundários poderá ser o 4-(dimetilamino)ftalonitrilo. Este produto pode ser atribuído à utilização de DMF como solvente, uma vez que a temperaturas próximas ou superiores a 100°C o DMF é instável, numa reação que é catalisada por presença de bases¹² e que leva à formação de monóxido de carbono e dimetilamina.¹³ Esta amina, ao ser um melhor nucleófilo que o 2-metil-4(5)-nitroimidazol, poderá reagir com o 4-nitroftalonitrilo com uma cinética de reação superior à observada com o nucleófilo pretendido. O outro conjunto de picos observado poderá dizer respeito ao 4-(hidroxi)ftalonitrilo, 4,4'-oxidi(ftalonitrilo) ou a produtos resultante da hidrólise de um dos grupos ciano (Figura 2.9).

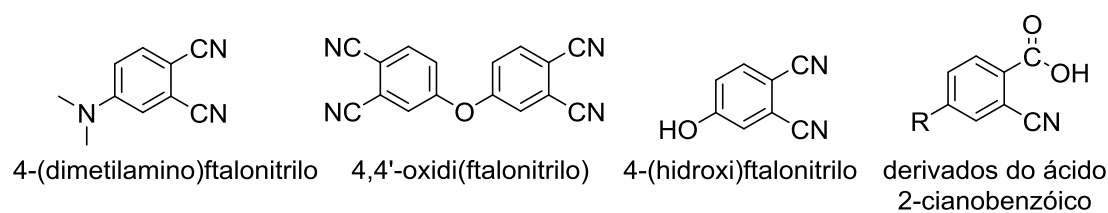
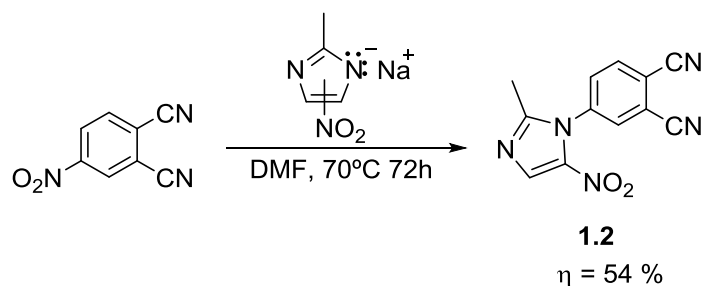


Figura 2.9 – Exemplos de possíveis produtos secundários obtidos na tentativa de síntese de **1.2** a 95°C usando K_2CO_3 como base e DMF como solvente.

Estes produtos secundários foram previamente reportados¹⁴ para reações entre o 4-nitroftalonitrilo e diferentes sais/solventes, nos quais se inclui o K_2CO_3 em DMF. Dado que este solvente é relativamente higroscópico e os seus métodos de secagem comumente utilizados não permitem uma confirmação do seu estado anidro, é difícil garantir a total ausência de água no meio reacional. A presença de base em meios com água, aumenta a concentração de iões hidróxido, o que poderá levar à substituição do grupo nitro, formando o 4-(hidroxi)ftalonitrilo, e/ou à hidrólise de um dos grupos ciano. O 4-(hidroxi)ftalonitrilo, por sua vez, poderá formar um alcóxido e reagir com o 4-nitroftalonitrilo, levando à formação do respetivo éter.

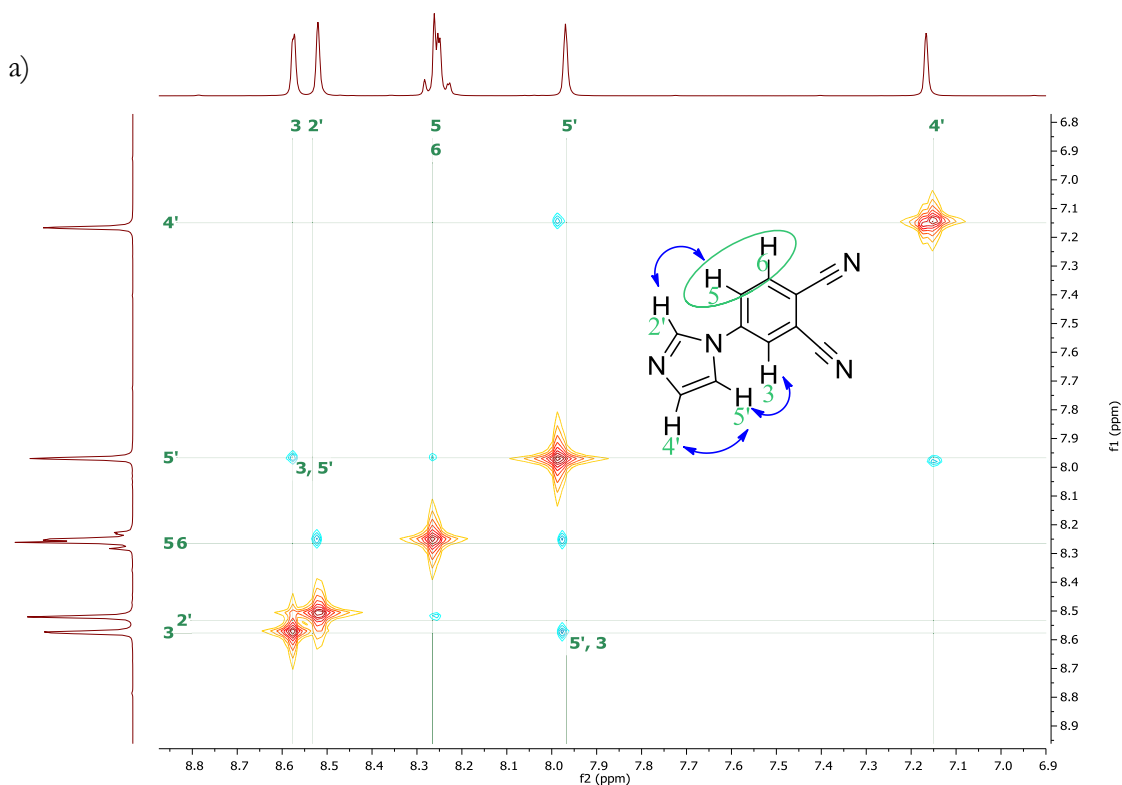
Tipicamente, os métodos de alquilação de nitroimidazóis envolvem elevadas temperaturas,¹⁵ na presença ou ausência de bases.¹⁶ Na tentativa de suavizar as condições de reação e, assim, evitar a formação destes produtos secundários, foram investigadas técnicas para aumentar a nucleofilicidade do 2-metil-4(5)-nitroimidazol. A estratégia mais promissora foi proposta por Long *et al.*¹⁷ para a 1-alquilação do 2-nitroimidazol utilizando o respetivo sal de Na^+ ou K^+ . O sal de Na^+ do 2-metil-4(5)-nitroimidazol foi preparado por adição de uma quantidade equivalente de NaOH em solução aquosa. A água foi evaporada através de ciclos de misturas azeotrópicas com tolueno e o sal foi posteriormente seco sob vácuo várias horas antes da sua utilização. Numa primeira abordagem, a reação foi efetuada em DMF à temperatura ambiente, no entanto não ocorreu qualquer transformação do substrato. Numa segunda tentativa (Esquema 2.3), a temperatura da reação foi aumentada para 70°C, o que levou a um consumo gradual do substrato, tendo-se observado por TLC o aparecimento de uma nova mancha maioritária mais polar. A reação encontrava-se concluída após 72 h. À semelhança do que ocorreu para **1.1**, o DMF e o excesso de nucleófilo foram removidos por precipitação com água. Após a precipitação, ainda era possível identificar uma mancha mais apolar, pelo que o produto foi purificado por cromatografia e recristalizado em acetona. A estrutura do composto foi confirmada por RMN unidimensional (1H , ^{13}C) e bidimensional (HSQC e HMBC) e massa (EI).



Esquema 2.3 – Condições de reação otimizadas para a obtenção de **1.2**.

Dado que os imidazóis com NH livre tautomerizam, a presença do grupo nitro nas posições 4 ou 5 leva a que este não tenha uma posição definida. A alquilação do 2-metil-4(5)-nitroimidazol na sua posição 1 impede posterior tautomerização, pelo que o grupo nitro passará a ter uma posição definida, ou seja, é possível obter derivados 4-nitro ou 5-nitro.¹⁶ Dado que também esta reação ocorre *via* ligação azoto da posição 1, é de esperar a obtenção de um ou dois isómeros posicionais. No entanto, dado que no RMN só é possível identificar um conjunto de picos, podemos concluir que apenas foi obtido um dos isómeros.

Com o propósito de identificar qual o isómero obtido, foram efetuados os espectros de RMN NOESY ¹H-¹H de **1.1** e **1.2** e analisados quais as interações espaciais observadas em cada caso (Figura 2.10).



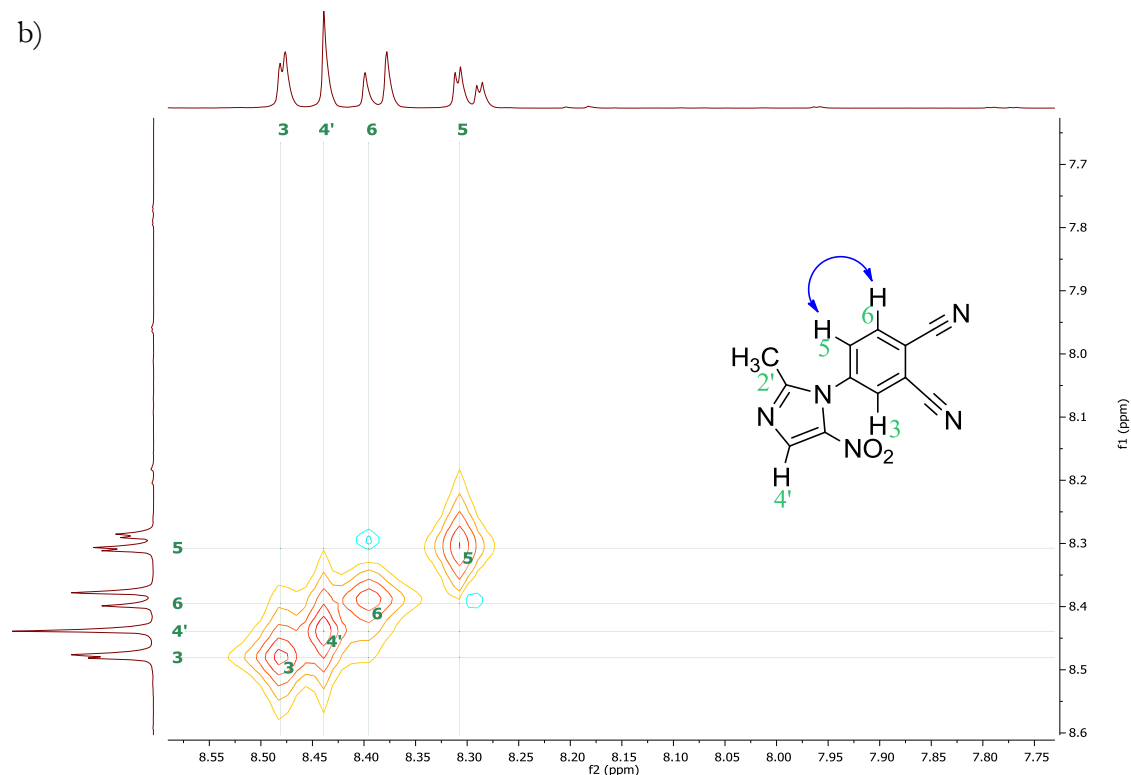


Figura 2.10 – Comparação entre espectros de RMN NOESY ¹H-¹H de: a) **1.1** (DMSO-d₆); b) **1.2** (acetona-d₆).

O NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) permite identificar interações entre prótons próximos espacialmente, sem estarem necessariamente próximos numa perspetiva de ligações químicas. Esta técnica é por isso útil para a identificação de isómeros quando estes diferem entre si pelo aparecimento/desaparecimento de interações espaciais entre prótons com distâncias tipicamente inferiores a 5 Å.¹⁰

Na Figura 2.10a, que diz respeito a **1.1**, é possível observar interações espaciais entre prótons do imidazol e do anel benzénico. De especial importância é o facto de se observar interação entre H5' e H3. Por outro lado, não existe interação entre H4' e qualquer outro hidrogénio do anel benzénico. Ao analisar o espectro obtido para **1.2** (Figura 2.10b), não é possível observar qualquer interação espacial entre os prótons aromáticos do imidazol e do anel benzénico, logo podemos inferir por comparação com os sinais de **1.1** que o grupo nitro se encontra em posição *orto* relativamente ao anel benzénico, o que nos permite concluir que foi obtido o isómero 5-nitro.

Salienta-se que não é do nosso conhecimento a existência de reações de substituição nucleofílica aromática descritas na literatura para este nucleófilo, pelo que a posição do grupo nitro na posição *orto* relativamente ao anel benzénico (isómero 5-nitro) poderá dever-se a um efeito de estabilização do intermediário da reação (complexo de Meisenheimer). Os exemplos conhecidos da literatura¹⁸ referem-se apenas a reações de N-alkilação *via* S_N2 em halogenetos de alquilo onde a

nucleofilicidade do azoto aumenta quando o grupo nitro se encontra em posição *meta*, pelo que é obtido preferencialmente o isómero 4-nitro.

Por questões temporais, não foi possível efetuar a ciclotetramerização deste ftalonitrilo para a obtenção da respetiva metaloftalocianina para posterior cationização.

2.2 Síntese de metaloftalocianinas tetrassubstituídas com o grupo imidazol

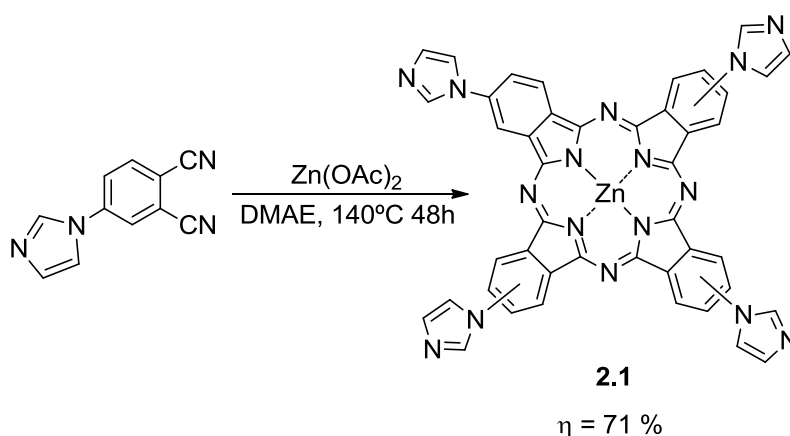
Dependendo do método utilizado, é possível sintetizar ftalocianinas na forma de base livre (PcH₂)¹⁹ ou complexo metálico (PcM). As ftalocianinas do tipo PcH₂, para além de apresentarem maiores dificuldades a nível sintético, tipicamente são menos indicadas para terapia fotodinâmica. Isto deve-se ao facto de possuírem bons rendimentos quânticos de fluorescência²⁰ em detrimento do rendimento quântico de formação de oxigénio singleto. Por oposição, existem complexos metálicos com alguns metais em que os valores de Φ_{Δ} são marcadamente superiores aos das PcH₂.²¹ Dado que a capacidade de formação de espécies reativas de oxigénio é fundamental para a aplicabilidade destas ftalocianinas em PDI, optou-se unicamente pela síntese de ftalocianinas na forma de complexos metálicos. Neste ponto vão ser discutidos os métodos que foram utilizados para a obtenção de metaloftalocianinas a partir de **1.1**, utilizando como metais o Zn(II), In(III) e Al(III). Para a síntese de complexos metálicos de ftalocianinas existem dois métodos possíveis. O primeiro método consiste na inserção do metal na ftalocianina de base livre utilizando um sal metálico apropriado.²² Dado que tipicamente é mais difícil a obtenção da ftalocianina na forma de base livre, este método apenas é útil para a inserção de alguns metais ou semi-metais.²³ O segundo método, o mais utilizado e aquele que foi seguido neste trabalho, consiste na condensação de ftalonitrilos ou outros precursores na presença de um sal metálico.^{1a}

2.2.1 Síntese da metaloftalocianina de Zn(II)

O primeiro metal escolhido para a síntese de metaloftalocianinas utilizando **1.1** foi o Zn(II). Do ponto de vista sintético, o Zn(II) é capaz de formar metaloftalocianinas em bons rendimentos, no entanto a escolha deste metal é uma consequência da necessidade em obter complexos metálicos com elevados rendimentos quânticos de formação de oxigénio singleto.²¹ É, por isso, um dos metais mais escolhidos por outros autores para estudos na área da terapia fotodinâmica.²⁴

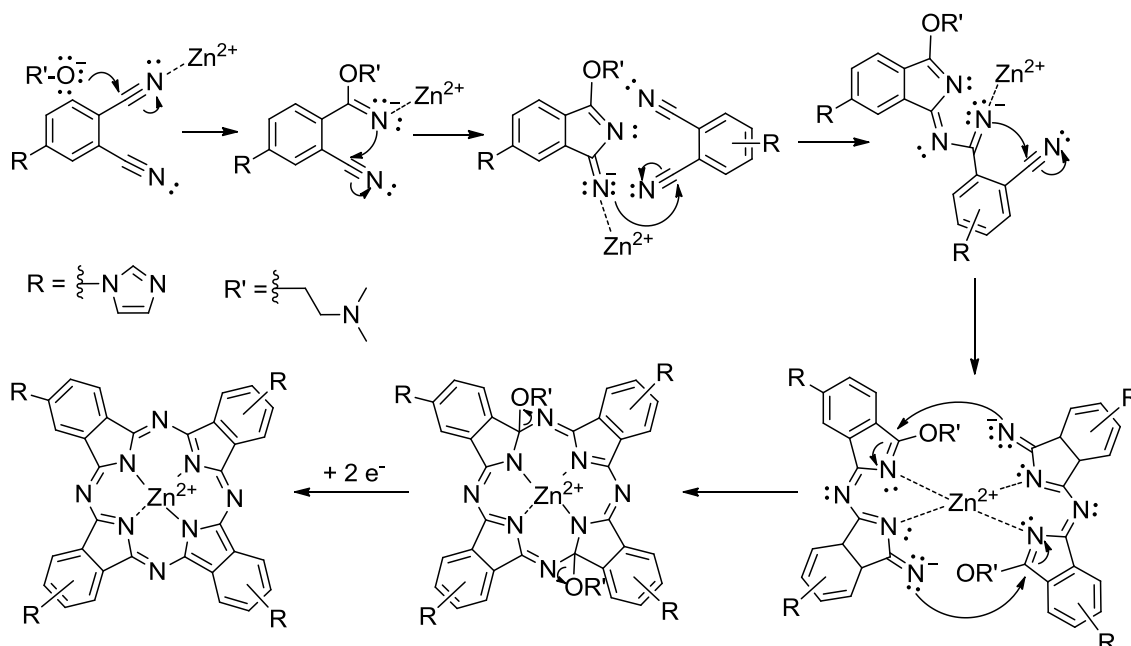
A respetiva reação de síntese encontra-se descrita no Esquema 2.4. As condições utilizadas para a síntese de metaloftalocianinas dependem extensivamente do metal que se pretende que fique inserido na cavidade do macrociclo após a condensação do ftalonitrilo na presença do respetivo sal.

Como será discutido posteriormente, o metal tem um papel importante no auxílio à condensação dos ftalonitrilos. Os complexos metálicos com Zn(II) usualmente necessitam de condições de reação mais suaves quando comparados com outros metais, como será possível constatar posteriormente para o In(III) e Al(III). Tipicamente são utilizados solventes à temperatura de refluxo capazes de formar iões alcóxido na presença de uma base (DBU ou DBN), como acontece com o *n*-pentanol ou o *n*-hexanol. Para este trabalho, foi utilizado como solvente o dimetilaminoetanol (DMAE), que é um álcool com um grupo básico (amina) que permite que a reação prossiga facilmente sem adição de base.^{1b, 25}



Esquema 2.4 – Esquema da reação para a obtenção da metaloftalocianina tetra-imidazol de Zn(II) **2.1**.

É difícil efetuar uma análise detalhada do mecanismo da reação de síntese de ftalocianinas devido às elevadas temperaturas necessárias para a sua formação e a multiplicidade de precursores e condições de reação que já foram descritos.³ Por estes motivos, o mecanismo da reação ainda não foi completamente elucidado, no entanto existem algumas propostas mecanísticas. Aqui será discutida uma dessas propostas (Esquema 2.5),^{1a} que é particularmente relevante para a síntese de ftalocianinas utilizando um álcool na presença de uma base (DBU ou DBN) ou DMAE, como acontece neste caso em particular. Partindo do estudo de compostos intermediários que foram isolados,²⁶ é possível que esta reação envolva uma polimerização passo-a-passo dos precursores ou de intermediários reativos ajudada pela coordenação com o metal e finalizando com o fecho do anel.^{1a} O primeiro passo desta proposta consiste no ataque nucleofílico do alcóxido formado pelo álcool em meio básico ao carbono de um dos nitrilos, seguido do ataque do azoto diretamente ligado ao outro grupo nitrilo formando, assim, o primeiro anel pirrólico. Segue-se uma nova reação de condensação com outro ftalonitrilo e formação do segundo anel pirrólico. A coordenação com o Zn²⁺ facilita a combinação de dois deste dímeros pirrólicos (duas metades da ftalocianina) e, conseqüentemente, a ciclização.²⁷



Esquema 2.5 – Proposta de mecanismo para a formação da metalofalocianina **2.1** na presença de um álcool (DMAE) em meio básico.^{1a}

De modo a garantir a aromaticidade do sistema, ocorre a saída dos dois grupos alcóxido, juntamente com a transferência de 2 elétrons para o sistema. O facto de já ter sido encontrado o aldeído correspondente do álcool utilizado sugere que o álcool é uma das fontes de elétrons para a redução do macrociclo.^{1a}

O Zn(II) apresenta um raio iónico comparável aos de outros metais como o Co(II), Fe(II), Cu(II) e Mn(II). Estes raios iónicos encontram-se próximos do raio da cavidade da ftalocianina, pelo que o Zn(II) fica situado apenas marginalmente acima do plano do macrociclo.²⁸ Dada a importância do metal enquanto *template* para a formação da ftalocianina, o facto de o Zn(II) e os outros metais referidos terem tamanhos próximos dos ideais para a interação com os azotos interiores poderá explicar a maior facilidade na obtenção de complexos com estes metais.

A reação foi considerada como terminada após 48h, apesar de ainda restar algum composto de partida (ou algum produto secundário com semelhante fator de retenção), para impedir posterior degradação térmica do produto. Uma das características observadas neste composto é a sua falta de solubilidade na maioria dos solventes orgânicos (i.e. clorofórmio, metanol, tolueno, THF, acetona), algo que acontece frequentemente com ftalocianinas não substituídas, como foi referido no capítulo introdutório. Apenas foi possível observar uma solubilidade apreciável em DMF, DMSO e piridina. Pela basicidade dos grupos imidazol, a ftalocianina era solúvel em solventes próticos como etanol, metanol e H₂O a valores de pH ácidos. Esta propriedade faz com que não seja possível purificar este composto por cromatografias convencionais, dadas as suas dificuldades de eluição. Não obstante, abre a possibilidade de utilização de técnicas mais simples e económicas. Assim, o produto contido na mistura reacional em DMAE foi precipitado por adição de metanol. Para

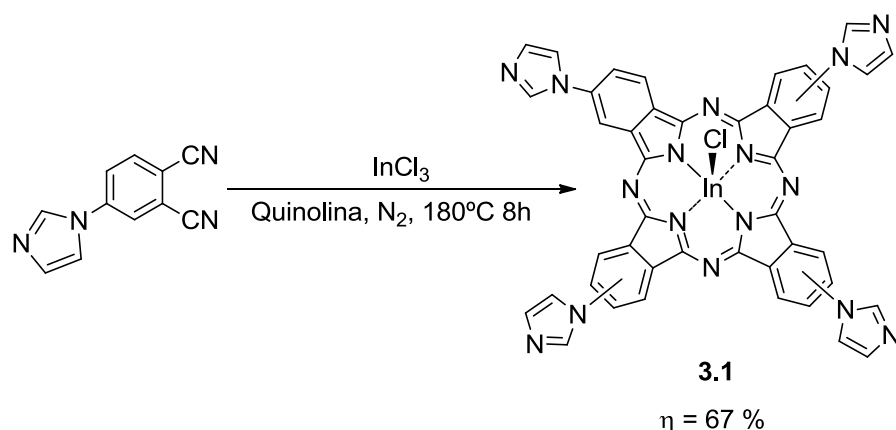
garantir a remoção de todas as impurezas, nomeadamente ftalonitrilo de partida, produtos de degradação e $Zn(OAc)_2$, o precipitado foi filtrado e lavado com solventes de diferentes polaridades entre os quais H_2O , acetona e diclorometano. O produto **2.1** foi obtido com um rendimento de 71%.

Numa primeira abordagem, foi tentada uma caracterização da ftalocianina na sua forma neutra por RMN 1H em DMSO, no entanto não foi possível obter sinal devido ao grau de agregação demonstrado às concentrações necessárias para este tipo de caracterização. Foi possível, no entanto, obter um espectro de RMN 1H em piridina- d_5 a $80^\circ C$. A surpreendente solubilidade deste composto em piridina é uma consequência da capacidade de o azoto aromático deste solvente coordenar axialmente com o metal, o que impede as interações de π - π *stacking* e, consequentemente, reduz a sua tendência em agregar.²⁹

2.2.2 Síntese da metaloftalocianina de In(III)

A decisão para a utilização do In(III) resultou de uma análise sistemática dos valores de Φ_Δ reportados na literatura para o respetivo complexo metálico.^{21, 30} Estes valores eram tendencialmente acima dos 0,50, o que torna relevante o estudo destes complexos metálicos para aplicação em PDI. Além disso, como o ligando macrocíclico tem um estado de oxidação -2, os complexos metálicos com In(III) terão um ligando axial de modo a manter a neutralidade do complexo. Esta propriedade permite estender a química destas ftalocianinas a reações de troca de ligando axial, abrindo a possibilidade à introdução de grupos com propriedades biológicas relevantes. No caso específico das metaloftalocianinas de In(III), já foram descritas vias sintéticas para a troca do seu ligando axial utilizando reagentes de Grignard.³¹

A contrastar com a metaloftalocianina de Zn(II), as condições reacionais para a obtenção de metaloftalocianinas de In(III) são mais severas. Possivelmente esta menor reatividade estará relacionada com o maior raio iónico do In(III), fazendo-o sair da cavidade do macrociclo, o que poderá diminuir a sua capacidade de atuar como *template* para a condensação dos ftalonitrilos. Deste modo, a utilização de DMAE em refluxo a $140^\circ C$ não resulta na formação de uma quantidade apreciável da metaloftalocianina pretendida. É assim necessário trocar este álcool por um solvente de maior ponto de ebulição, como é o caso da quinolina.³² A reação efetuada encontra-se descrita no Esquema 2.6.



Esquema 2.6 – Esquema da reação para a obtenção da metaloftalocianina tetra-imidazol de InCl(III) **3.1**.

Apesar de serem utilizadas condições de reação mais severas (180°C), foi possível obter a metaloftalocianina de In(III) com rendimentos muito semelhantes aos observados para a de Zn(II). A reação foi terminada ao fim de 8 h, independentemente da existência de substrato. As temperaturas elevadas promovem igualmente um aumento da cinética de termodegradação do produto, pelo que não é recomendável tempos de reação superiores. A degradação desta ftalocianina é especialmente notória na ausência de atmosfera inerte, visto que a repetição desta reação em condições apenas de atmosfera fechada resultou num rendimento de apenas 20%. Esta ftalocianina apresenta as mesmas características de solubilidade de **2.1**, pelo que foi seguido um processo de purificação semelhante. Foi possível observar a influência da presença de um ligando axial na medida em que, ao contrário de **2.1**, foi possível efetuar o espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 (Figura 2.11), o que é preferível dado que este solvente não apresenta picos na zona típica dos sinais aromáticos que se possam sobrepor aos da amostra. Neste espectro são observados seis picos bem definidos o que permite uma atribuição mais fácil dos sinais, tendo por base as atribuições feitas para **1.1**.

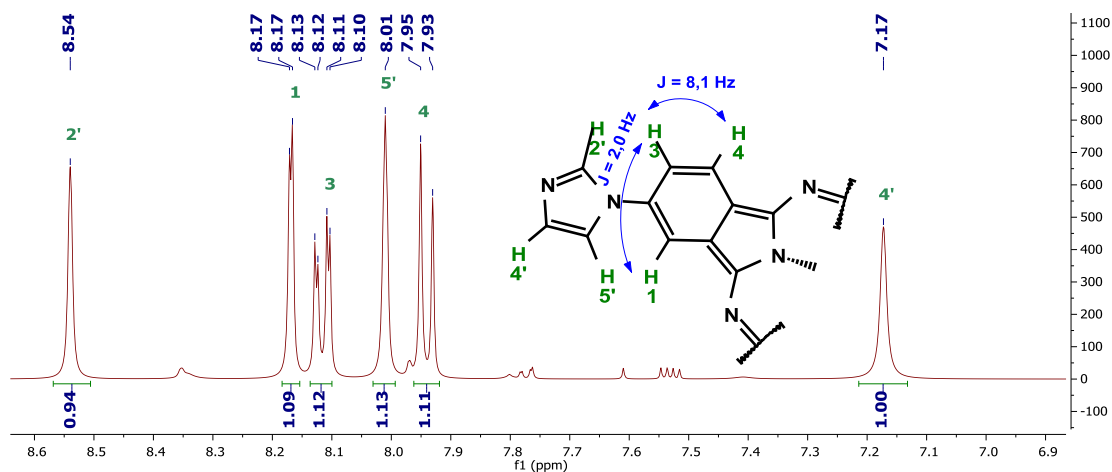


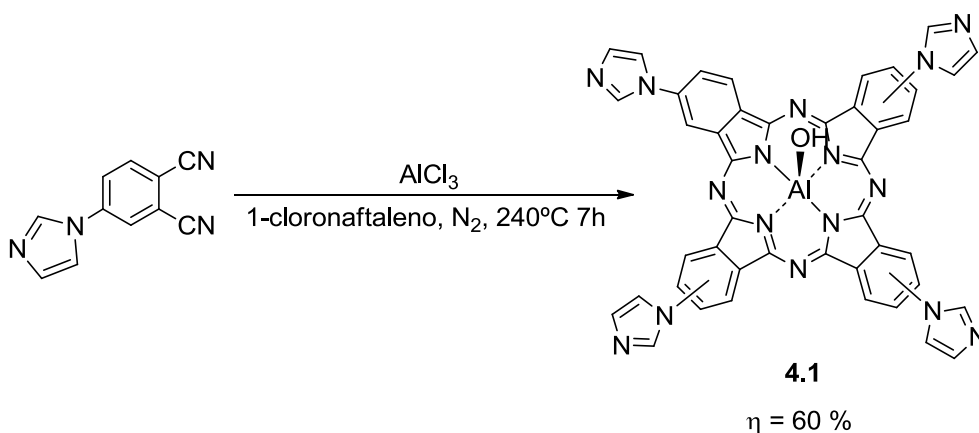
Figura 2.11 – RMN ^1H de **3.1** feito em DMSO- d_6 . Por simplicidade de interpretação, as integrações apresentadas dizem respeito apenas a $\frac{1}{4}$ dos prótons totais do macrociclo.

É possível identificar três picos com aparência de singuleto, que deverão corresponder ao imidazol. É expectável que a perda dos grupos ciano tenha um maior reflexo nos sinais dos prótons dos anéis benzénicos do que do imidazol. À semelhança do que foi observado para **1.1**, o próton do imidazol com maior desvio será aquele que se encontra entre os dois azotos (H2^o) e o com menor desvio aquele que se encontra em posição *meta* relativamente ao anel benzénico (H4^o). Os restantes picos apresentam padrões de acoplamento iguais aos observados nos anéis benzénicos de ftalonitrilos. Como tal, é possível atribuir o sinal duplete $J = 2,0$ Hz (8,17 ppm) ao hidrogénio entre o imidazol e o anel pirrólico (H1), visto que corresponderá a um acoplamento do tipo 4J . O duplete $J = 8,1$ Hz pertence ao outro hidrogénio vicinal ao anel pirrólico (H4) e o duplo duplete a H3.

2.2.3 Síntese da metaloftalocianina de Al(III)

Os complexos metálicos formados com Al(III) tipicamente não apresentam valores de Φ_{Δ} tão bons quantos os de Zn(II) ou In(III).^{21, 30a} Embora, como foi discutido previamente, as metaloftalocianinas de In(III) tenham capacidade de ser utilizadas em reações de troca de ligando axial, apenas foram descritas metodologias utilizando reagentes de Grignard. Por oposição, as metaloftalocianinas de Al(III) apresentam uma química mais rica em termos da modelação dos ligandos axiais. Já foram descritas reações de hidrólise,³³ troca por fenóis³⁴ ou alcoóis alifáticos.³³ Esta flexibilidade poderá ser relevante, numa perspetiva futura, para a ligação de moléculas biologicamente ativas e assim obter fotossensibilizadores com uma atividade dual, ou seja, capaz de exercer uma atividade antimicrobiana através da combinação dos mecanismos de PDI já descritos e do fármaco escolhido para ligação axial.

As condições reacionais necessárias para a obtenção de metaloftalocianinas de Al(III) são mais severas do que as descritas para as duas ftalocianinas anteriores. Sendo assim, foi utilizado 1-cloronaftaleno, um solvente de maior ponto de ebulição que a quinolina, e a reação foi efetuada a 240°C durante 7h (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 – Esquema da reação para a obtenção da metaloftalocianina tetra-imidazol de Al(OH)(III) **3.1**.

Dos três metais mencionados, o Al(III) é o que possui o raio iônico mais pequeno, ficando dentro da cavidade do macrociclo. Novamente, é possível observar-se a importância do metal para a condensação dos ftalonitrilos, na medida em que o raio iônico baixo do Al(III) poderá estar a diminuir o seu efeito *template* na aproximação e estabilização dos intermediários de reação. Esta tendência também se verifica para outros metais de raio iônico semelhantes como o Ga(III)³⁵ ou semi-metais como o Si(IV) ou Ge(IV), que precisam de temperaturas igualmente elevadas e/ou precursores mais reativos.³

Esta metalofteralocianina, ao contrário das duas anteriores, relevou uma solubilidade apreciável em metanol, provavelmente fruto de possuir um grupo hidroxilo como ligando axial. Deste modo, o composto foi precipitado com diclorometano em vez de metanol e foram feitas lavagens do sólido com todos os solventes mencionados previamente com excepção de metanol.

O composto foi caracterizado por RMN ¹H e ESI-TOF. Surpreendentemente, a análise do espectro de ESI-TOF (Figura 2.12) revelou como pico maioritário o ião molecular [M+H]⁺ = 821,2285 correspondente ao complexo metálico com um grupo hidroxilo como ligando axial em vez de um Cl. Adicionalmente, não foi possível identificar qualquer pico relativo ao complexo com um Cl axialmente coordenado.

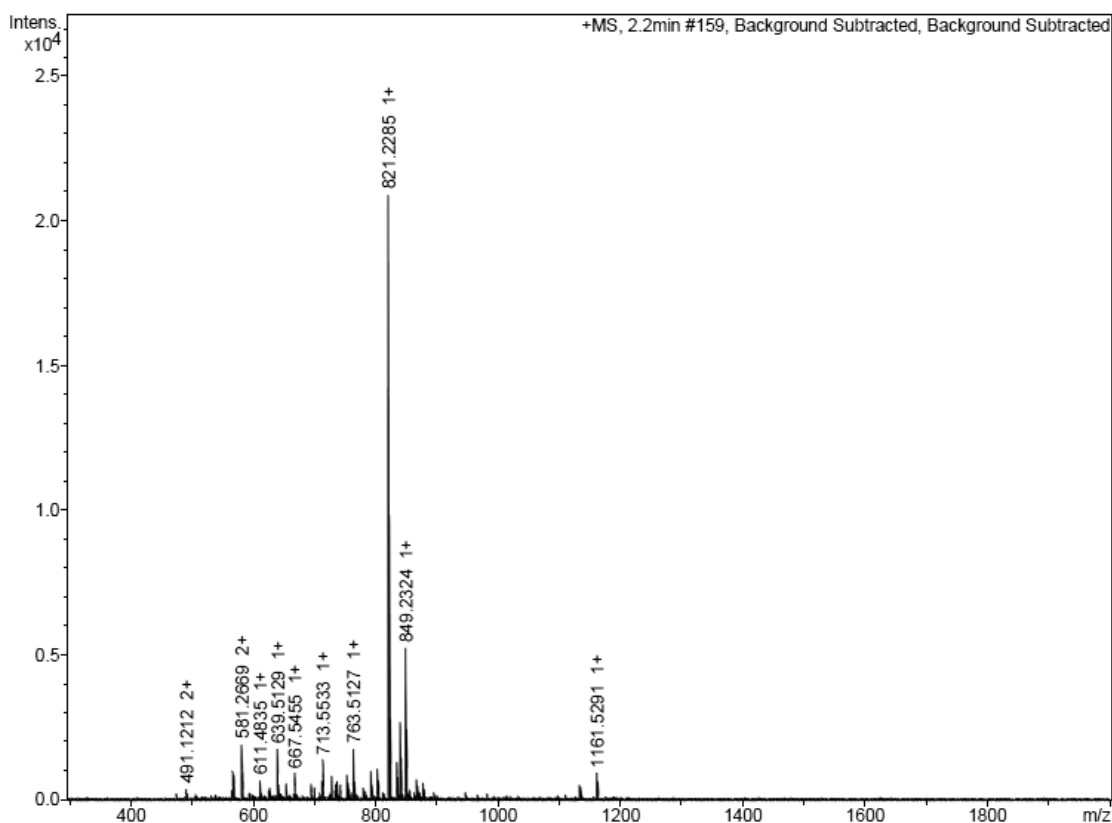


Figura 2.12 – Espectro de massa ESI-TOF de 4.1.

A hidrólise do ligando axial das metalofteralocianinas de Al(III) ocorre tipicamente com aquecimento em meio básico (piridina-NH₄OH 1:1).³³ Sendo o AlCl₃ um ácido de Lewis, não seria expectável a ocorrência desta reação durante a síntese da ftalocianina. No entanto, este sal é

adicionado na proporção de 1:2 relativamente ao ftalonitrilo, ou seja, existe o dobro de equivalentes de grupos imidazol do que de ácido. O imidazol, pelo seu carácter básico, poderá coordenar com o AlCl_3 formando aductos de Lewis, o que diminui a acidez do meio. A presença de quantidades vestigiais de água no solvente ou no próprio sal, que é bastante higroscópico, combinada com as condições de temperatura alta necessárias deverá ter um efeito sinérgico na hidrólise do Cl. A perda do Cl como ligando axial dificulta modificações posteriores ao nível da coordenação axial visto que a maioria das vias sintéticas descritas partem da metaloftalocianina de $\text{AlCl}(\text{III})$.

Dado que um dos objetivos da síntese desta metaloftalocianina era a modificação posterior do ligando axial para conjugação com moléculas biologicamente ativas, teria de ser seguida uma via sintética alternativa para a obtenção do complexo metálico pretendido. Uma das possíveis vias envolveria uma reação de desmetalacão de **2.1**, seguida de uma complexação com $\text{Al}(\text{III})$ por adição de AlCl_3 . Este tipo de reação, por acontecer a temperaturas substancialmente mais baixas do que as da síntese da metaloftalocianina utilizando o sal de $\text{AlCl}(\text{III})$ como *template*, poderia não levar à hidrólise do ligando axial.

2.3 Cationização das metaloftalocianinas

Tendo em conta que o objetivo deste trabalho consiste em sintetizar moléculas catiónicas que estabeleçam interações eletrostáticas com as membranas da bactérias, particularmente as gram-negativas, o passo seguinte consistirá na alquilação dos grupos imidazol das três metaloftalocianinas (**2.1**, **3.1** e **4.1**), utilizando diferentes agentes alquilantes: iodoetano (tetracatiónicas de cadeia curta); iodooctano (tetracatiónicas de cadeia longa) e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio (octacatiónicas).

Numa primeira fase, serão discutidas as reações para a obtenção de macrociclos tetracatiónicos e numa segunda fase, a reação de síntese da metaloftalocianina de $\text{Zn}(\text{II})$ octacatiónica. Os primeiros estudos de estrutura/atividade efetuados, que serão discutido em maior detalhe no Capítulo 3, revelaram melhores resultados para a metaloftalocianina de $\text{Zn}(\text{II})$ cationizada com iodoetano (cadeia curta) quando comparada com a cationizada com o iodooctano (cadeia longa). Por este motivo, foram sintetizadas as metaloftalocianinas tetracatiónicas de $\text{In}(\text{III})$ e $\text{Al}(\text{III})$ apenas utilizando o iodoetano. Em todas as reações efetuadas foi utilizado DMF como solvente, visto ser o melhor solvente para a dissolução das ftalocianinas neutras.

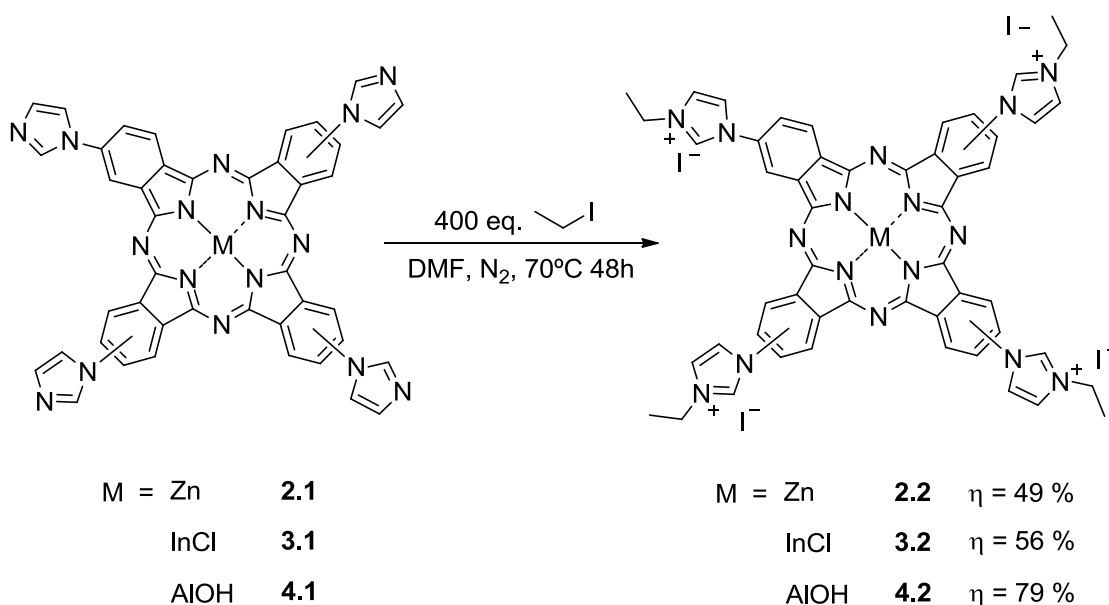
2.3.1 Metaloftalocianinas tetracatiónicas

Para a síntese de ftalocianinas cationizadas com uma cadeia curta, foi escolhido o iodoetano como agente alquilante. Este reagente confere uma maior facilidade na execução da reação, visto

que apresenta um ponto de ebulição (72°C) superior ao do iodoetano (42°C), o que permite forçar as condições de reação para garantir a obtenção do composto tetracatiônico. No entanto, a razão mais importante para a sua escolha está relacionada com o propósito deste trabalho, que é estabelecer uma relação entre a estrutura dos compostos, as suas características fotofísicas e fotoquímicas e a sua atividade biológica. Como será possível observar posteriormente, a síntese da metalofteralocianina de Zn(II) octacatiônica utiliza como agente alquilante o cloreto de (2-cloroetil)trimetilamônio que resultará numa metalofteralocianina com uma cadeia de 2 carbonos ligados ao imidazol. Assim, a escolha do iodoetano, um reagente também com uma cadeia de dois carbonos, permitirá uma melhor comparação da relação estrutura/atividade entre as metalofteralocianinas tetracatiônica e octacatiônica de Zn(II).

Para a cationização de cada uma das três metalofteralocianinas, foram utilizadas as mesmas condições de reação, que se encontram descritas no Esquema 2.8.

Após conclusão da reação, os produtos foram obtidos por precipitação a partir da mistura reacional em DMF utilizando diclorometano ou éter etílico. Tendo em conta o tipo de reação em causa, os rendimentos obtidos são baixos, particularmente para as metalofteralocianinas de Zn(II) e InCl(III), o que se poderá dever a uma degradação parcial dos compostos. Para o complexo de InCl(III), observou-se uma desmetelação parcial durante a reação, que apenas foi detectada durante os seus estudos fotofísicos, pelo que este fenómeno será discutido em maior detalhe no Capítulo 3. De qualquer modo, a adição de InCl₃ ao crude da reação seguido de algumas horas em agitação a 70°C permitiu a total reintrodução do metal na cavidade do macrociclo.



Esquema 2.8 – Esquema das reações para a obtenção da ftalocianina tetracatiônicas com o grupo etilo **2.2**, **3.2** e **4.2**.

Foi possível observar que a cationização levou a uma alteração significativa às suas propriedades no que diz respeito à sua solubilidade e agregação. Assim, passaram a ser solúveis em solventes polares próticos como etanol, metanol e água. Ao contrário das ftalocianinas neutras, foi possível efetuar a caracterização dos compostos por RMN ^1H em DMSO- d_6 sem serem detetados problemas relacionados com a agregação dos compostos. A título de exemplo, é apresentado o espectro de RMN ^1H de **3.2** (Figura 2.13) em DMSO- d_6 .

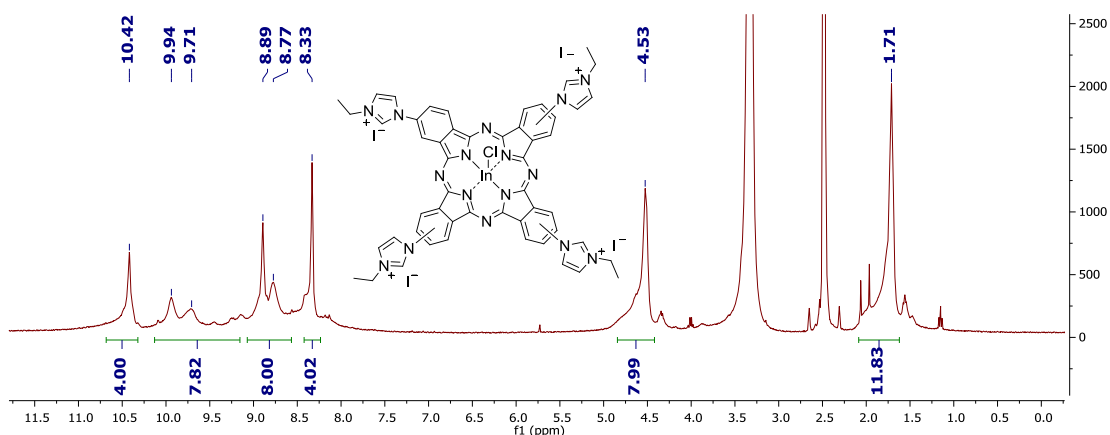
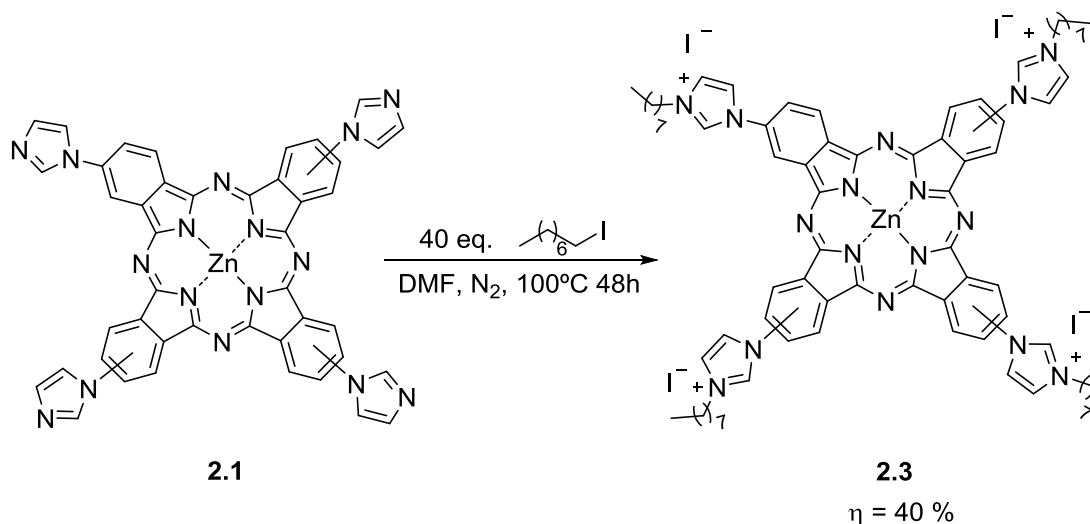


Figura 2.13 – Espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 de InCl(III).

Comparando com o espectro de RMN ^1H de **3.1**, é possível observar um desvio de todos os sinais para frequência de ressonância mais altas, uma consequência natural da introdução de grupos cationicos e, por isso, fortemente atratores de elétrons. Deste espectro de RMN destacam-se duas informações particularmente relevantes que permitem comprovar que ocorreu uma cationização completa: i) existem apenas 6 sinais aromáticos e é possível identificar um deslocamento pico do H_4 , previamente a 7,17 ppm, para a zona de picos aromáticos não atribuídos localizada entre 8,33 e 10,42 ppm; ii) comparando a integração dos sinais aromáticos com a dos dois sinais alquílicos provenientes da cationização, observa-se uma proporção de 24 para 20 hidrogénios, respetivamente, indicando que a reação de tetracationização foi completa.

Como foi discutido na introdução, alguns estudos da literatura³⁶ demonstraram que o aumento das cadeias alquílicas resulta numa maior internalização e efeito bactericida. Os resultados apresentados por Thomas, *et al.* permitem concluir que ocorre um efeito máximo em porfirinas tetracatiónicas com cadeias alquílicas de 6 e 8 carbonos. Tendo em conta estas evidências experimentais, foi efetuada a cationização de **2.1** utilizando como agente alquilante o iodoctano. O Esquema 2.9 apresenta as condições empregues nesta reação.

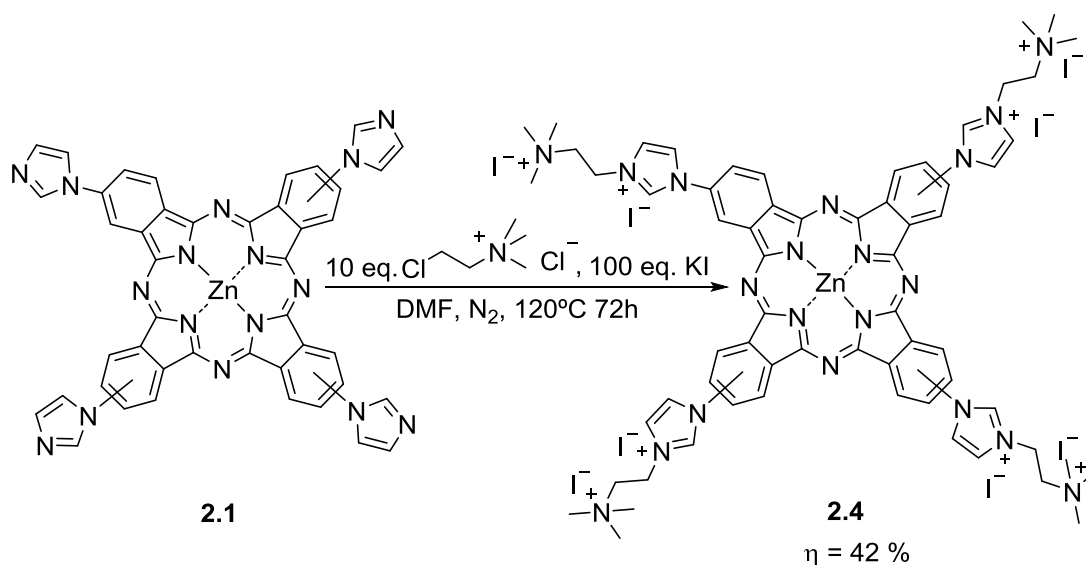


Esquema 2.9 – Reação de cationização de **2.1** utilizando iodoctano como agente alquilante.

O processo de purificação consistiu, à semelhança do que aconteceu com as outras ftalocianinas catiónicas, numa precipitação do produto com diclorometano. Observou-se que o aumento das cadeias alquílicas fez com que o composto deixasse de ter uma solubilidade apreciável em H₂O, necessitando da adição de 1% de DMSO. A análise do respetivo espectro de RMN ¹H e ESI-TOF permitiu confirmar que ocorreu a total cationização da metaloftalocianina.

2.3.2 Metaloftalocianina octacatiónica de Zn(II)

A última modelação estrutural proposta na introdução desta dissertação consiste em octacationizar uma ftalocianina e estudar o efeito do aumento do grau de cationização. Como já foi referido, o aumento do número de cargas positivas tem demonstrado maior grau de inativação de bactérias gram-negativas.^{24a, 37} O aumento do grau de cationização poderia ser feito por duas vias: i) modelação de um ftalonitrilo de modo a obter um derivado 4,5-diimidazolil, ou seja, um precursor que resultaria numa ftalocianina octasubstituída com o grupo imidazol, que seria cationizada utilizando um procedimento semelhante ao já descrito neste trabalho; ii) alteração do agente cationizante utilizado nas ftalocianinas tetra-substituídas já sintetizadas, de modo a este já incluir um sal de amónio quaternário. Optou-se por esta última estratégia dado que permitiria obter derivados octacatiónicos de forma mais rápida, dado que evita os vários passos sintéticos de modelação de ftalonitrilos e síntese de uma nova ftalocianina. Além disso, é preciso ter em conta as propriedades ideais de um fotossensibilizador que já foram referidas no capítulo introdutório. Comparando o peso molecular final dos fotossensibilizador obtidos por ambas as estratégias, podemos concluir que esta última também resultará numa molécula de menor peso molecular. O Esquema 2.10 traduz a reação efetuada para a metaloftalocianina de Zn(II).



Esquema 2.10 – Reação de síntese da metaloftalocianina octacatiónica de Zn(II) **2.4**.

A escolha do cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio (CCC) como agente cationizante foi feita com base na sua disponibilidade comercial e reduzido tamanho molecular. A falta de disponibilidade comercial do correspondente agente cationizante com uma cadeia alquílica de apenas um carbono ditou a escolha do iodoetano como agente cationizante para as ftalocianinas tetracatiónicas, como já foi referido anteriormente.

A utilização do CCC como agente cationizante traz, no entanto, um descréscimo de reatividade quando comparado com os agentes iodados, na medida em que o cloro é um pior grupo abandonante. Na tentativa de forçar a reação, a temperatura foi aumentada para 120°C e deixada durante 72h. Além disso, foi adicionado um elevado excesso de KI com o objetivo de catalisar a reação por troca *in situ* do cloro por iodo, tornando o agente cationizante mais reativo. Após o término da reação, o composto foi obtido por precipitação com diclorometano. O tipo de reagentes utilizados faz com que o sólido precipitado contenha contaminação com o agente cationizante e KI. Numa primeira abordagem, o precipitado foi lavado várias vezes com etanol. Observou-se que a elevada polaridade do composto fez com que este não apresentasse solubilidade apreciável em etanol e DMF à temperatura ambiente. O composto apresentava uma solubilidade reduzida em metanol, no entanto, era bastante solúvel em DMSO e H₂O. De modo a garantir que todo o sal teria sido removido, foi feita uma purificação baseada em exclusão por peso molecular. Dado que o ião molecular de **2.4** possuía um peso molecular de 1191 Da e as impurezas 158-166 Da, foi utilizada a resina Sephadex® G-10. Este tipo de resinas são constituídas por redes tridimensionais de dextrano interligado e podem apresentar poros de diferentes tamanhos. No caso particular da resina utilizada, moléculas com tamanhos superiores a 700 Da são excluídas dos poros, eluindo em primeiro lugar. A entrada das impurezas de menor peso molecular nos poros irá retardar a sua eluição.

2.4 Conclusão

Ao longo deste capítulo, foram explorados os métodos sintéticos envolvidos na modelação de ftalonitrilos, síntese de metaloftalocianinas com três metais diferentes e cationização utilizando agentes alquilantes distintos. Foi possível obter dois novos ftalonitrilos mono-substituídos com os grupos imidazol e 2-metil-5-nitroimidazol, tendo este primeiro já sido utilizado para a síntese de metaloftalocianinas. Ambos os compostos foram obtidos com rendimentos na ordem dos 50% e caracterizados com recurso a RMN ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C .

As metaloftalocianinas de Zn(II), InCl(III) e AlOH(III) foram obtidas com bons rendimentos (60-71%), tendo sido utilizados métodos de purificação simples e rápidos por via de precipitações e lavagens, o que é uma consequência da falta de solubilidade destes macrociclos na maioria dos solventes convencionais. Os espectros de RMN ^1H , alguns dois quais discutidos nesta dissertação, permitiram, juntamente com os espectros de ESI-TOF, confirmar a identidade dos compostos e verificar a ausência de impurezas de natureza orgânica. Ao contrário do pretendido, foi obtido o complexo metálico de AlOH(III) em vez do de AlCl(III), o que dificulta posteriores modificações ao nível da troca de ligandos axiais. Assim, é proposto uma via sintética alternativa que poderá permitir obter o complexo metálico pretendido.

Partindo das três metaloftalocianinas tetra-substituídas com o grupo imidazol, foi possível proceder à sua cationização utilizando diferentes agentes. De modo a poder comparar o efeito do metal nas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas, os três complexos metálicos foram cationizados com iodoetano. Partindo de resultados experimentais promissores publicados por outros autores, foi estudado o efeito do aumento da cadeia alquílica cationizante e do número de grupos catiónicos inseridos no macrociclo. Partindo da metaloftalocianina de Zn(II), foi feita uma cationização utilizando o iodoctano e um sal quaternário de amónio, o cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio. Foi possível obter cationização total para todos os complexos metálicos e agentes cationizantes utilizados. Os produtos foram todos purificados através de métodos de precipitação com excepção de **2.4** que, pela natureza iónica dos reagentes utilizados, necessitou de uma técnica de separação de exclusão molecular por tamanho.

Em conclusão, foi possível efetuar a síntese e caracterização estrutural de uma família de compostos que permite fazer estudos de estrutura/atividade ao nível de três parâmetros: tamanho da cadeia alquílica, natureza do metal central e grau de cationização da molécula.

2.5 Referências

- [1] (a) McKeown, N. B., 98 - The Synthesis of Symmetrical Phthalocyanines. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 61-124; (b) Nemykin, V. N.; Lukyanets, E. A., *ARKIVOC*, **2010**, 136-208.
- [2] Lukyanets, E. A.; Nemykin, V. N., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2010**, *14*, 1-40.
- [3] Angerer, S.; Tochtermann, W., *Methods in Organic Chemistry - Methoden der Organischen Chemie*. Thieme: **1997**; Vol. E9.
- [4] Brach, P. J.; Grammatica, S. J.; Ossanna, O. A.; Weinberger, L., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1970**, *7*, 1403-1405.
- [5] (a) Khan, E. H.; Ali, H.; Tian, H.; Rousseau, J.; Tessier, G.; Shafiullah; van Lier, J. E., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, *13*, 1287-1290; (b) Singh, S.; Aggarwal, A.; Bhupathiraju, N. V. S. D. K.; Arianna, G.; Tiwari, K.; Drain, C. M., *Chemical reviews*, **2015**, *115*, 10261-10306; (c) Pinto, S. M. A.; Tomé, V. A.; Calvete, M. J. F.; Pereira, M. M.; Burrows, H. D.; Cardoso, A. M. S.; Pallier, A.; C.A. Castro, M. M.; Tóth, É.; Geraldés, C. F. G. C., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2016**, *154*, 50-59.
- [6] Rădiþoiu, V.; Wagner, L.; Rădiþoiu, A.; Ardeleanu, P.; Amăriuþei, V.; Sorescu, A., *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition*, **2008**, *59*, 973-978.
- [7] Hayamizu, K.; Yanagisawa, M.; Yamamoto, O., Spectral Database for Organic Compounds SDBS: <http://sdb.sdb.aist.go.jp> (acedido em 8/05/2017). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.
- [8] Zhang, S.; Yang, S.; Lan, J.; Yang, S.; You, J., *Chemical Communications*, **2008**, 6170-6172.
- [9] Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R., *Introduction to spectroscopy*. Fourth edition. ed.; Cengage Learning: Belmont, CA, **2009**.
- [10] Balci, M., *Basic 1H- and 13C-NMR spectroscopy*. First edition. ed.; Elsevier: Amsterdam ; Boston, **2005**.
- [11] Alka, M., *Scientia Pharmaceutica*, **2009**, *77*, 497-520.
- [12] Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*. 7th ed.; Butterworth-Heinemann: **2012**.
- [13] Buncel, E.; Symons, E. A., *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, **1970**, *3*, 164-165.
- [14] Wöhrle, D.; Knothe, G., *Synthetic Communications*, **1989**, *19*, 3231-3239.
- [15] Kochergin, P. M.; Tsyganova, A. M.; Blinova, L. S.; Shlikhunova, V. S., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **1966**, *1*, 594-596.
- [16] Bhujanga Rao, A. K. S.; Gundu Rao, C.; Singh, B. B., *Synthetic Communications*, **1991**, *21*, 427-433.

- [17] Long, A.; Parrick, J.; Hodgkiss, R. J., *Synthesis*, **1991**, 1991, 709-713.
- [18] Miller, M. W.; Howes, H. L.; Kasubick, R. V.; English, A. R., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1970**, 13, 849-852.
- [19] (a) Haruhiko, T.; Shojiro, S.; Shojiro, O.; Shinsaku, S., *Chemistry Letters*, **1980**, 9, 1277-1280; (b) Brewis, M.; Clarkson, G. J.; Humberstone, P.; Makhseed, S.; McKeown, N. B., *Chemistry – A European Journal*, **1998**, 4, 1633-1640; (c) Lever, A. B. P., The Phthalocyanines. In *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, Emeléus, H. J.; Sharpe, A. G., Eds. Academic Press: **1965**; Vol. Volume 7, pp 27-114.
- [20] Isago, H., *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds*. Springer Japan: **2015**.
- [21] Nyokong, T.; Ahsen, V., *Photosensitizers in medicine, environment, and security*. Springer Netherlands: Dordrecht, **2012**.
- [22] Haruhiko, T.; Shojiro, S.; Shinsaku, S., *Chemistry Letters*, **1983**, 12, 313-316.
- [23] (a) Joyner, R. D.; Linck, R. G.; Esposito, J. N.; Kenney, M. E., *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, **1962**, 24, 299-302; (b) Lobo, A. C. S.; Silva, A. D.; Tomé, V. A.; Pinto, S. M. A.; Silva, E. F. F.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, 59, 4688-4696.
- [24] (a) Hamblin, M. R.; Jori, G., *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2011**; (b) Wainwright, M., *Photosensitisers in biomedicine*. Wiley-Blackwell: Chichester, UK ; Hoboken, NJ, **2009**.
- [25] Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 1-60.
- [26] Oliver, S. W.; Smith, T. D., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1987**, 1579-1582.
- [27] (a) Gaspard, S.; Maillard, P., *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1083-1090; (b) Christie, R. M.; Deans, D. D., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1989**, 193-198.
- [28] Tackley, D. R.; Dent, G.; Ewen Smith, W., *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3, 1419-1426.
- [29] (a) Dogra, S. D.; Singh, S.; Kaur, S.; Tripathi, S. K.; Saini, G. S. S., *Vibrational Spectroscopy*, **2011**, 56, 60-65; (b) Cariati, F.; Galizzioli, D.; Morazzoni, F.; Busetto, C., *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **1975**, 556-561.
- [30] (a) Yanik, H.; Aydın, D.; Durmuş, M.; Ahsen, V., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2009**, 206, 18-26; (b) Chauke, V.; Durmuş, M.; Nyokong, T., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2007**, 192, 179-187.
- [31] Hanack, M.; Schneider, T.; Barthel, M.; Shirk, J. S.; Flom, S. R.; Pong, R. G. S., *Coordination Chemistry Reviews*, **2001**, 219–221, 235-258.
- [32] Durmuş, M.; Erdoğmuş, A.; Oğunsipe, A.; Nyokong, T., *Dyes and Pigments*, **2009**, 82, 244-250.

- [33] Decréau, R.; Chanon, M.; Julliard, M., *Synthetic Communications*, **2000**, *30*, 2049-2056.
- [34] (a) Brasseur, N.; Ouellet, R.; Madeleine, C. L.; Lier, J. E. v., *British Journal of Cancer*, **1999**, *80*, 1533-1541; (b) Raboui, H.; Al-Amar, M.; Abdelrahman, A. I.; Bender, T. P., *RSC Advances*, **2015**, *5*, 45731-45739.
- [35] Chauke, V.; Ogunsipe, A.; Durmuş, M.; Nyokong, T., *Polyhedron*, **2007**, *26*, 2663-2671.
- [36] (a) Thomas, M.; Craik, J. D.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., *Future Microbiology*, **2015**, *10*, 709-724; (b) Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J. C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U., *Photochemistry and photobiology*, **2002**, *75*, 462-470.
- [37] Dei, D.; Chiti, G.; De Filippis, M. P.; Fantetti, L.; Giuliani, F.; Giuntini, F.; Soncin, M.; Jori, G.; Roncucci, G., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2006**, *10*, 147-159.

Capítulo 3

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e biológicos das metaloftalocianinas sintetizadas

No capítulo anterior, foi discutida a síntese de um conjunto de metaloftalocianinas com diferentes características estruturais, às quais deverão corresponder propriedades fotofísicas, fotoquímicas e biológicas distintas. Como já foi discutido no capítulo introdutório, existem algumas características importantes para os fotossensibilizadores destinados a terapia antimicrobiana, nomeadamente elevados coeficientes de absorção molar e rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto. Ao longo deste capítulo serão discutidos os estudos que foram efetuados e que permitiram determinar quais as moléculas com as melhores propriedades para PDI. Para tal, é necessário uma maior compreensão dos fenómenos envolvidos no mecanismo de ação da terapia fotodinâmica, que foi descrito na Figura 1.5. O diagrama de Jablonski (Figura 3.1)¹ permite efetuar uma análise mais profunda dos fenómenos resultantes das interações dos macrociclos tetrapirrólicos com a luz.

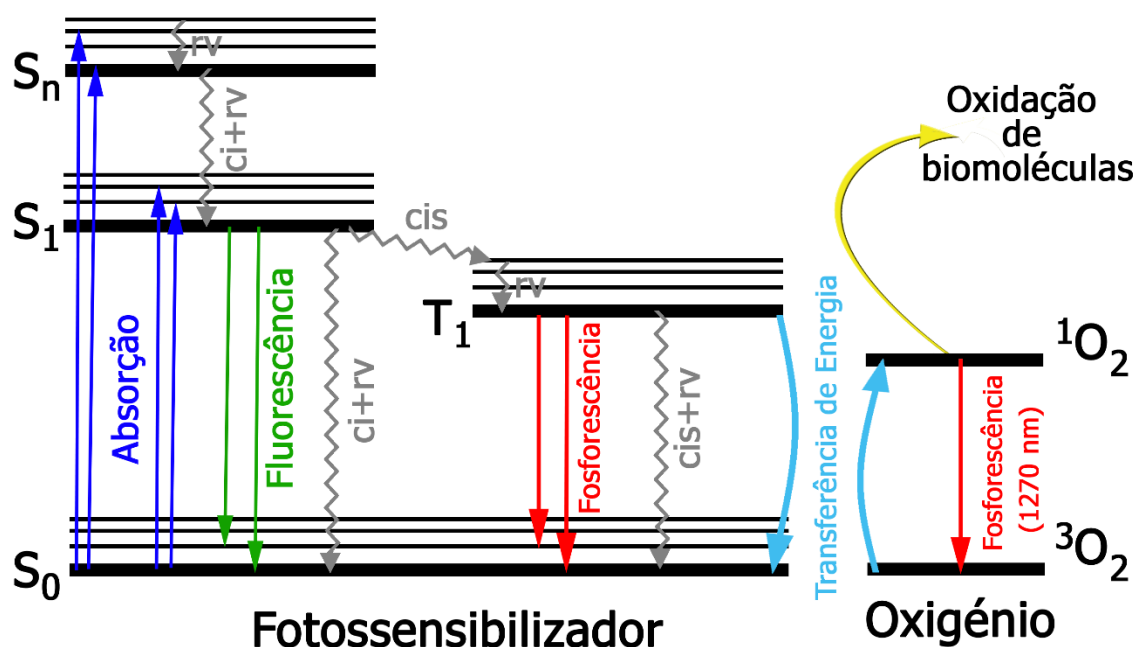


Figura 3.1 – Diagrama de Jablonski onde se encontram representados os principais fenómenos radiativos e não-radiativos de um fotossensibilizador: absorção, fluorescência, relaxação vibracional (rv), conversão interna (ci), cruzamento intersistemas (cis), fosforescência e transferência de energia para o oxigênio molecular (estado tripleto).

Os processos fotofísicos consistem em alterações nos estados eletrônicos da molécula mediante a transferência de energia por absorção de luz, o que pode afetar a sua reatividade química. Tipicamente, as moléculas orgânicas encontram-se num estado singuleto, que corresponde ao seu estado fundamental S_0 . A incidência de luz permite a excitação de um elétron para um estado vibracional excitado do primeiro estado singuleto (S_1) ou mesmo para estados excitados singuleto de maior ordem (S_n). Através de colisões com moléculas de solvente, ocorre uma relaxação vibracional, levando geralmente a um estado eletrônico correspondente ao primeiro nível vibracional de S_1 , que apresenta um tempo de vida na ordem dos nanossegundos. A partir deste nível, a molécula pode seguir por várias vias: fluorescência, cruzamento intersistemas ou conversão interna. De todos estes processos, a fluorescência é o único processo radiativo que ocorre quando moléculas no estado S_1 perdem a energia sob a forma de emissão de um fóton, retornando diretamente ao estado fundamental. A conversão interna corresponde à transferência de energia para o meio sob a forma de colisões. Por outro lado, o cruzamento intersistemas implica a alteração do spin do elétron, o que se traduz na passagem do estado S_1 para o estado tripleto T_1 . Este estado pode decair radiativamente mediante emissão de fosforescência ou reagir com o oxigênio do meio, ocorrendo uma transferência de energia que leva à passagem do oxigênio do estado fundamental (tripleto) para o estado excitado singuleto.² Esta espécie reativa de oxigênio, quando formada em meios biológicos, tem uma grande capacidade oxidativa, permitindo reações irreversíveis com biomoléculas que posteriormente levam à morte celular.³

Antes da análise dos resultados obtidos ao nível da espectroscopia de UV-Vis, será feita uma breve abordagem da teoria subjacente às transições típicas que se observam num espectro de UV-Vis de uma metalofalocianina.

Dada a complexidade das propriedades eletrônicas de macrociclos como as porfirinas e ftalocianinas, não existe ainda um modelo teórico capaz de as descrever na sua totalidade.⁴ Apesar disso, várias tentativas baseadas no trabalho de Gouterman⁵ têm sido feitas no sentido da atribuição das bandas observadas nos espectros de absorção de UV-Vis às respetivas transições eletrônicas. No caso das metalofalocianinas, o ligando constitui um sistema de 18 elétrons π . O diagrama das orbitais moleculares deste sistema proposto por Mack e Stillman⁶ encontra-se representado na Figura 3.2. A transição de menor energia ($e_g \leftarrow a_{1u}$) entre a HOMO e LUMO corresponde à banda Q localizada na maioria dos casos entre os 650 e 700 nm. A banda Q encontra-se tipicamente acompanhada por bandas satélite de maior energia, resultantes de transições para níveis vibracionais superiores da LUMO.^{2b} A explicação do aparecimento da banda Soret a 300-400 nm é mais difícil já que parece resultar da combinação de várias transições, das quais se destacam duas: B_1 ($e_g \leftarrow a_{2u}$) e B_2 ($e_g \leftarrow b_{1u}$).^{2a} Existem outras transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ ou de transferência de carga, cujo estudo não é relevante para a compreensão do comportamento dos espectros de UV-Vis dos compostos sintetizados neste trabalho.^{4,7}

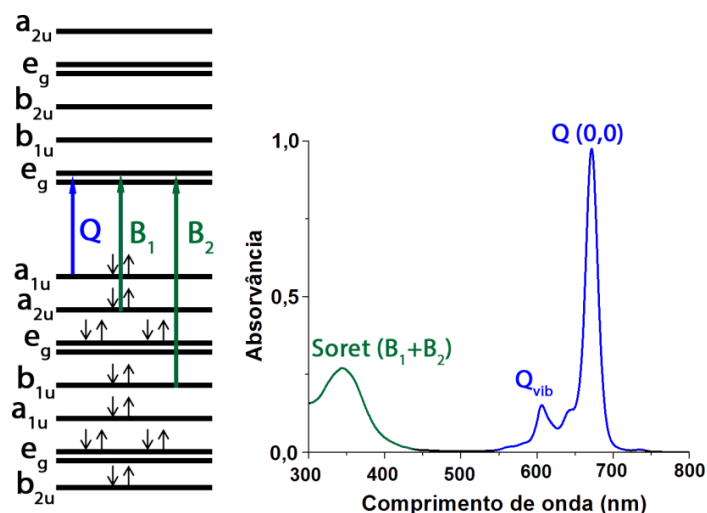


Figura 3.2 – Diagrama das orbitais moleculares π de complexos metálicos de ftalocianinas adaptado de Mack e Stillman,⁶ onde consta uma correspondência entre as transições possíveis e as bandas observadas num espectro de UV-Vis típico destes compostos.

A falta de solubilidade das ftalocianinas neutras na maioria dos solventes comuns condicionou, à partida, a escolha do solvente utilizado para as suas caracterizações fotofísicas e fotoquímicas, já que apenas poderiam ser utilizados DMSO e piridina. A piridina, por seu lado, não apresenta boa capacidade de dissolução das ftalocianinas catiónicas correspondentes. Por estas razões, foi escolhido o DMSO para todas as caracterizações, já que é o único capaz de dissolver todos os compostos, resultando espectros característicos de espécies não agregadas, o que é essencial para uma comparação entre todos os resultados obtidos. Este solvente é também o escolhido por muitos autores para a caracterização de ftalocianinas.⁸

3.1. Espectroscopia de UV-Vis

3.1.1 Análise dos espectros de UV-Vis

Os espectros de absorção de 2.1, 3.1 e 4.1 em DMSO estão representados na Figura 3.3.

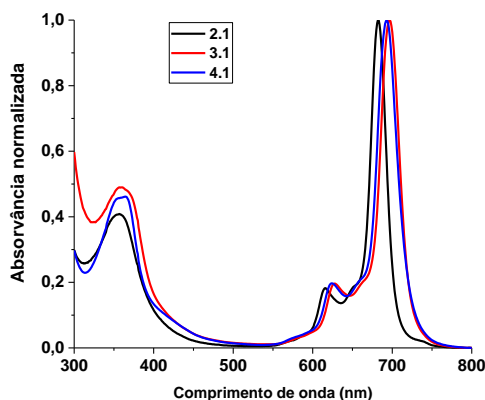


Figura 3.3 – Espectros de absorção de UV-Vis normalizados das três metaloftalocianinas neutras em DMSO.

Todos os espectros têm aspetos típicos de metaloftalocianinas. É possível identificar diferenças relativamente ao comprimento de onda de absorção máxima das metaloftalocianinas de Zn(II), InCl(III) e AlOH(III) (682 nm, 698 nm e 693 nm, respetivamente), que é uma consequência de diferentes interações das orbitais do ligando com os diferentes metais centrais. Comparando com os valores das respetivas metaloftalocianinas não substituídas (672 nm, 686 nm e 680 nm),⁹ observa-se em todas um desvio batocrómico na ordem dos 10-13 nm, o que indica que grupo imidazol tem um ligeiro efeito na diminuição do intervalo de energia entre a HOMO e LUMO. Este efeito é, no entanto, pouco significativo quando comparado com dados mesoméricos. A Tabela 3.1 compila alguns resultados recolhidos da literatura e mostra que a introdução deste grupo provoca um efeito marcadamente inferior ao da introdução de um grupo aromático (fenilo) ou de uma amina terciária. Tal fenómeno pode ser explicado pelo facto de os eletrões do azoto diretamente ligado, ao estarem envolvidos na aromaticidade do imidazol, estão pouco disponíveis para uma doação eletrónica eficaz ao macrociclo.

Tabela 3.1 – Exemplos de relação entre modelação de substituintes nas posições β de metaloftalocianinas e os valores de comprimento de onda correspondentes ao máximo de absorção.

Entrada	Metal	Substituinte (posição β)	Solvente	λ Máx (nm)
1	Zn(II)	H	DMSO	672
2	Zn(II)	Imidazol	DMSO	682
3	Zn(II)	H	1-cloronaftaleno	672 ⁷
4	Zn(II)	Ph	1-cloronaftaleno	698 ⁷
5	Cu(II)	H	DMF	668 ⁷
6	Cu(II)	(CH ₃) ₂ N	DMF	730 ⁷

Dado que a banda Soret é uma mistura de várias transições eletrónicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, o estudo da influência dos substituintes é mais complexo e tipicamente resulta em alterações menos significativas do que acontece na banda Q. Não obstante, neste caso em particular foi possível observar também desvios batocrómicos semelhantes aos da banda Q com a introdução do grupo imidazol. Os espectros da família das metaloftalocianinas de Zn(II) (**2.1**, **2.2**, **2.3** e **2.4**) em DMSO são apresentados na Figura 3.4a. A cationização resultou num desvio ipsocrómico de 4 nm, passando o máximo de absorção a se situar nos 677 nm. A existência de um azoto carregado positivamente provoca uma diminuição da disponibilidade da participação dos eletrões do azoto diretamente ligado ao macrociclo na doação eletrónica por efeito mesomérico. Observa-se que, como era expectável, o aumento do tamanho da cadeia alquílica, não se refletiu numa alteração do espectro de UV-Vis, pelo que apenas é representado um espectro representativo dos dois compostos tetracatiónicos. Esta conclusão é suportada também pelo facto de o espectro de **2.1** numa solução de TFA ~1mM em DMSO ser idêntico ao das metaloftalocianinas de Zn(II) tetracatiónicas (Figura 3.4b).

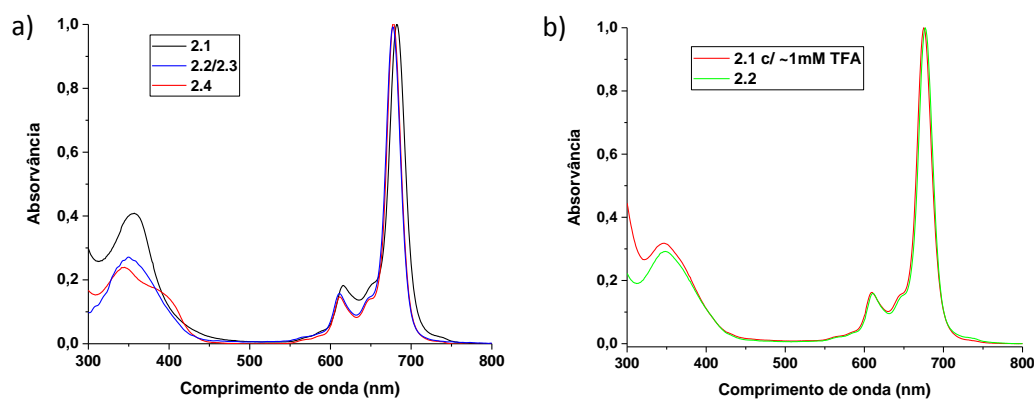


Figura 3.4 – Espectros de absorção no UV-Vis em DMSO: a) Família das metaloftalocianinas de Zn(II); b) Comparação de **2.1** em meio ácido (~1mM de TFA) com **2.2**.

A banda Soret, no caso de **2.2** e **2.3** sofre um desvio ipsocrómico à semelhança da banda Q dos 357 nm para os 350 nm. A **2.4**, apesar de manter o mesmo máximo de absorção, distingue-se das restantes ftalocianinas catiónicas pelo ligeiro desdobramento da banda Soret. Este fenómeno pode ser encontrado em vários espectros de UV-Vis na literatura em metaloftalocianinas de Zn(II) contendo substituintes aromáticos,^{8a, 8c} inclusive numa ftalocianina octacatiónica.¹⁰ Em nenhum dos casos foi apresentada uma justificação para este acontecimento e não foi possível identificar qualquer particularidade estrutural comum a todos estes compostos que permita formular uma explicação. De qualquer modo, pode inferir-se que a introdução deste grupo cationizante tem uma influência no sentido de aumentar a diferença de energia entre as orbitais a partir das quais originam as transições B₁ e B₂ (a_{2u} e b_{1u}, respetivamente). Assim, a transição B₁ parece ter sofrido um desvio batocrómico e a transição B₂ um desvio ipsocrómico. A Figura 3.5 permite a comparação dos espectros das metaloftalocianinas de In(III) e Al(III) neutras com a sua respetiva metaloftalocianina catiónica. Observam-se desvios batocrómicos na banda Q de igual magnitude aos observados na metaloftalocianina de Zn(II) após cationização.

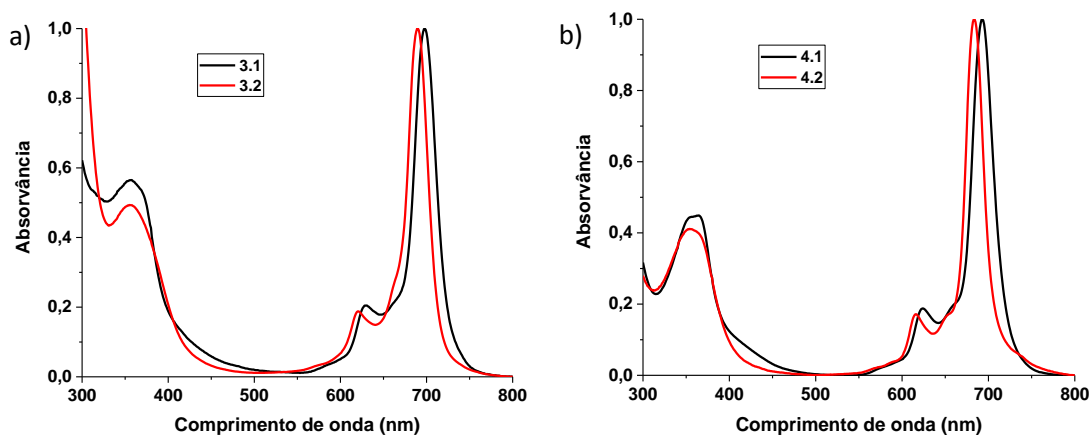


Figura 3.5 – Espectros de UV-Vis em DMSO de: a) Metaloftalocianinas de In(III); b) Metaloftalocianinas de Al(III).

Todas as metaloftalocianinas tetracatiônicas em MeOH (Figura 3.6a) apresentam espectros característicos de espécies desagregadas (monoméricas). A metaloftalocianina **2.4** não é apresentada por falta de solubilidade. Os espectros das metaloftalocianinas catiônicas solúveis em H₂O estão representados na Figura 3.6b.

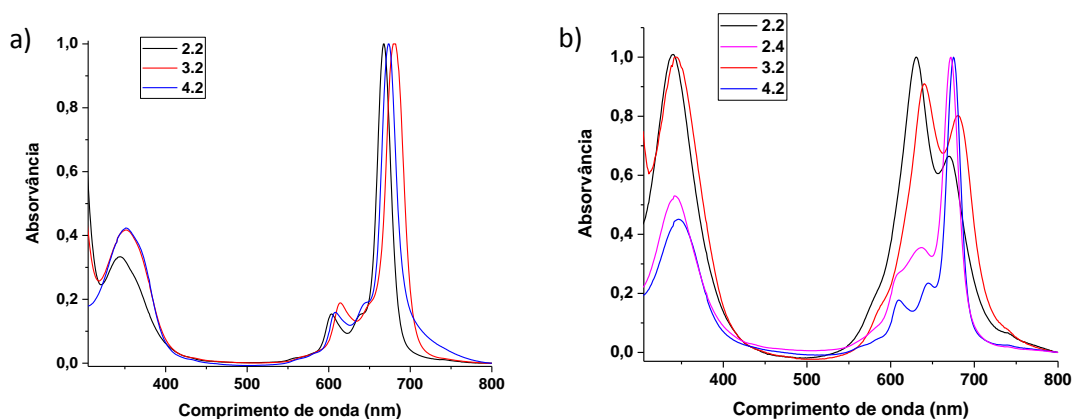


Figura 3.6 – Espectros de UV-Vis: a) Metaloftalocianinas tetracatiônicas em MeOH; b) Metaloftalocianinas catiônicas em H₂O.

O espectro de **2.2** em H₂O reflete o comportamento característico de metaloftalocianinas de Zn(II) tetra-catiônicas neste meio,^{8c, 11} apresentando um considerável grau de agregação, como se pode observar pelo aparecimento de uma nova banda situada nos 630-640nm. Dada a planaridade das ftalocianinas, particularmente aquelas que não apresentam ligandos axiais, existe uma elevada tendência para ocorrerem interações entre as suas orbitais π e conseqüente formação de novas espécies em solução cujas propriedades dependem do número de monómeros envolvidos e da sua orientação espacial relativa.¹² Para o caso em estudo, estamos perante agregados do tipo H, ou seja, ocorre a formação de um dímero em forma de *sandwich* (cofacial).¹³ No caso particular de **2.2**, a banda de menor energia (668 nm) corresponderá à espécie monomérica, enquanto que a banda de 632 nm à transição relativa à espécie agregada (dímero). A octacationização da metaloftalocianina de Zn(II) diminuiu significativamente a agregação em H₂O, passando a espécie monomérica a ser o cromóforo maioritário. Por outro lado, as bandas correspondentes à agregação-H das metaloftalocianinas tetracatiônicas de In(III) e, particularmente, de Al(III) diminuem comparativamente à banda Q do monómero. Este efeito pode ser explicado pela existência de um Cl e um OH coordenado axialmente, que dificultam as interações do tipo π - π *stacking* através de um efeito de impedimento estérico.^{7, 14}

3.1.2 Determinação dos coeficientes de absorção molar

Para a determinação dos coeficientes de absorção molar (ϵ), foi utilizada a Lei de Beer-Lambert. Esta lei estabelece uma relação logarítmica entre a absorvância (A) e a transmitância (T), sendo que esta última é calculada a partir da razão entre a intensidade da luz antes (I_0) e após (I) incidir na amostra. A absorvância, por sua vez, está relacionada linearmente com a concentração da amostra (c), o comprimento ótico (l) e a absorvidade molar (ϵ), que é constante para cada composto.¹⁵

$$A = -\log(T) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l \quad (3.1)$$

Existem alguns cuidados a ter na aplicação desta lei. Para garantir uma relação linear entre todos os pontos, as soluções foram preparadas de modo a ter picos com uma absorção entre 0,1 e 1,5. Este intervalo permite, por um lado, distinguir facilmente os picos da linha de base e por outro impedir que pequenas quantidades de luz cheguem ao detector, fruto de uma absorvância demasiado elevada.¹⁶ Dado que eram expectáveis valores de ϵ elevados, foram preparadas soluções pouco concentradas ($10^{-7} - 10^{-6}$ M), de modo a garantir linearidade no ajuste da reta. Para tal, foi necessário encontrar um compromisso entre as quantidades de composto a pesar e as diluições da solução-mãe, de forma a reduzir o erro associado a cada processo. Assim, foram preparadas 6 a 8 soluções diluídas a partir de duas soluções-mãe resultantes de pesagens independentes. A determinação do ϵ foi repetida sempre que os conjuntos de pontos provenientes de cada solução-mãe indicavam retas correspondentes a declives com uma diferença superior a 10%. A Figura 3.7 exemplifica esta metodologia mostrando os espectros obtidos pelas várias diluições no caso da metaloftalocianina **2.2** e o respetivo ajuste linear à relação entre a concentração e a absorvância no seu respetivo máximo de absorção (677 nm).

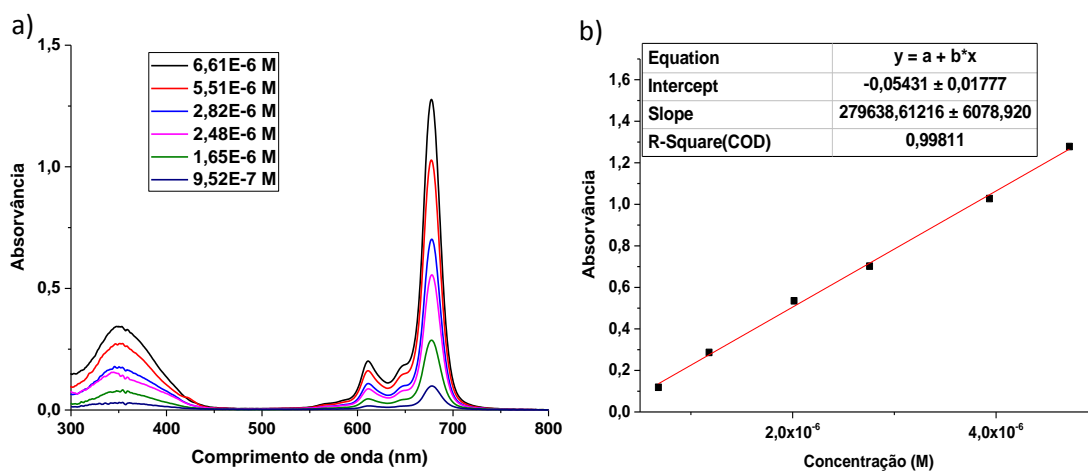


Figura 3.7 – Determinação do coeficiente de absorção molar de **2.2**: a) Espectro de UV-Vis de todas as soluções em DMSO b) Relação obtida entre concentração e absorvância a 677 nm e respetivo ajuste linear.

Os valores de ϵ obtidos para cada pico das metalofteralocianinas em estudo são indicados na Tabela 3.2. Em todos os compostos, foi possível obter uma relação linear entre a concentração e a absorvância quando foi utilizado DMSO como solvente.

Tabela 3.2 – Valores de ϵ em DMSO obtidos para cada metalofteralocianina.

Amostra	Banda Soret/ $M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda/\text{nm})$	Banda $Q_{\text{vib}}/M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda/\text{nm})$	Banda $Q(0,0)/M^{-1} \text{ cm}^{-1} (\lambda/\text{nm})$
2.1	$2,5 \times 10^4$ (358)	$1,3 \times 10^4$ (616)	$7,1 \times 10^4$ (682)
2.2	$7,4 \times 10^4$ (354)	$4,4 \times 10^4$ (611)	$2,8 \times 10^5$ (677)
2.3	$6,2 \times 10^4$ (354)	$3,7 \times 10^4$ (611)	$2,4 \times 10^5$ (677)
2.4	$5,5 \times 10^4$ (343)	$3,6 \times 10^4$ (612)	$2,6 \times 10^5$ (677)
3.1	$7,6 \times 10^4$ (358)	$3,0 \times 10^5$ (628)	$1,7 \times 10^5$ (698)
3.2	$8,5 \times 10^4$ (364)	$3,5 \times 10^4$ (624)	$1,9 \times 10^5$ (690)
4.1	$7,0 \times 10^4$ (364)	$3,5 \times 10^4$ (624)	$1,8 \times 10^5$ (693)
4.2	$7,0 \times 10^4$ (357)	$3,0 \times 10^4$ (616)	$1,7 \times 10^5$ (680)

Todos os compostos com exceção de **2.1** apresentam um valor de ϵ na ordem dos $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a banda Q, o que se encontra em concordância com os valores obtidos por outros autores para ftalocianinas catiónicas e neutras.^{11a, 17} Os valores baixos obtidos para **2.1** deverão estar relacionados com a agregação desta metalofteralocianina em DMSO, como foi referido no capítulo anterior. É possível concluir que os complexos de Zn(II) catiónicos demonstraram melhores valores ao nível do coeficiente de absorção molar quando comparados com as metalofteralocianinas com In(III) e Al(III).

3.2 Espectroscopia de fluorescência

Tal como foi referido previamente, o fotossensibilizador, após ser excitado para um nível energético superior, poderá retornar ao estado fundamental através de emissão de fluorescência, entre outros. Num fluorímetro irá ocorrer a excitação de uma amostra com luz monocromática, seguida da deteção da radiação emitida pela molécula. Desta forma, é possível obter dois tipos de espectros. Nos espectros de emissão, é estabelecido um comprimento de onda de excitação e a emissão de fluorescência é recolhida uma unidade de comprimento de onda de cada vez. Nos espectros de excitação, o comprimento de onda de emissão é fixado e é variado o comprimento de onda de excitação. Os espectros de excitação são particularmente relevantes para o controlo de outras impurezas fluorescentes. Assim, se apenas existir um fluoróforo em solução, o espectro de excitação terá uma forma semelhante ao seu espectro de absorção no UV-Visível.¹⁸

3.2.1 Espectros de excitação de fluorescência

No geral, os espectros de excitação de fluorescência das metaftalocianinas demonstraram uma boa correlação com o respectivo espectro de UV-Vis (Figura 3.8a). A única exceção observada diz respeito a **3.2**. O primeiro lote sintetizado deste composto apresentava um espectro de UV-Vis semelhante ao de um complexo metálico de ftalocianina, embora se tenha verificado que o ombro característico da banda Q não se encontrava bem definido (Figura 3.8b).

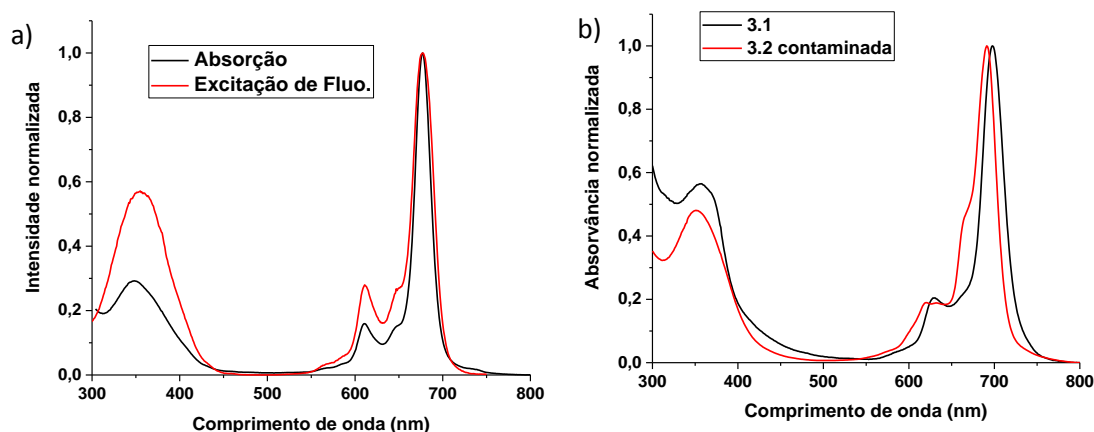


Figura 3.8 – a) Sobreposição dos espectros de UV-Vis e de excitação de fluorescência para **2.2** em DMSO; b) Comparação dos espectros de UV-Vis normalizados de **3.1** e **3.2** contaminada com a respectiva ftalocianina de base livre em DMSO.

Uma pesquisa bibliográfica revelou um espectro de uma metaloftalocianina de In(III) catiónica com as mesmas características,¹⁹ tendo os autores atribuído esta diferença a uma questão de agregação. Dado que a ftalocianina precursora, **3.1** apresentava em DMSO um espectro característico de uma ftalocianina não agregada, não seria expectável que a introdução de cargas positivas no macrociclo aumentasse as interações do tipo π - π *stacking*, devendo ter o efeito precisamente oposto.

Os estudos de fluorescência demonstraram um $\Phi_F = 0,01$ para a **3.1**, algo que é coincidente com os valores obtidos por outros autores em para este tipo de complexos de índio em DMSO.²⁰ No entanto, o primeiro lote de **3.2** apresentava um $\Phi_F = 0,10$, sendo apenas possível identificar um valor semelhante na publicação supracitada.¹⁹ De modo a averiguar se ambas metaloftalocianinas de índio possuíam contaminação com outro fluoróforo, foram feitos os respetivos espectros de excitação (Figura 3.9). Da análise desta figura, é possível observar que **3.1** apresentava correspondência entre os espectros de absorção e excitação, no entanto **3.2** apresentava um espectro de excitação típico de uma ftalocianina de base livre, o que se caracteriza pelo desdobraimento da banda Q.

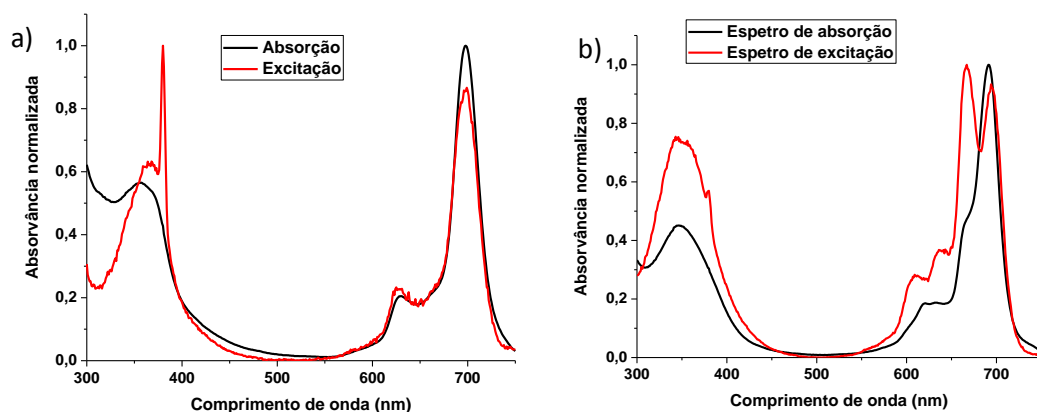
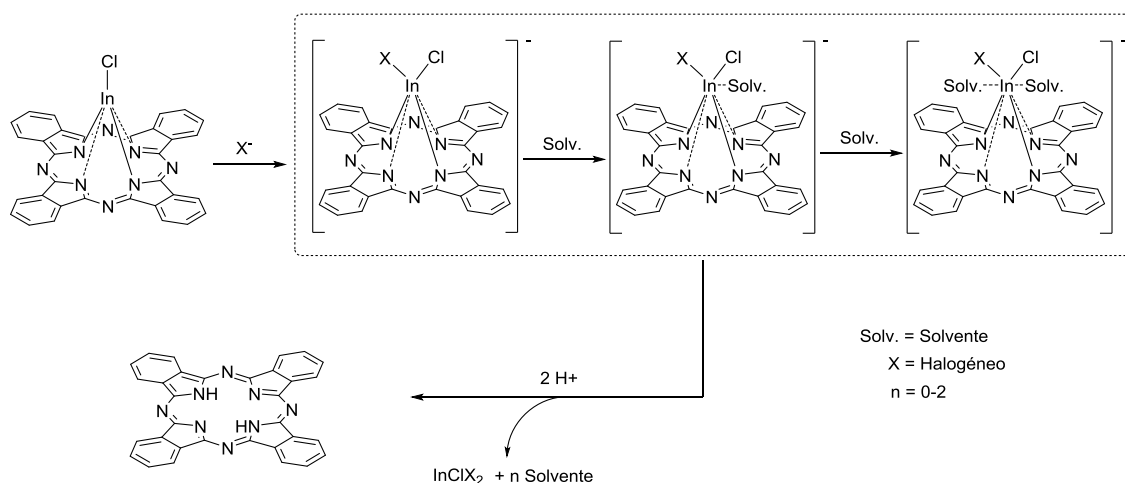


Figura 3.9 – Sobreposição dos espectros de excitação e de absorção de soluções em DMSO de: a) **3.1**; b) **3.2** impura.

Estas observações permitiram retirar as seguintes conclusões: i) a síntese da metaloftalocianina de In(III) a partir da ciclotetramerização do ftalonitrilo não levou à formação concomitante de ftalocianina de base livre e ii) a reação de cationização provocou uma desmetalção parcial do composto. O facto de o espectro de UV-Vis se assemelhar ao de uma metaloftalocianina indica que a contaminação era minoritária, no entanto, dado que o Φ_F de ftalocianinas de base livre é tipicamente maior quando comparado com a maioria dos respetivos complexos metálicos²¹ e, em particular os de índio,²² pequenas contaminações serão suficientes para alterar os rendimentos quânticos obtidos.

Na tentativa de investigar a causa desta contaminação, foi identificado um método reportado por Ivanova e Stuzhin²³ para a desmetalção de metaloftalocianinas de In(III) que envolvia a adição de um halogeneto e ácido trifluoroacético (TFA) (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 – Mecanismo de desmetalção de uma metaloftalocianina de In(III) na presença de um halogeneto e ácido. Adaptado de Ivanova e Stuzhin.²³

O elevado raio iónico do In(III) faz com que seja possível a coordenação *vis* de ligandos adicionais, nomeadamente halogenetos (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻). O complexo hexacoordenado formado pode ser solvatado por uma ou duas moléculas de TFA (no caso estudado no artigo) ou, no nosso caso,

possivelmente por DMF, embora não tenham sido feitos estudos para averiguar esta hipótese. O aumento do número de coordenação do In(III) provoca o seu afastamento do plano do macrociclo, o que leva ao alongamento e, conseqüentemente, ao enfraquecimento e rotura das interações In-N. O meio ácido provoca a protonação dos azotos do macrociclo, levando à formação da ftalocianina de base livre. Os autores referem que este fenómeno apenas é observado em metaloftalocianinas de In(III) e não, por exemplo, em metaloftalocianinas de Al(III). Devido ao reduzido raio iónico deste metal, a presença de halogenetos no meio levaria a que tivessem uma coordenação *trans*, o que aumentaria a estabilidade do complexo relativamente à desmetalção.

Verificámos que a adição de iodeto de potássio e de TFA nas condições descritas no artigo permitiu uma desmetalção total da ftalocianina catiónica. Posteriormente, foi feito um branco da reação de cationização, ou seja, foi dissolvido iodeto de etilo em DMF e a mistura reacional aquecida a 80°C durante 4 horas. O pH da solução no início encontrava-se a 8,0 tendo diminuído para cerca de 1,0 após o término da reação. A repetição da reação utilizando solvente e reagente secos não surtiu qualquer diferença. Estas observações indicam a ocorrência de uma degradação do reagente, levando à libertação de HI, que terá um efeito sinérgico na medida em que proporciona os dois requisitos para ocorrer a desmetalção: meio ácido e presença de um halogeneto.

Foi feita uma tentativa de remetalção da ftalocianina de base livre presente na mistura. Para isso, a mistura foi dissolvida em DMF com um excesso de 10 eq. de InCl₃ a uma temperatura de 80°C durante 8h. A reação foi acompanhada por UV-Vis, tendo-se verificado o reaparecimento do ombro da banda Q (Figura 3.10a). A repetição dos estudos de fluorescência permitiu obter, por um lado, um espectro de excitação coincidente com o espectro de absorção (Figura 3.10b) e, por outro, uma diminuição do Φ_F para 0,02, próximo do valor obtido para **3.1**.

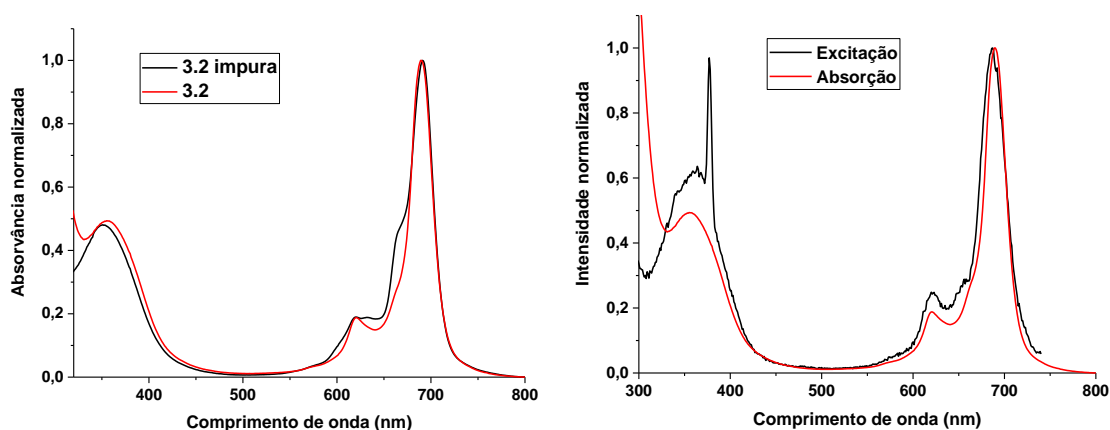


Figura 3.10 – a) Comparação entre os espectros em DMSO de **3.2** antes e após a reação de metalção; b) Sobreposição dos espectros de absorção e excitação de **3.2** em DMSO após a reação de metalção.

Ficou deste modo confirmado que o “ombro” observado no espectro de UV-Vis não se devia a fenómenos de agregação como referido na literatura, mas sim à presença de uma pequena contaminação com ftalocianina de base livre resultantes da desmetalção no meio ácido resultante

do HI formado aquando da reação de cationização. É necessário salientar que os resultados de espectroscopia de UV-Vis já apresentados e discutidos, incluindo o cálculo dos valores de ϵ , já estão corrigidos de modo a dizerem respeito ao composto puro.

3.2.2 Espectros de emissão de fluorescência e determinação dos respetivos rendimentos quânticos

Para a determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência, é tipicamente utilizado um método de comparação, que compreende a utilização de uma referência com um rendimento quântico previamente calculado e validado. Sendo assim, o rendimento quântico de fluorescência de uma amostra pode ser obtido a partir da seguinte expressão:

$$\Phi_F = \Phi_F^{\text{Ref}} \frac{F A_{\text{Ref}} \eta^2}{F_{\text{Ref}} A \eta_{\text{Ref}}^2} \quad (3.2)$$

Em que F e F_{Ref} correspondem ao integral da emissão de fluorescência da amostra e da referência respetivamente; A e A_{Ref} à absorção no comprimento de onda utilizado na excitação da amostra e referência, respetivamente; η e η_{Ref} correspondem ao índice de refração do solvente da amostra e referência, respetivamente.^{2b} De modo a evitar a formação de espécies agregadas, foram usadas soluções de amostra e referência com $A \sim 0,05$, tendo em cada caso sido escolhido o comprimento de excitação que conferia maior proximidade de absorvâncias entre cada amostra e a referência. A excitação foi efetuada próxima da banda Q_{vib} , ou seja, numa gama de comprimento de onda compreendida entre 605 e 620 nm. Como seria expectável um desvio de Stokes baixo, a excitação na banda $Q(0,0)$ iria provocar contaminação do sinal de fluorescência com luz de excitação.

Foi utilizado como referência a metalofalocianina de Zn(II) não substituída (ZnPc_{ref}), já que apresenta picos de absorção próximos dos das ftalocianinas em teste, além de ser amplamente utilizada por outros autores ($\Phi_F^{\text{Ref}}(\text{DMSO}) = 0,18$).²⁴ É sabido que as ftalocianinas não substituídas têm uma elevada tendência em agregar na maioria dos solventes, para além de possuírem baixas solubilidades.²⁵ Assim, antes da utilização da ZnPc_{ref} como referência, procedeu-se à sua validação mediante um estudo de absorção e fluorescência (Figura 3.11), com o objetivo de averiguar se existe uma dependência linear entre a intensidade de sinal e a concentração dentro da gama de concentrações que serão utilizadas. Os resultados obtidos indicam que a referência apresenta uma resposta linear relativamente à sua absorção no UV-Vis, no entanto o mesmo não acontece com a sua emissão de fluorescência, cujos resultados apresentam um comportamento exponencial. Os espectros de emissão de fluorescência apresentam um desvio batocrómico sucessivo do pico máximo com o aumento da concentração. Dado que estas ftalocianinas apresentam desvios de Stokes pequenos, estão sujeitas a um efeito de filtro interno na medida em que ocorre absorção de parte da fluorescência emitida.

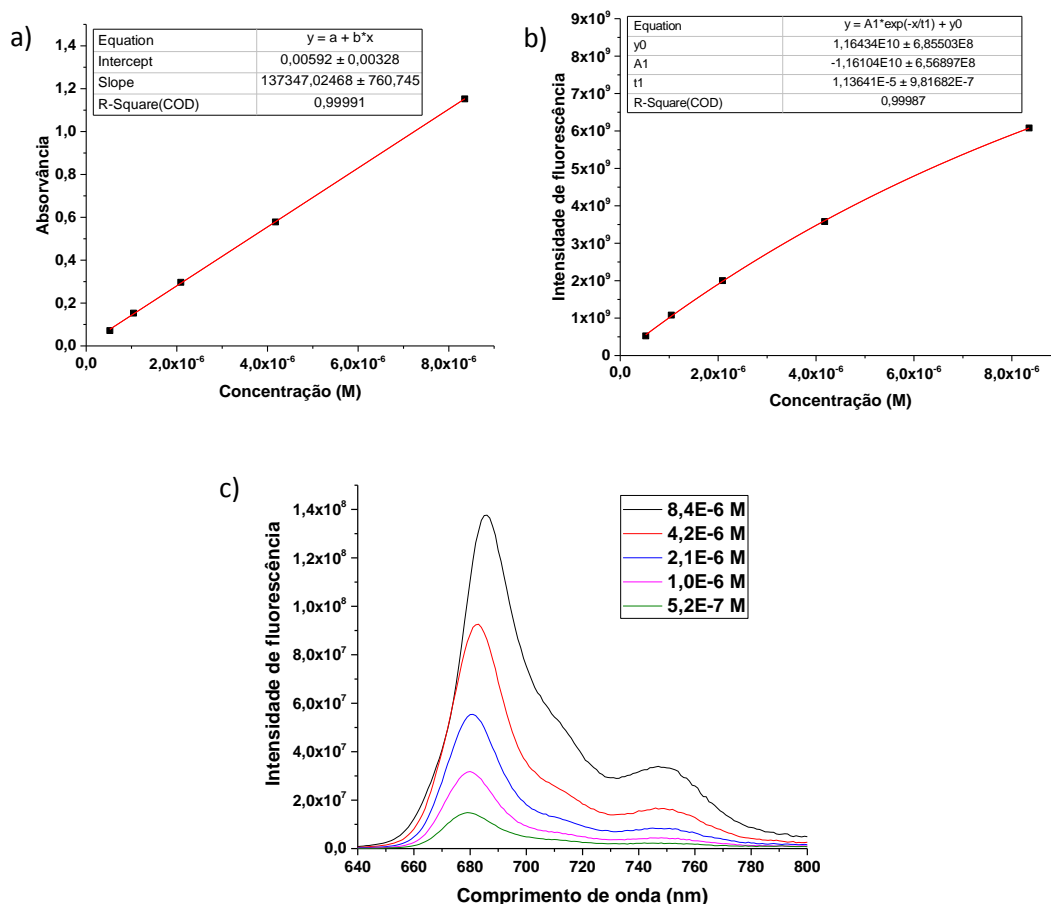


Figura 3.11 – Estudo da relação entre absorção/fluorescência de soluções de ZnPc_{ref} em DMSO e a sua respetiva concentração: a) Dados obtidos por espectroscopia de UV-Vis e respetivo ajuste linear aos pontos experimentais; b) Dados obtidos por espectroscopia de fluorescência e respetivo ajuste exponencial (1ª ordem) aos pontos experimentais; c) Espectros de emissão de fluorescência mostrando um desvio batocrômico do pico máximo com o aumento da concentração.

No entanto, mantivemos a escolha desta referência dado que as concentrações que seriam utilizadas ($\sim 2,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-6}$) corresponderiam a uma zona com um erro associado de apenas 5%. Estes dados demonstram, no entanto, que esta referência não é ideal para o estudo de fenómenos de fluorescência devendo idealmente ser utilizado um padrão primário que esteja menos sujeito a fenómenos de *self-quenching*.

A Figura 3.12a apresenta um exemplo da sobreposição do espectro de absorção de UV-Vis e de emissão de fluorescência para o caso de 2.2. O espectro de emissão corresponde a uma imagem do espelho do espectro de absorção, algo que é característico deste tipo de macrociclos.^{8b} São observados desvios de Stokes na ordem dos 9-15 nm, o que é típico de metaloftalocianinas com substituintes nas posições β .²⁶ Isto indica que ocorre um rearranjo pouco significativo das coordenadas atômicas após excitação, sendo esta uma consequência da rigidez do ligando macrocíclico.²⁶ A Figura 3.12b demonstra o efeito do metal no espectro de emissão, comparando as

três metalofalocianinas neutras. Verificaram-se desvios dos picos de magnitude comparável aos observados nos espectros de absorção, que é uma consequência de desvios de Stokes semelhantes.

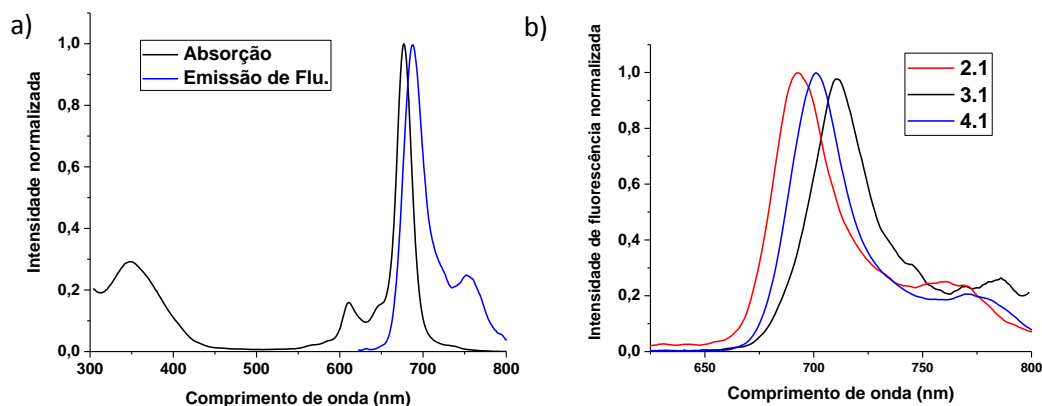


Figura 3.12 – a) Sobreposição dos espectros de absorção, excitação e emissão de uma solução de **2.2** em DMSO; b) Espectros de emissão de fluorescência em DMSO das três ftalocianinas neutras: **2.1**, **3.1** e **4.1**.

Os rendimentos quânticos de fluorescência obtidos (Tabela 3.3) refletem a influência do metal, particularmente no que diz respeito à sua capacidade de diminuir a fluorescência por aumento do cruzamento intersistemas. Assim, é expectável que os complexos com In(III), o metal de maior peso molecular, facilmente passem do estado S_1 a T_1 , diminuindo a fluorescência. Por outro lado, o Al(III), o metal de peso molecular inferior, tem um rendimento quântico de cruzamento intersistemas inferior, o que se traduz num aumento da sua fluorescência.²⁷

Tabela 3.3 – Dados de fluorescência obtidos para cada uma das metalofalocianinas em DMSO.

Amostra	$\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (nm)	Desvio de Stokes (nm)	Φ_F^a
2.1	691	9	0,14
2.2	687	10	0,17
2.3	687	10	0,19
2.4	687	10	0,09
3.1	713	15	0,01
3.2	705	15	0,02
4.1	702	9	0,30
4.2	691	11	0,23

^a – Ref. Φ_F (ZnPc_{ref}) = 0,18 (DMSO)²⁴

3.3 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singuleto

Como já foi discutido, o rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto é uma forma de avaliar a capacidade de os fotossensibilizadores produzirem espécies reativas de oxigênio mediante a exposição a uma fonte de luz. A magnitude deste valor é influenciada por vários fatores, nomeadamente a energia e tempo de vida do estado tripleto, a eficiência da transferência de energia entre o fotossensibilizador e o oxigênio e a capacidade de os substituintes e o solvente desativarem o oxigênio singuleto.^{8a} Existem vários métodos descritos para a determinação deste parâmetro, desde calorimetria fotoacústica,²⁸ fotoquímica²⁹ ou luminescência no IV-próximo.³⁰ Optou-se pela utilização desta última técnica, visto que permite uma medição direta da cinética do decaimento do oxigênio singuleto produzido através a sua emissão de fosforescência a 1270 nm. Apesar de muitos autores utilizarem a $ZnPc_{ref}$ (Φ_{Δ} (DMSO) = 0,67),³¹ os nossos estudos anteriores de fluorescência demonstram que esta molécula poderá ter uma resposta não-linear com o aumento da concentração. Sendo assim, optámos pela utilização de fenalenona como referência. Esta molécula é amplamente utilizada por ser solúvel na maioria dos solventes, possuir rendimentos quânticos próximos de 1 e ser um fraco *quencher* de oxigênio singuleto. Não foi possível encontrar um valor na literatura para o rendimento quântico da referência em DMSO, pelo que foi considerado o valor do solvente com polaridade mais próxima ($\Phi_{\Delta fenalenona}$ (acetonitrilo) = 0,98).³² As medições foram apenas feitas em DMSO para todos os compostos, dada a sua tendência para agregação em H₂O, como foi evidenciado previamente. Além disso, as medições da fosforescência do oxigênio singuleto em água são difíceis, dado que este apresenta um baixo tempo de vida neste solvente.³³

Foram preparadas soluções em DMSO de cada amostra e da referência (fenalenona) com absorvância de 0,25 a 355 nm, o que permite obter um equilíbrio entre um sinal suficientemente intenso e evitar ao mesmo tempo fenómenos de agregação e *self-quenching* provocados por um aumento excessivo da concentração. Através desta técnica ir-se-ão obter decaimentos da fosforescência do oxigênio singuleto ao longo do tempo, podendo ser ajustados a uma exponencial decrescente de primeiro grau. Para cada solução de amostra, foram obtidos 15 a 20 decaimentos a diferentes intensidades de laser de excitação. A Figura 3.13 mostra a comparação de um decaimento da intensidade da emissão do oxigênio singuleto produzido por **2.2** e a referência a iguais intensidades de laser.

Após o ajuste exponencial para cada decaimento obtido, foram retirados os fatores pré-exponenciais e representados em função da intensidade do laser. A Figura 3.14 exemplifica com as retas obtidas para **2.2** e fenalenona.

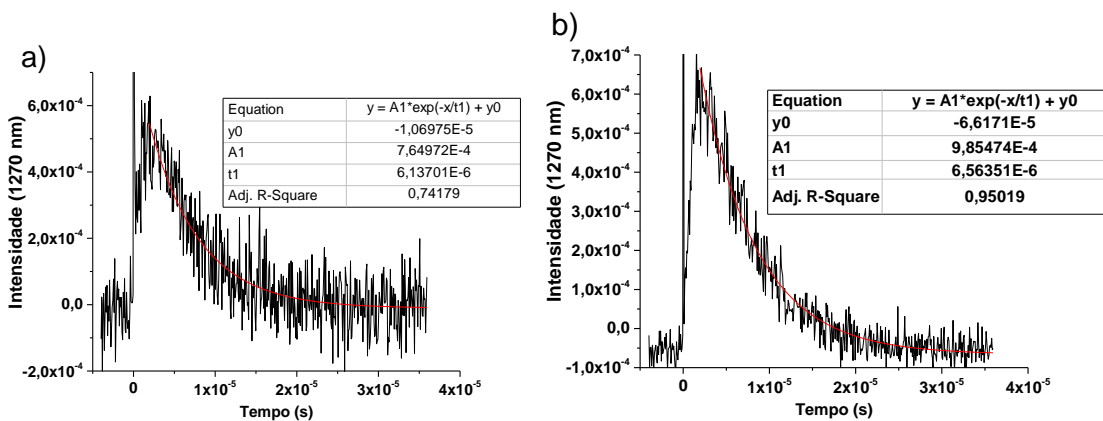
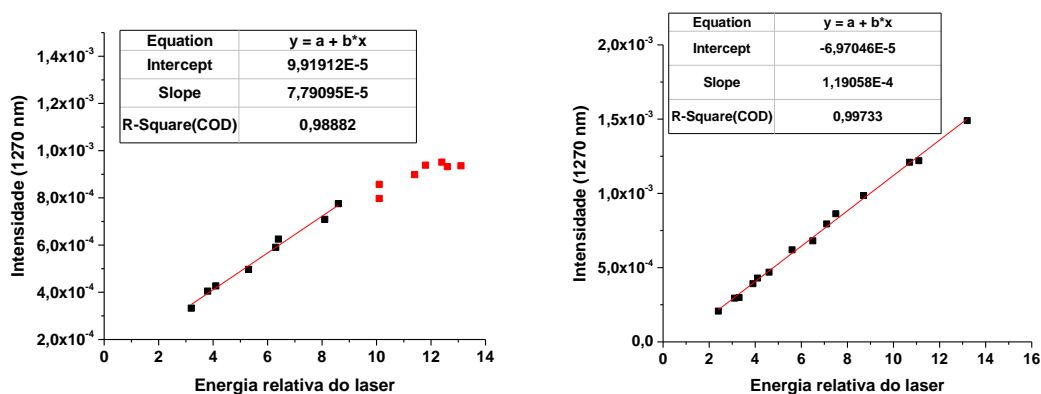


Figura 3.13 – Intensidade da fosforescência do oxigênio singuleto ao longo do tempo medida a 1270 nm utilizando iguais intensidades de laser: a) 2.2 (DMSO); b) Fenalenona (DMSO).



Figuraa 3.14 – Relação entre a intensidade da fosforescência do oxigênio singuleto medida a 1270 nm e a energia relativa do laser de excitação: a) 2.2 (DMSO); b) Fenalenona (DMSO). A vermelho os pontos considerados *outliers*.

A elaboração deste tipo de gráfico garante que a amostra é comparada com a referência numa zona de relação linear e, ao serem obtidos vários pontos, aumenta a exatidão da comparação, já que a fraca intensidade da fosforescência do oxigênio singuleto faz com que haja ruído associado a estas medições. Este aspeto torna-se particularmente relevante para soluções em DMSO, já que é um solvente cujo tempo de vida do oxigênio singuleto é inferior à maioria dos outros solventes orgânicos ($\tau_{\Delta} = 24.6 \pm 5.4 \mu\text{s}$).^{33b} Os declives das retas obtidos para a amostra (S) e para a referência (S_{Ref}) podem ser relacionados com o rendimento quântico de oxigênio singuleto da amostra (Φ_{Δ}) através da expressão:³⁴

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{Ref}} \frac{S}{1-10^{-A}} * \frac{1-10^{-A_{\text{Ref}}}}{S_{\text{Ref}}} \quad (3.3)$$

Em que $\Phi_{\Delta}^{\text{Ref}}$ corresponde ao rendimento quântico de formação de oxigênio singuleto da referência e A e A_{Ref} correspondem à absorvância da amostra e da referência ao comprimento de

onda de excitação, respetivamente. Os valores de Φ_{Δ} obtidos para cada ftalocianina encontram-se resumidos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores de rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto obtidos em DMSO.

Amostra	Φ_{Δ}^a
2.1	0,56
2.2	0,66
2.3	0,72
2.4	0,67
3.1	0,57
3.2	0,52
4.1	0,33
4.2	0,32

^a – Ref. Φ_{Δ} (fenalenona) = 0,98 (acetonitrilo)³²

Os resultados obtidos permitem concluir que, nos compostos em estudo, as variações de Φ_{Δ} resultaram predominantemente da alteração do metal central. As metaloftalocianinas de Zn(II), com exceção de **2.1**, apresentam rendimentos quânticos semelhantes aos da ZnPc não substituída, o que parece indicar um efeito neutro da introdução de grupos imidazol catiónicos. O menor valor obtido para a **2.1** poderá dever-se a efeitos de agregação, dado que esta molécula apresenta dificuldades de solubilidade mesmo em DMSO, como foi discutido previamente. As metaloftalocianinas de In(III), **3.1** e **3.2**, apresentam rendimentos quânticos inferiores à globalidade das metaloftalocianinas de Zn(II), enquanto que as metaloftalocianinas de Al(III), **4.1** e **4.2**, apresentam os valores mais baixos deste conjunto de moléculas. Esta relação entre os diferentes complexos metálicos é, aliás, transversal às metaloftalocianinas não substituídas correspondentes: Φ_{Δ} ZnPc (DMSO) = 0,67; ³¹ Φ_{Δ} InPc (DMSO) = 0,61; ⁹ Φ_{Δ} AlPc (DMSO) = 0,24.⁹ A cationização não parece ter afetado significativamente os rendimentos quânticos dos complexos metálicos com In(III) e Al(III) já que apresentam diferenças iguais ou inferiores a 10% entre a metaloftalocianina neutra e a sua respetiva catiónica.

A utilização de complexos diamagnéticos em detrimento dos paramagnéticos permite a obtenção de estados tripleto com tempos de vida suficientemente grandes para ocorrer a reação com o oxigénio molecular, de onde resultará a formação de oxigénio singuleto. Os complexos paramagnéticos formados, por exemplo, com Cu(II) ou Ni(II), apresentam interação dos estados excitados com as orbitais d do metal, o que provoca a sua rápida desativação, levando a baixos rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto.^{22, 27}

Foram obtidos tempos de vida de oxigénio singuleto em DMSO na ordem dos 6,0 a 7,0 μ s, o que se encontra notoriamente abaixo dos reportados pela literatura acima referidos.^{33b} Existem, no entanto, autores que reportaram valores mais baixos e, por isso, mais coincidentes com os obtidos neste trabalho como por exemplo Gandra, R. *et al* (11 \pm 2 μ s).³⁵ Dado que o DMSO é um

solvente muito higroscópico, estas oscilações nos valores poderão dever-se a uma variabilidade na quantidade de H₂O presente, diminuindo o tempo de vida do oxigénio singuleto.

Sob o ponto de vista dos estudos fotofísicos e fotoquímicos efetuados, as metalofteralocianinas catiónicas de Zn(II) são as que apresentam maiores valores de absorção molar e de rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto, que são os dois parâmetros mais relevantes para a sua aplicação em PDI. É preciso notar, no entanto, que os outros complexos metálicos, tal como foi referido no capítulo 2, poderão sofrer modificações químicas posteriores ao nível do seu ligando axial para melhorar as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas ou biológicas.

3.4 Estudos biológicos

Todos os estudos biológicos que serão discutidos neste capítulo foram-nos fornecidos pelo Dr. Janusz M. Dabrowski, Barbara Pucelik e Robert Paczynski da Jagiellonian University de Cracóvia, Polónia. Apenas foi possível, até à escrita desta dissertação, efetuar estudos biológicos em 2.2 e 2.3, permitindo apenas estudar o efeito do aumento da cadeia cationizante. A Figura 3.15 mostra os dados de internalização celular obtidos para ambas as metalofteralocianinas nos vários microorganismos testados.

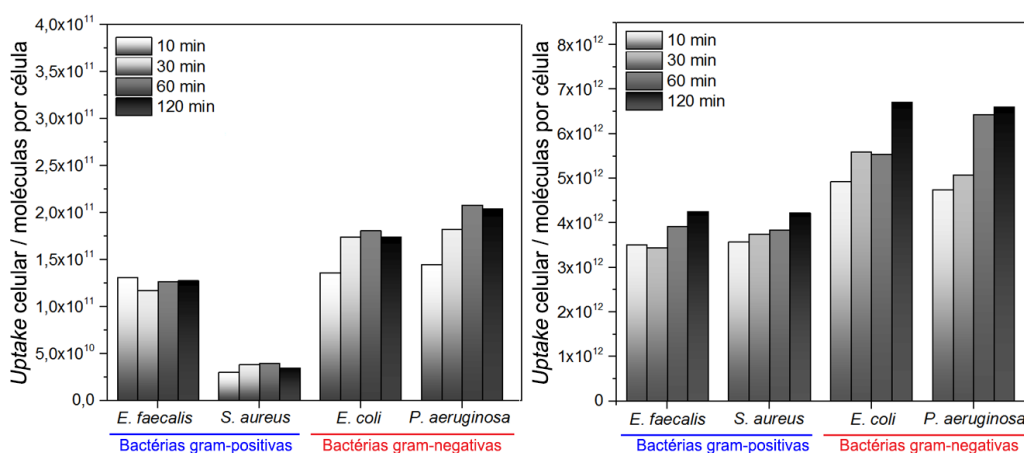


Figura 3.15 – Dados de internalização celular obtidos para diferentes microorganismos após 10, 30, 60 e 120 minutos de incubação no escuro; a) Metalofalocianina 2.2; b) Metalofalocianina 2.3.

É possível concluir que a internalização dos fotossensibilizadores é na generalidade maior para bactérias gram-negativas do que para gram-positivas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que indicam que fotossensibilizadores com maiores graus de cationização e, por isso, mais hidrofílicos, apresentam maior inativação de bactérias gram-negativas do que gram-positivas.³⁶ Por outro lado, compostos com padrões de cationização não simétricos e mais anfífilos apresentam melhores resultados para bactérias gram-positivas.³⁷

O aumento da cadeia cationizante traduziu-se num aumento significativo da internalização para todas as espécies estudadas. Este dado experimental está, aliás, de acordo com o que já foi reportado por outros autores³⁸ que avaliaram o mesmo efeito. O aumento da internalização parece dever-se ao aumento da interação das cadeias alquílicas com os constituintes da membrana, levando à sua ancoragem nos domínios lipídicos e a uma perturbação nas forças que estabilizam a membrana. Tal como foi discutido mediante a análise da Figura 1.7, as paredes das bactérias para além de apresentarem domínios carregados negativamente na interface com o meio extracelular, também possuem zonas lipofílicas próximas destas. No caso das bactérias gram-negativas, o Lípido A encontra-se próximo dos lipopolisacarídeos, que são responsáveis pelas cargas negativas da membrana. Deste modo, é possível que ocorra uma interação simultânea do fotossensibilizador com estes dois componentes, o que se traduzirá num maior valor de internalização.

A Figura 3.16 apresenta os dados relativamente à citotoxicidade no escuro de ambos os compostos para células tumorais (HeLa) e queratinócitos humanos (HaCaT).

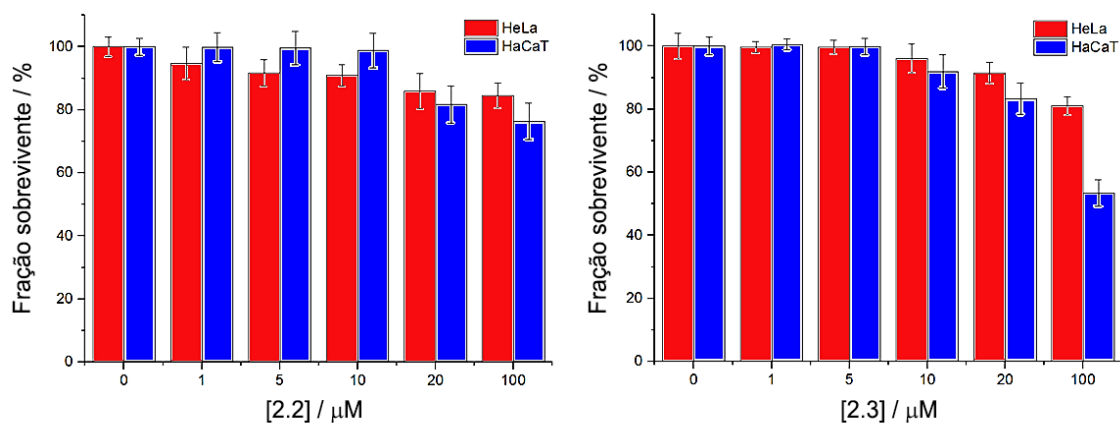


Figura 3.16 – Citotoxicidade no escuro para as linhas celulares HeLa e HaCaT para **2.2** e **2.3**.

Para as células HaCaT, foi possível obter taxas de viabilidade celular próximas de 100% para concentrações até 10 µM para **2.2** e até 5 µM para **2.3**. A maior diferença observada entre ambos os compostos diz respeito à sua citotoxicidade a 100 µM, o que permite concluir que **2.3** é mais citotóxico. Este resultado experimental está de acordo com o observado por Reddi, *et al.* para a citotoxicidade no escuro para culturas de bactérias.^{38a}

Os resultados obtidos para a fotoinativação de microorganismos encontram-se na Figura 3.17.

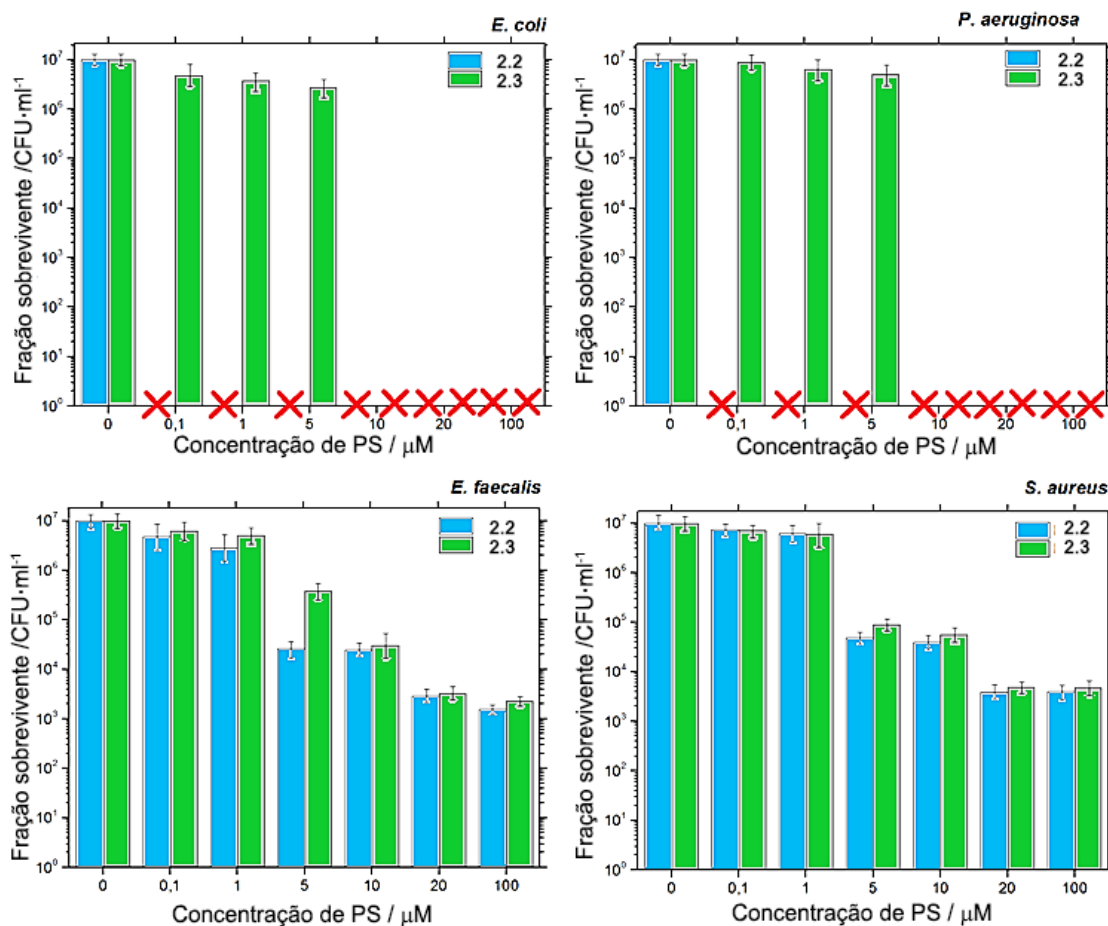


Figura 3.17 – Dados de fotoinativação obtidos a várias concentrações de **2.2** e **2.3** em várias culturas de bactérias (*E. coli*; *P. aeruginosa*; *E. faecalis*; *S. aureus*).

É possível observar total inativação das duas espécies de bactérias gram-negativas testadas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) para **2.2** a concentrações a partir de 0,1 μM e para **2.3** a partir de 10 μM. Contrariamente ao verificado por Thomas, *et al.* (2015)^{38b} para porfirinas de zinco, o aumento da cadeia alquílica não levou a uma maior inativação. Embora pareça existir uma relação entre o aumento da cadeia alquílica e aumento de internalização, o mesmo não se pode afirmar relativamente ao aumento da atividade antimicrobiana. Embora Thomas, *et al.* (2015) e Reddi, *et al.* (2002)^{38a} tenham estabelecido tal relação para porfirinas, Kussovski, *et al.* (2009),³⁹ cujos estudos se basearam também em metaloftalocianinas de Zn(II), detetaram maior atividade para a ftalocianina com a menor cadeia (metilo). A fotoinativação das bactérias gram-positivas (*E. faecalis*; *S. aureus*) foi marcadamente inferior ao observado para as bactérias gram-negativas. Este dado está de acordo com as considerações efetuadas previamente, sendo porventura necessários derivados não simétricos para aumentar a fotoinativação destes microorganismos.

Ao serem identificadas as gamas de concentração para as quais ocorre uma inativação total das bactérias gram-negativas, é necessário estudar a fototoxicidade destes compostos para células humanas (Figura 3.18).

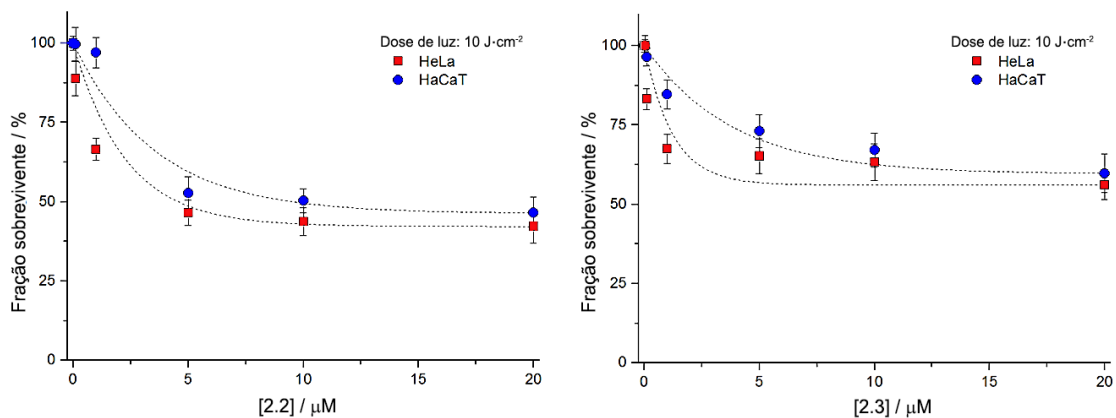


Figura 3.18 – Fototoxicidade para células HeLa e HaCaT efetuada a vários valores de concentração de **2.2** e **2.3**: 0,1 μM; 1 μM; 5 μM; 10 μM e 20 μM.

Para o caso particular de **2.2**, é possível identificar um baixo grau de fototoxicidade nas concentrações de 0,1 μM e 1 μM. Tendo em conta que concentrações de 0,1 μM permitiram uma fotoinativação total de ambas as espécies de bactérias gram-negativas testadas, podemos concluir que existe um certo grau de seletividade na interação do fotossensibilizador com as membranas das bactérias, o que permite estabelecer uma janela terapêutica de uma ordem de grandeza.

3.5 Referências

- [1] Atkins, P. W.; De Paula, J., *Physical chemistry*. 9th ed.; W. H. Freeman and Co.: New York, **2010**.
- [2] (a) FitzGerald, S. *A photophysical study of novel silicon and zinc phthalocyanines*. Ph.D., Durham University, **2002**; (b) Stanley, C. F. *Photophysical evaluation of substituted zinc phthalocyanines as sensitizers for photodynamic therapy*. Ph.D., Durham University, **1997**; (c) Ongarora, B. G. *Syntheses And Characterization Of Water-Soluble Phthalocyanines For Diagnosis And Treatment Of Cancer*. Ph.D., Louisiana State University, **2012**.
- [3] Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2004**, *1*, 279-293.
- [4] Mack, J.; Stillman, M. J., 103 - Electronic Structures of Metal Phthalocyanine and Porphyrin Complexes from Analysis of the UV–Visible Absorption and Magnetic Circular Dichroism Spectra and Molecular Orbital Calculations. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 43-116.
- [5] Gouterman, M., *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, *6*, 138-163.
- [6] Mack, J.; Stillman, M. J., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, *5*, 67-76.
- [7] Isago, H., *Optical Spectra of Phthalocyanines and Related Compounds*. Springer Japan: **2015**.
- [8] (a) Acar, İ.; Bıyıklıoğlu, Z.; Durmuş, M.; Kantekin, H., *Journal of Organometallic Chemistry*, **2012**, *708–709*, 65-74; (b) Colak, S.; Durmus, M.; Yıldız, S. Z., *Dalton transactions*, **2016**, *45*, 10402-10410; (c) Cakr, D.; Goksel, M.; Cakr, V.; Durmus, M.; Biyiklioglu, Z.; Kantekin, H., *Dalton transactions*, **2015**, *44*, 9646-9658.
- [9] Yanık, H.; Aydın, D.; Durmuş, M.; Ahsen, V., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2009**, *206*, 18-26.
- [10] Atsay, A.; Gül, A.; Burkut Koçak, M., *Dyes and Pigments*, **2014**, *100*, 177-183.
- [11] (a) Idowu, M.; Nyokong, T., *Polyhedron*, **2009**, *28*, 416-424; (b) Uslan, C.; Sesalan, B. Ş.; Durmuş, M., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2012**, *235*, 56-64.
- [12] Snow, A. W., 109 - Phthalocyanine Aggregation. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 129-176.
- [13] Bayda, M.; Dumoulin, F.; Hug, G. L.; Koput, J.; Gorniak, R.; Wojcik, A., *Dalton transactions*, **2017**, *46*, 1914-1926.
- [14] Chernonosov, A. A.; Ermilov, E. A.; Roder, B.; Solovyova, L. I.; Fedorova, O. S., *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2014**, *2014*, 7.
- [15] Atkins, P. W.; Hagerman, M. E.; Shriver, D. F., *Inorganic chemistry*. 5th ed.; Oxford Univ. Press.: Oxford, **2010**.
- [16] Harris, D. C., *Quantitative chemical analysis*. 8th ed.; W.H. Freeman: New York.; **2010**.

- [17] (a) Makarov, D. A.; Yuzhakova, O. A.; Slivka, L. K.; Kuznetsova, N. A.; Negrimovsky, V. M.; Kaliya, O. L.; Lukyanets, E. A., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2007**, *11*, 586-595; (b) Karaođlan, G. K.; Gümrukü, G.; Koca, A.; Gül, A.; Avciata, U., *Dyes and Pigments*, **2011**, *90*, 11-20.
- [18] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed.; Springer Science and Business Media: Singapore, **2006**.
- [19] Durmus, M.; Nyokong, T., *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2007**, *6*, 659-668.
- [20] (a) Chauke, V.; Durmuş, M.; Nyokong, T., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2007**, *192*, 179-187; (b) Osifeko, O. L.; Uddin, I.; Mashazi, P. N.; Nyokong, T., *New Journal of Chemistry*, **2016**, *40*, 2710-2721; (c) Durmuş, M.; Erdoğan, A.; Ogunsipe, A.; Nyokong, T., *Dyes and Pigments*, **2009**, *82*, 244-250.
- [21] Kobayashi, N.; Ogata, H.; Nonaka, N.; Luk'yanets, E. A., *Chemistry – A European Journal*, **2003**, *9*, 5123-5134.
- [22] Lobo, A. C. S.; Silva, A. D.; Tomé, V. A.; Pinto, S. M. A.; Silva, E. F. F.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, *59*, 4688-4696.
- [23] Ivanova, S. S.; Stuzhin, P. A., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2011**, *15*, 1299-1309.
- [24] Gurol, I.; Durmus, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T., *Dalton transactions*, **2007**, 3782-3791.
- [25] (a) Sharman, W. M.; Van Lier, J. E., 97 - Synthesis of Phthalocyanine Precursors. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 1-60; (b) McKeown, N. B., 98 - The Synthesis of Symmetrical Phthalocyanines. In *The Porphyrin Handbook*, Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Amsterdam, **2003**; pp 61-124.
- [26] Saka, E. T.; Göl, C.; Durmuş, M.; Kantekin, H.; Büyükođlu, Z., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2012**, *241*, 67-78.
- [27] Nyokong, T.; Ahsen, V., *Photosensitizers in medicine, environment, and security*. Springer Netherlands: Dordrecht, **2012**.
- [28] Pineiro, M.; Carvalho, A. L.; Pereira, M. M.; Gonsalves, A. M. d. A. R.; Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J., *Chemistry – A European Journal*, **1998**, *4*, 2299-2307.
- [29] Spiller, W.; Kliesch, H.; Wöhrle, D.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Schnurpfeil, G., *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **1998**, *2*, 145-158.
- [30] Stasheuski, A. S.; Galievsky, V. A.; Stupak, A. P.; Dzhagarov, B. M.; Choi, M. J.; Chung, B. H.; Jeong, J. Y., *Photochemistry and photobiology*, **2014**, *90*, 997-1003.
- [31] Mthethwa, T. P.; Tuncel, S.; Durmus, M.; Nyokong, T., *Dalton transactions*, **2013**, *42*, 4922-4930.
- [32] Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1994**, *79*, 11-17.

- [33] (a) W. Grabow. *Method for determination of singlet oxygen quantum yields for new fluorine-based photosensitizers in aqueous media for the advancement of photodynamic therapy*. M.Sc., University of Central Florida, Orlando, **2004**; (b) Nonell, S.; Flors, C., *Singlet oxygen: Applications in biosciences and nanosciences, Volume 1*. 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2016**.
- [34] Vinagreiro, C. S. *Síntese de Conjugados de Sulfonamidas e Macrociclos Tetrapirrólicos com Potencial Aplicação Dual em Químio- e Fototerapia*. Coimbra University, **2015**.
- [35] Gandra, N.; Frank, A. T.; Le Gendre, O.; Sawwan, N.; Aebisher, D.; Liebman, J. F.; Houk, K. N.; Greer, A.; Gao, R., *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10771-10776.
- [36] Hamblin, M. R.; Jori, G., *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2011**.
- [37] Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A., *BMC Microbiology*, **2009**, *9*, 70-70.
- [38] (a) Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J. C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U., *Photochemistry and photobiology*, **2002**, *75*, 462-470; (b) Thomas, M.; Craik, J. D.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., *Future Microbiology*, **2015**, *10*, 709-724.
- [39] Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Orozova, P.; Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Borisova, E.; Avramov, L., *FEMS Microbiology Letters*, **2009**, *294*, 133-140.

Capítulo 4

Conclusão

O trabalho subjacente a esta dissertação foi desenvolvido a propósito da crescente necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas, particularmente nos casos em que os antibióticos existentes já não apresentam a eficácia pretendida. O objetivo deste trabalho consistia em sintetizar novas ftalocianinas catiónicas contendo o grupo imidazol e efetuar um estudo de estrutura/propriedades e estrutura/atividade, de modo a perceber quais as características que potenciavam a sua atividade antimicrobiana, particularmente para bactérias gram-negativas, visto que constituem um grupo com maior resistência intrínseca à ação de fármacos. Nesse âmbito, foram idealizadas três variações estruturais com base em resultados promissores previamente reportados na literatura: tamanho da cadeia cationizante, grau de cationização e metal central.

Numa primeira fase, foram modelados dois precursores de ftalocianinas (ftalonitrilos) com o grupo imidazol ($\eta = 56\%$) e o grupo 2-metil-5-nitroimidazol ($\eta = 54\%$). A utilização de espectroscopia de RMN unidimensional e bidimensional permitiu confirmar a identidade dos compostos e, no caso deste último, uma elucidação estrutural quanto ao isómero posicional obtido. Partindo do ftalonitrilo substituído com o grupo imidazol, foi possível sintetizar três metaloftalocianinas com Zn(II), In(III) e Al(III) em bons rendimentos (71%, 67% e 60%, respectivamente). As metaloftalocianinas neutras obtidas para além de, à partida, não possuírem bons parâmetros de atividade antimicrobiana e seletividade, demonstravam um elevado grau de agregação, o que dificultaria inclusive os seus estudos biológicos. Deste modo, o passo seguinte para a obtenção de derivados com atividade biológica relevante consistiu na cationização destas metaloftalocianinas neutras. Tendo por base o tipo de modelação estrutural idealizada para efetuar os estudos de estrutura/atividade pretendidos, foram escolhidos como agentes cationizantes o iodoetano, iodoctano e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio. As respetivas metaloftalocianinas catiónicas foram obtidas em rendimentos razoáveis: 49-79% para as três cationizadas com iodoetano (**2.2**, **3.2** e **4.2**); 40% para a metaloftalocianina de Zn(II) cationizada com iodoctano (**2.3**) e 42% para a metaloftalocianina de Zn(II) cationizada com cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio (**2.4**).

No terceiro capítulo foi possível efetuar uma análise aos parâmetros fotofísicos e fotoquímicos mais relevantes para a aplicação em PDI das novas metaloftalocianinas obtidas, bem como estudos biológicos de duas delas. Todos os compostos em DMSO apresentaram a sua banda

de maior absorção (banda Q) na sua região típica (650-750 nm), que, por sua vez, se situa dentro da janela fototerapêutica. Todas as metalofteralocianinas catiónicas apresentaram algum grau de agregação em H₂O, embora a presença de ligandos axiais, particularmente do grupo hidroxilo, e o aumento do grau de cationização tenham favorecido o aumento da quantidade relativa da espécie monomérica em solução. De todos os complexos metálicos estudados, as metalofteralocianinas de Zn(II) catiónicas apresentaram melhores valores ao nível do coeficiente de absorção molar ($2,4-2,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Os estudos de fluorescência permitiram, em primeiro lugar, a identificação de uma impureza no lote sintetizado de **3.2**, algo que poderia comprometer a avaliação dos restantes parâmetros. Tanto a causa como o método de eliminação dessa impureza foram apurados com sucesso. Em segundo lugar, foram determinados os rendimentos quânticos de fluorescência, o que permitiu identificar, como seria de esperar, um efeito predominante do metal central, na medida em que os complexos de Al(III) possuem os valores mais altos (0,23-0,30) e os de In(III) os valores mais baixos (0,01-0,02). Estes valores são um reflexo do efeito do átomo pesado, que permite aumentar o rendimento quântico de cruzamento intersistemas sendo por isso de esperar que o In(III), o metal com maior número atômico, promova a transição do estado singuleto excitado para o estado tripleto excitado em detrimento da transição entre o estado singuleto excitado e o estado singuleto fundamental.

Dado que, como foi discutido no capítulo introdutório, o mecanismo de ação destes fotossensibilizadores envolve a produção de espécies reativas de oxigénio, particularmente de oxigénio singuleto, foi necessário efetuar estudos dos valores de Φ_{Δ} . Novamente, foi observado que os valores dependiam essencialmente do metal central. Os complexos de Zn(II) demonstraram maiores valores de produção de ¹O₂ (0,56-0,72) e os complexos de Al(III) os piores resultados (0,32-0,33). Este tipo de resultados é expectável dado que, novamente, o Zn(II) e o In(III) por serem metais de maior número atômico, promovem mais eficazmente a transição para o estado tripleto excitado, algo necessário para que ocorra a transferência de energia para o oxigénio tripleto.

Os estudos *in vitro* já efetuados para as metafteralocianinas de Zn(II) cationizadas com iodoetano e iodoctano permitiram avaliar o efeito do aumento da cadeia alquílica. A metalofteralocianina de Zn(II) cationizada com a cadeia mais curta demonstrou menor citotoxicidade no escuro (viabilidade celular próxima de 100% até 10 μM) para células HeLa e HaCaT, bem como uma maior taxa de inativação de bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), tendo sido possível uma inativação completa de colónias destas bactérias com concentrações a partir de 0,1 μM . A metalofteralocianina com a cadeia longa, apesar de possuir internalização uma ordem de grandeza superior, apenas promoveu uma inativação completa a concentrações a partir de 10 μM . Sob iguais condições experimentais, não foi observada uma fototoxicidade em células HaCaT para a metalofteralocianina de cadeia curta nas concentrações de 0,1 a 1 μM . Este resultado vem assim

corroborar a afirmação efetuada no capítulo introdutório relativo ao facto de fotossensibilizadores catiónicos possuírem uma seletividade para microorganismos mediante a ocorrência de interações eletrostáticas mais favoráveis com membranas de bactérias do que com membranas de células humanas. Em conclusão, a metaloftalocianina de Zn(II) de cadeia curta revelou ter melhores resultados biológicos, tendo sido possível estabelecer uma janela terapêutica onde se consegue obter inativação total de colónias de bactérias gram-negativas com poucos danos para queratinócitos humanos.

De todos os objetivos propostos no início desta dissertação, por uma questão temporal, apenas não foi possível efetuar os estudos biológicos que permitiriam avaliar o efeito do metal central e grau de cationização. Deste modo, apenas foi possível efetuar estes estudos para duas metaloftalocianinas e, com isto, avaliar o efeito do tamanho da cadeia cationizante. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que **2.2** é um fotossensibilizador promissor na medida em que combina os maiores coeficientes de absorção molar com os melhores rendimentos de formação de oxigénio singuleto, algo que é transversal a todos os complexos metálicos de Zn(II) estudados. A nível biológico, dos dois já testados, demonstrou inativação total de colónias de bactérias gram-negativas a concentrações que deixaram queratinócitos humanos com viabilidade celular próxima de 100%.

Das modificações estruturais das quais ainda não foram efetuados estudos biológicos, é particularmente promissor o aumento do grau de cationização dado que, segundo a literatura, poderá levar a um aumento da inativação de bactérias gram-negativas relativamente a **2.2**. Além dos parâmetros estruturais idealizados para este trabalho, existem outras vias que, em teoria, poderiam potenciar a terapia fotodinâmica. Uma dessas estratégias consiste na combinação de fotossensibilizadores com antibióticos.¹ A classe dos nitroimidazóis² parece particularmente promissora por ter demonstrado boa atividade para bactérias anaeróbicas e apresentar menores taxas de resistência comparativamente com outros fármacos. Dado que o mecanismo de ação predominante dos fotossensibilizadores (tipo II) envolve transferência de energia para o oxigénio do meio, a sua atividade em condições anaeróbicas deverá ser inferior e ocorrer maioritariamente pelo mecanismo do tipo I.³ Deste modo, a combinação de um fármaco da classe dos nitroimidazóis com um fotossensibilizador poderá trazer uma vantagem na medida em que poderá potenciar a sua ação em ambientes anóxicos. O primeiro passo para a síntese de ftalocianinas contendo o farmacóforo dos nitroimidazóis já foi efetuado mediante a síntese de **1.2** que posteriormente poderá ser ciclotetramerizado para obtenção da respetiva metaloftalocianina. Adicionalmente, poderá no futuro ser efetuada uma ligação de um destes fármacos por coordenação axial com a metaloftalocianina de Al(III).

Além das modelações estruturais efetuadas ou mencionadas neste trabalho, existem muitas outras igualmente promissoras cuja discussão não é do âmbito desta tese e que de igual modo

poderão contribuir na procura dos fotossensibilizadores que possuam as propriedades ideais para a inativação de microorganismos: baixa toxicidade para células humanas, elevada atividade antimicrobiana e espectro de ação (bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos) e capacidade de penetração e inativação de biofilmes. Com este tipo de investigação e desenvolvimento espera-se assim contribuir para a solução de uma das maiores ameaças de saúde pública que irá a médio prazo ter graves consequências sociais e financeiras.

4.1 Referências

- [1] (a) Dastgheyb, S. S.; Eckmann, D. M.; Composto, R. J.; Hickok, N. J., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2013**, *129*, 27-35; (b) Boluki, E.; Kazemian, H.; Peeridogaheh, H.; Alikhani, M. Y.; Shahabi, S.; Beytollahi, L.; Ghorbanzadeh, R., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2017**, *18*, 1-5; (c) Barra, F.; Roscetto, E.; Soriano, A. A.; Vollaro, A.; Postiglione, I.; Pierantoni, G. M.; Palumbo, G.; Catania, M. R., *International journal of molecular sciences*, **2015**, *16*, 20417-20430; (d) Vinagreiro, C. S.; Gonçalves, N. P. F.; Calvete, M. J. F.; Schaberle, F. A.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M., *Journal of Fluorine Chemistry*, **2015**, *180*, 161-167.
- [2] (a) Löfmark, S.; Edlund, C.; Nord, C. E., *Clinical Infectious Diseases*, **2010**, *50*, S16-S23; (b) Edwards, D. I., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1993**, *31*, 9-20.
- [3] Hope, C. K.; Hindley, J. A.; Khan, Z.; de Josselin de Jong, E.; Higham, S. M., *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, **2013**, *10*, 677-682.

Capítulo 5

Experimental

5.1. Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*, *Fluorochem*, *Acros Organics* e *Jose M. Vaz Pereira*. Todos os reagentes foram utilizados com o mesmo grau de pureza descrito pelo fornecedor. Todos os solventes foram purificados ou secos, sempre que necessário, de acordo com os métodos descritos na literatura.¹

5.2. Instrumentação e metodologia

I- Cromatografia de camada fina

As reacções foram controladas, quando possível, por cromatografia em camada fina (TLC). Foram utilizadas placas *ALUGRAM® Xtra SIL G* da *Machery-Nagel* com revelação UV₂₅₄. Nos casos particulares de compostos e/ou impurezas que não possuíam revelação a este comprimento de onda, foram utilizados como agentes reveladores permanganato de potássio e iodo. O eluente utilizado variou consoante a polaridade dos compostos em causa.

II- Cromatografia em coluna

Para a separação dos compostos por cromatografia de adsorção em coluna, foi utilizado como fase estacionária gel de sílica 60 (*Sigma-Aldrich*). O eluente utilizado variou consoante a polaridade dos compostos em causa.

III – Ultrassons

Para a facilitar a dissolução dos compostos foi utilizado um ultrassons Bandelin Sonorex TK52.

IV – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (^1H) e de carbono (^{13}C) foram obtidos num espectrómetro Buker Avance 400 (400, 101 MHz respetivamente) do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra. Os desvios químicos (δ) apresentados são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). O padrão interno para o RMN ^1H e RMN ^{13}C é o tetrametilsilano (TMS) ($\delta=0,00$ ppm).

V – Espectrometria de massa

Os espectros de massa obtidos por ionização em *electrospray* (ESI) foram efetuados num Bruker Microtof pela Unidade de Masas e Proteómica – Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Os espectros de massa obtidos por ionização por impacto electrónico (EI) foram efetuados num Autospec Micromass pela Unidade de Masas e Proteómica – Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

VI – Análise elementar

Os valores de análise elementar foram obtidos num Thermo Finnigan Flash 1112 pela Unidad de Análisis Elemental – Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

VII – Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível

Os espectros de UV-Vis foram adquiridos num espectrofotómetro Scimadzu 2100 utilizando uma célula de quartzo Hellma Analytics com um comprimento ótico de 10 mm.

A determinação dos coeficientes de absorvidade molar ao comprimento de onda de absorção máxima ($\epsilon_{\lambda_{\text{máx}}}$) foi feita a partir da lei de Beer-Lambert. Esta lei estabelece uma proporcionalidade direta entre a absorvância de uma amostra (A) e a sua concentração (c), absorvidade molar (ϵ) e comprimento ótico (l):

$$A = \epsilon c l \quad (5.1)$$

Para cada determinação, foram preparadas duas soluções mãe com ~ 1 mg e ~ 2 mg de amostra, tendo cada dado 4 soluções filhas por diluição, com concentrações na ordem dos 10^{-7} a 10^{-6} M ($A = 0,1$ a $1,5$).² O ajuste linear dos pontos experimentais foi feito com recurso ao *OriginPro 2016*.

VIII – Espectroscopia de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados pelo método comparativo.³ Todas as medições foram efetuadas num fluorímetro Horiba Jobin Yvon – Spex Fluorolog 3.22, utilizando uma célula de quartzo Hellma Analytics de quatro faces com um comprimento ótico de 10 mm. Foi utilizado como referência a ftalocianina de zinco não substituída (ZnPc_{ref}) ($\Phi_{\text{F}}^{\text{Ref}}(\text{DMSO}) = 0,18$).⁴

$$\Phi_F = \Phi_F^{\text{Ref}} \frac{F A_{\text{Ref}} \eta^2}{F_{\text{Ref}} A \eta_{\text{Ref}}^2} \quad (5.2)$$

Em que F e F_{Ref} correspondem ao integral da emissão de fluorescência da amostra e da referência respectivamente; A e A_{Ref} à absorção no comprimento de onda utilizado na excitação da amostra e referência, respectivamente; η e η_{Ref} correspondem ao índice refratário do solvente da amostra e referência, respectivamente. Foram usadas soluções de amostras e referência com A~0,05, tendo sido escolhidos os comprimentos de excitação que conferiam maior proximidade de absorvâncias entre cada amostra e a referência.

IX – Rendimento quântico de oxigénio singleto

O rendimento quântico de formação de oxigénio singleto foi determinado através de um método comparativo por deteção da fosforescência do oxigénio singleto a 1270 nm.⁵ Foi utilizado um espectrómetro de fotólise por relâmpago da Applied Photophysics LKS.60, constituído por um laser Nd-YAG Spectra-Physics Quanta Ray GCR-130, um osciloscópio Hewlett Packard Infinium e como detetor um fotomultiplicador Hamamatsu R5509-42, arrefecido a 193K por azoto líquido. Foi utilizada a fenalenona como referência (Φ_F^{Ref} (acetone) = 0,98).⁶ Foram preparadas soluções em DMSO de cada amostra e da referência com absorvância de 0,25 a 355 nm (terceira harmónica do laser). Esta técnica permite obter o decaimento da fosforescência ao longo do tempo, podendo ser ajustada uma exponencial de primeiro grau. Para cada solução, foram obtidos 15 a 20 decaimentos a diferentes intensidades de laser de excitação, tendo estes resultado de uma média de vários pulsos de laser. Após o ajuste exponencial para cada decaimento feito com recurso ao *OriginPro 2016*, foram retirados os fatores pré-exponenciais e representados em função da intensidade do laser. Os declives das retas obtidos para a amostra (S) e para a referência (S_{Ref}) podem ser relacionados com o rendimento quântico de oxigénio singleto da amostra (Φ_{Δ}) através da expressão:⁷

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{Ref}} \frac{S}{1-10^{-A}} * \frac{1-10^{-A_{\text{Ref}}}}{S_{\text{Ref}}} \quad (5.3)$$

Em que A e A_{Ref} correspondem à absorvância da amostra e da referência, respectivamente.

X – Ensaios *in vitro*

Todos os estudos biológicos descritos foram fornecidos pelo Dr. Janusz M. Dabrowski, Barbara Pucelik e Robert Paczynski da Jagiellonian University de Cracóvia, Polónia.

a) Estudos de internalização

As células foram incubadas durante 10 min a 2h com 10 μM de composto, seguido de uma lavagem do meio de cultura e dissolução do *pellet* em 10% SDS. A quantificação foi feita por medição da fluorescência da solução.

b) Citotoxicidade no escuro

As soluções preparadas de composto (0,1-100 μM) foram adicionadas às células (HeLa e HaCaT) seguido de 2h de incubação. A concentração de DMSO não excedeu 0,5%. A viabilidade das células foi determinada com base no ensaio do MTT.

c) Atividade fotodinâmica

As culturas de microorganismos foram incubadas por 2h com o fotossensibilizador a várias concentrações (0,1-100 μM) e sujeitas a uma dose de luz de 10 J/cm², utilizando uma luz branca de proveniente de um iluminador de fibra ótica de 150 W (OSH150).

d) Toxicidade fotodinâmica

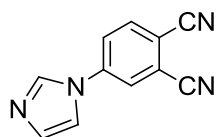
As condições experimentais foram semelhantes às da atividade fotodinâmica: as células foram incubadas por 2h com o fotossensibilizador a várias concentrações (0,1-20 μM) e sujeitas a uma dose de luz de 10 J/cm².

5.3. Síntese e caracterização estrutural de compostos

5.3.1 Modelação de ftalonitrilos

4-(1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo 1.1

Foi dissolvido 4-nitroftalonitrilo (2,56 g, 14,8 mmol), imidazol (1,26 g; 18,5 mmol) e K₂CO₃ (10,24g, 74 mmol) em DMF (38 ml) num balão de fundo redondo de 100 ml. A solução foi deixada a agitar num banho de água à temperatura ambiente durante 48h. A mistura foi filtrada gravitacionalmente tendo o K₂CO₃ ficado retido no funil. Foram adicionados 10 ml de DMF para remover restos de produto adsorvidos ao sal. Foi adicionada uma mistura de água e gelo à mistura reacional até ocorrer formação de precipitado (~200 ml). O precipitado de cor amarelada foi filtrado a vácuo num funil de vidro de placa sinterizada e seco numa estufa a 80°C durante 12h. Ao precipitado foram adicionados cerca de 50 ml de metanol. A mistura foi aquecida tendo parte do precipitado sido dissolvido. Após arrefecimento, o composto foi novamente filtrado a vácuo usando um funil de vidro de placa sinterizada, seco a 80°C durante 4h e, finalmente, a vácuo. Foram obtidos 1,59g (55,5%) de um sólido amarelado.



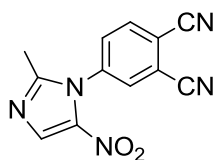
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,17 (s, 1H, H4'); 7,97 (s, 1H, H5'); 8,22-8,29 (m, 2H, H5+H6); 8,53 (s, 1H, H2'); 8,58 (d, $J=1,7$ Hz, 1H, H3).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 111,74 (C2); 115,46 (C2-CN); 115,68 (C1-CN); 116,50 (C1); 117,68 (C5'); 124,11 (C5); 124,53 (C3); 130,98 (C4'); 135,78 (C6); 136,07 (C2'); 140,29 (C4).

MS (EI): m/z obtido 194,0591 [M]⁺; calculado para [C₁₁H₆N₄]: 194,0592

4-(2'-metil-5'-nitro-1'H-imidazol-1'-il)ftalonitrilo 1.2

O 2-metil-4(5)-nitroimidazol (500 mg, 3,9 mmol) foi dissolvido em 10 ml de H₂O e foi adicionado NaOH (160 mg, 3,9 mmol). A solução foi agitada durante 5 min, tendo ficado com uma cor amarelada. De seguida, foi evaporada a H₂O fazendo 5 ciclos de mistura azeotrópica com tolueno. O composto foi seco a 70°C durante 6h. Foi adicionado DMF (5,0 ml) e 4-nitroftalonitrilo (2,9 mmol, 500 mg) e a mistura foi deixada a agitar a 70°C durante 72h. O crude foi vertido sob uma mistura de água e gelo (100 ml) e filtrado a vácuo usando um funil de vidro de placa sinterizada, tendo sido seco a 70°C durante 18h. O composto foi dissolvido em acetato de etilo e foi adicionada sílica. A mistura foi evaporada até à secura e foi feita uma aplicação em coluna de sílica a seco. Foi feita uma eluição gradiente com diclorometano puro, diclorometano/acetato de etilo 1:1 e acetato de etilo puro. Foi feita uma recristalização em acetona. Foram obtidos 398 mg (54%) de um produto branco.



RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆): δ = 2,46 (s, 3H, -CH₃); 8,28 (dd, $J=8,4$ Hz, 2,2 Hz, 1H, H5); 8,36 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H6); 8,41 (s, 1H, H4'); 8,46 (d, $J=2,2$ Hz, 1H, H3).

RMN ¹³C (101 MHz, acetona-d₆): δ = 13,90 (C2'-CH₃); 115,55 (C2-CN); 115,77 (C1-CN); 116,93 (C2); 118,00 (C1); 122,08 (C4'); 132,09 (C5); 132,16 (C3); 136,37 (C6); 141,08 (C4); 145,83 (C2'); 148,28 (C5')

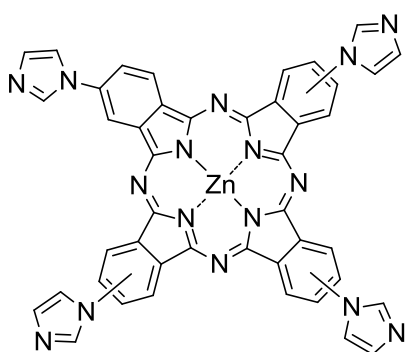
MS (EI): m/z obtido 253,0596 [M]⁺; calculado para [C₁₂H₇N₅O₂]: 253,0600

4.3.2 Síntese de metaloftalocianinas neutras

[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de zinco (II) 2.1

Foi dissolvido **1.1** (502 mg, 2,58 mmol) e Zn(OAc)₂·2H₂O (284 mg, 1,29 mmol) em DMAE (4 ml). A mistura ficou em agitação a 140°C durante 48h. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, foram adicionados cerca de 35 ml de metanol e 4 ml de água. O precipitado formado foi

filtrado a vácuo num funil de vidro de placa sinterizada. Foi feita uma lavagem com 25 ml de água, metanol, acetona e diclorometano, por esta ordem. Foi obtido um sólido de cor verde (385 mg, 71%).



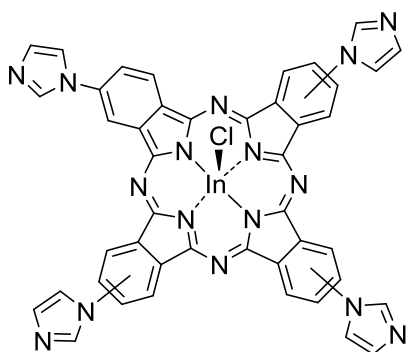
RMN ¹H (400 MHz, piridina-d₅, 80°C): δ = 7,76 (d, J =10,3 Hz, 4H), 8,06-8,31 (m, 8H), 8,83-8,91 (m, 4H), 9,24-9,41 (m, 8H);

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 358 (2,5x10⁴); 616 (1,3x10⁴); 682 (7,1x10⁴).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 841,1735 [M+H]⁺; calculado para [C₄₄H₂₅N₁₆Zn]: 841,1740

[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de índio (III) 3.1

Foi dissolvido **1.1** (150 mg, 0,77 mmol) e InCl₃ (65 mg, 0,29 mmol) em quinolina (1,0 ml). A mistura ficou em agitação a 180°C durante 8h sob atmosfera de N₂. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, o produto foi precipitado por adição de cerca de 20 ml de metanol. O precipitado foi filtrado a vácuo num funil de vidro de placa sinterizada. Foi feita uma lavagem com 20 ml de água, acetona e diclorometano por esta ordem. Foi obtido um sólido de cor verde (126 mg, 67%).



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,17 (s, 4H), 7,94 (d, J =8,1 Hz, 4H), 8,01 (s, 4H), 8,12 (dd, J =8,1 Hz, 2,0 Hz, 4H), 8,17 (d, J =2,0 Hz, 4H), 8,54 (s, 4H).

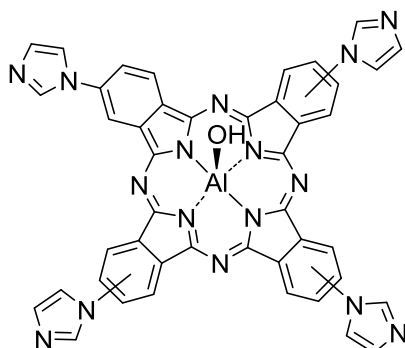
UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 358 (7,6x10⁴); 628 (3,0x10⁵); 698 (1,7x10⁵).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 949,3 [M+Na]⁺; calculado para [C₄₄H₂₄N₁₆InClNa]: 949,1

[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de alumínio (III) 4.1

Foi dissolvido **1.1** (500 mg, 2,57 mmol) e AlCl₃ (171 mg, 1,28 mmol) em 1-cloronaftaleno (5,0 ml). A mistura ficou em agitação a 240°C durante 7h sob atmosfera de N₂. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, o produto foi precipitado por adição de cerca de 50 ml de diclorometano. O precipitado foi filtrado a vácuo num funil de vidro de placa sinterizada. Foi

feita uma lavagem com 20 ml de acetona, água, acetona e diclorometano por esta ordem. Foi obtido um sólido de cor verde (340 mg, 60%).



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,60 (s, 4H), 8,54 (m, 4H), 8,86 (m, 4H), 9,29 (m, 4H), 9,82 (m, 4H), 10,00 (s, 4H);

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (log ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 364 (7,0x10⁴); 624 (3,5x10⁴); 693 (1,8x10⁵).

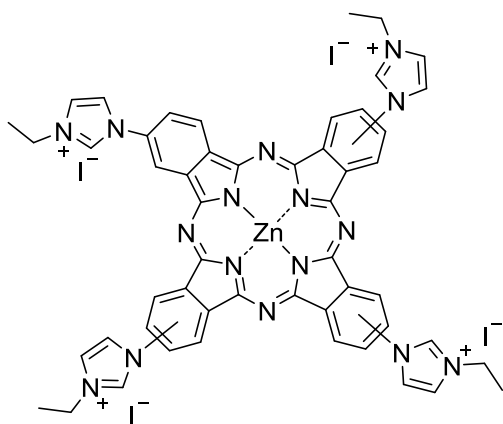
MS (ESI-TOF): m/z obtido 821,2285 [M+H]⁺; calculado para [C₄₄H₂₆N₁₆AlO]: 821,22909

5.3.3 Tetracationização de metalofalocianinas

Procedimento geral: A metalofalocianina neutra foi dissolvida em DMF e adicionados 10-100 equivalentes de agente alquilante. Ao longo de 48h foram adicionados faseadamente 10-300 equivalentes adicionais. Após o término da reação, o produto foi precipitado, filtrado a vácuo e seco.

Iodeto de [[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(3'-etil-1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de zinco (II)] 2.2

Foi dissolvido **2.1** (100 mg, 0,119 mmol) e iodoetano (1 ml, 12 mmol) em DMF (4 ml) num balão de fundo redondo. A mistura ficou em agitação a 75°C e foram adicionados 3 ml (24 mmol) faseadamente ao longo do tempo de reação. O composto foi precipitado com 40 ml de diclorometano. Foram obtidos 85 mg (49%) de um sólido verde.



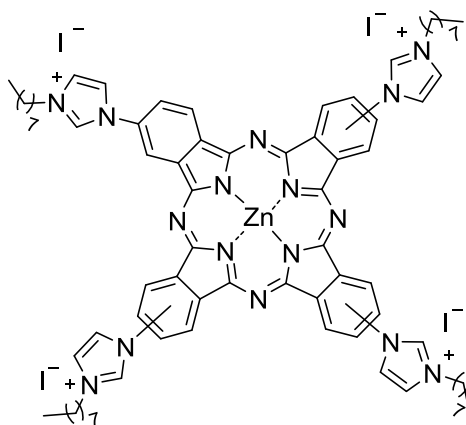
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,62 (sl, 12H), 4,45 (sl, 8H), 8,08-8,44 (m, 8H), 8,50-9,00 (m, 8H) 9,05-9,80 (m, 4H), 10,10-10,50 (m, 4H)

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (log ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 354 (7,4x10⁴); 611 (4,4x10⁴); 677 (2,8x10⁵).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 1337,0397 [M-I]⁺, calculado para [C₅₂H₄₄I₃N₁₆Zn]: 1337,0344

Iodeto de [[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(3'-octil-1H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de zinco(II)] 2.3

Foi dissolvido **2.1** (150 mg, 0,18 mmol) e iodoctano (0,3 ml, 1,8 mmol) em DMF (5 ml) num balão de fundo redondo. A mistura ficou em agitação a 100°C e foram adicionados 0,3 ml (1,8 mmol) após 24h. À mistura foi adicionado metanol (20 ml) seguidos de 150 ml de Et₂O. Foram obtidos 128 mg (40%) de um sólido verde.



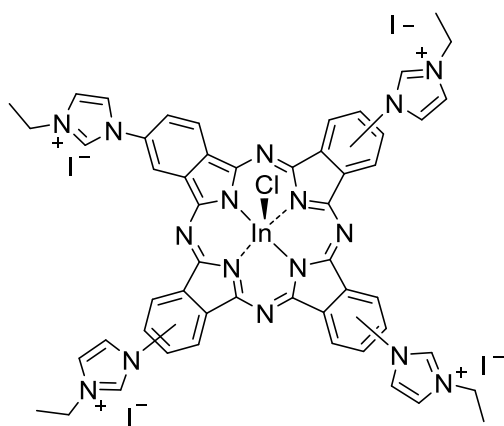
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 0,84 (m, 12H), 1,21-1,48 (m, 40H), 2,45 (s, 8H), 4,55 (s, 8H), 8,04-8,58 (m, 12H), 8,89-9,42 (m, 8H), 10,53-10,74 (m, 4H);

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (log ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 354 (6,2x10⁴); 611 (3,7x10⁴); 677 (2,4x10⁵).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 1546,5058 [M-2I]⁺, calculado para [C₇₆H₉₂I₂N₁₆Zn]: 1546,50498

Iodeto de [[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(3'-etil-1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de índio (III)] 3.2

Foi dissolvido **3.1** (126 mg, 0,13 mmol) e iodoetano (1 ml, 12 mmol) em DMF (1,5 ml) num balão de fundo redondo. A mistura ficou em agitação a 80°C sob atmosfera de N₂ e foram adicionados 3 ml (24 mmol) faseadamente ao longo do tempo de reação. O produto foi precipitado com DCM (20 ml) e filtrado. O filtrado, depois de se encontrar seco, foi dissolvido em DMF (1,5 ml) e adicionado InCl₃ (287 mg, 1,3 mmol). A mistura reacional foi deixada a 80°C durante 8h. Foi adicionado DCM (20 ml) à mistura reacional e o precipitado filtrado e lavado com THF com recurso a ultra-sons (3x25 ml, 3x5 min). Foram obtidos 113 mg (56%) de um sólido verde.



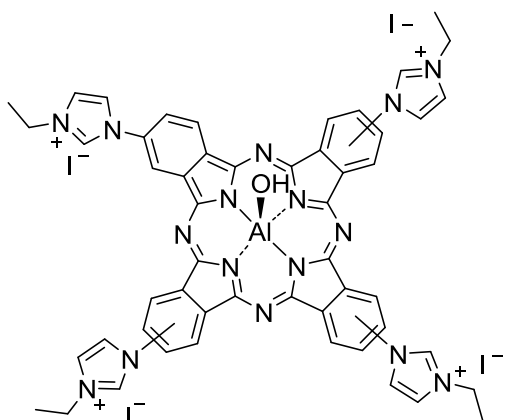
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,74 (sl, 12H), 4,53 (sl, 8H), 8,33 (sl, 4H), 8,77-8,89 (m, 8H), 9,50-9,94 (m, 8H), 10,42 (sl, 4H).

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (log ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 364 (8,5x10⁴); 624 (3,5x10⁴); 690 (1,9x10⁵).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 630,5536 [M-Cl-2I]²⁺, calculado para [C₅₂H₄₄I₂N₁₆In]: 1261,10520

Iodeto de [[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(3'-etil-1H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de alumínio(III)] 4.2

Foi dissolvido **4.1** (120 mg, 0,14 mmol) e iodoetano (1 ml, 12 mmol) em DMF (1,0 ml) num balão de fundo redondo. A mistura ficou em agitação a 80°C sob atmosfera de N₂ e foram adicionados 3 ml (24 mmol) faseadamente ao longo do tempo de reação. O produto foi precipitado com DCM (20 ml). Foram obtidos 155 mg (79%) de um sólido verde.



RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,73 (t, $J=7,3$ Hz, 12H), 4,54 (q, $J=7,3$ Hz, 8H), 8,37 (s, 4H), 8,98 (m, 8H), 9,99 (m, 4H) 10,21-10,32 (m, 4H), 10,53 (m, 4H).

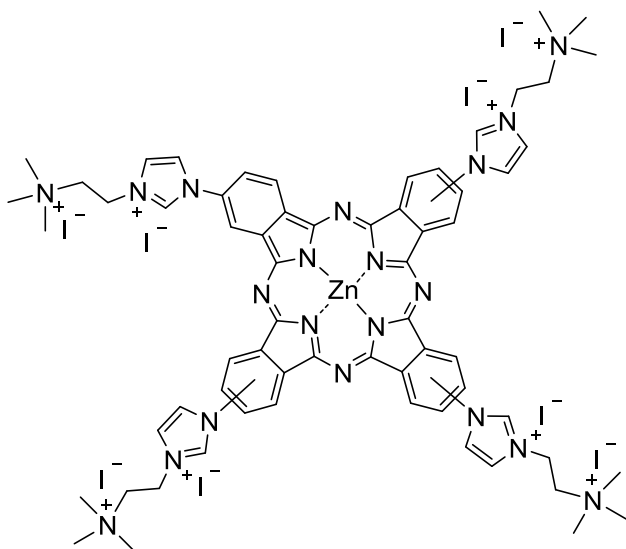
UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm (log ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 357 (7,0x10⁴); 616 (3,0x10⁴); 680 (1,7x10⁵).

MS (ESI-TOF): m/z obtido 1061,2698 [M-3I-2H]⁺, calculado para [C₅₂H₄₃IN₁₆AlO]: 1061,26603

5.3.4 Octacationização da metaloftalocianina de Zn(II)

Iodeto de [[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra-(3'-(2''-etiltrimetilamônio)-1'H-imidazol-1'-il)ftalocianato] de zinco]

Foi dissolvido **2.1** (166 mg, 0,20 mmol), cloreto de (2-cloroetil)trimetilamônio (332 mg, 2,10 mmol) e KI (3,5 g, 21,0 mmol) em DMF (4 ml) num balão de fundo redondo. A mistura ficou em agitação a 120°C durante 72h. Após arrefecimento, foi adicionado diclorometano (30 ml). O precipitado formado foi lavado com 4x20 ml de EtOH com recurso a ultrassons (4x5 min). O sólido resultante foi dissolvido em H₂O e foi submetido a uma cromatografia por exclusão de peso molecular utilizando a resina Sephadex[®] G-10, utilizando um fluxo de 2,5 ml/min. Foram obtidos 125 mg (42%) de um sólido verde.



RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta =$ 4,17 (sl, 8H), 8,21-8,96 (m, 16H) 10,40 (sl, 4H), 10,78 (sl, 4H). Nota: Por sobreposição com os sinais provenientes do DMSO e H_2O , não é possível identificar os sinais correspondentes a um $-\text{CH}_2-$ e aos $-\text{CH}_3$ (integração de 8 e 36, respectivamente).

UV-Vis (DMSO): λ_{abs} , nm ($\log \epsilon$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 343 ($5,5 \times 10^4$); 612 ($3,6 \times 10^4$); 677 ($2,6 \times 10^5$).

Análise elementar: Calculado para $[\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{I}_8\text{N}_{20}\text{Zn}] \cdot 4 \text{KI}$: C 26,79; H 2,64; N 9,76. Encontrado: C 26,88; H 2,64; N 8,76.

5.4 Referências

- [1] Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*. 7th ed.; Butterworth-Heinemann: **2012**.
- [2] Harris, D. C., *Quantitative chemical analysis*. 8th ed.; W.H. Freeman: New York, **2010**.
- [3] Acar, İ.; Büyüklüoğlu, Z.; Durmuş, M.; Kantekin, H., *Journal of Organometallic Chemistry*, **2012**, 708–709, 65-74.
- [4] Chauke, V.; Durmuş, M.; Nyokong, T., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2007**, 192, 179-187.
- [5] Dąbrowski, J. M.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G.; Monteiro, C. J. P.; Peixoto, A. F.; Karocki, A.; Urbańska, K.; Stochel, G., *Photochemistry and photobiology*, **2007**, 83, 897-903.
- [6] Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1994**, 79, 11-17.
- [7] Vinagreiro, C. S. *Síntese de Conjugados de Sulfonamidas e Macrociclos Tetrapirrólicos com Potencial Aplicação Dual em Químio- e Fototerapia*. Coimbra University, **2015**.