



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bruna Diana Paiva Costa

**CORRÓIS E HIDRAZONAS: DOIS
ALIADOS NA LUTA CONTRA O
CANCRO DO PULMÃO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada e Industrial, orientada pela Professora Doutora Teresa M. V. D. Pinho e Melo, coorientada pela Doutora Susana Margarida Martins Lopes e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Bruna Diana Paiva Costa

CORRÓIS E HIDRAZONAS: DOIS ALIADOS NA LUTA CONTRA O CANCRO DO PULMÃO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada e Industrial, orientada pela Professora Doutora Teresa M. V. D. Pinho e Melo, coorientada pela Doutora Susana Margarida Martins Lopes e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2021

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

Prefácio

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado entre Janeiro de 2020 e Agosto de 2021 no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Neste período de tempo, foram utilizados 12 meses para o desenvolvimento do trabalho de síntese química no grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra, 3 meses para os estudos fotofísicos realizados no grupo de Fotoquímica do Centro de Química de Coimbra e 8 meses nos estudos *in vitro* realizados na Unidade de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, conciliando quando possível o trabalho simultaneamente nos diferentes laboratórios.

Agradecimentos

Na reta final de uma das etapas mais importante no meu percurso académico, quero aproveitar para agradecer a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento, quer a nível profissional quer pessoal.

Começo por agradecer à Professora Doutora Teresa M. V. D. Pinho e Melo por me ter recebido no seu grupo de investigação há 3 anos atrás e por desde cedo me ter proporcionado este gosto pela química orgânica. Quero também agradecer por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimento transmitido.

À Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho obrigada por me ter recebido no seu grupo de investigação e me ter proporcionado a possibilidade de realizar os estudos necessários para a realização do trabalho apresentado nesta dissertação.

Ao Professor Doutor João Sérgio Seixas de Melo quero agradecer por me ter dado a possibilidade de realizar parte do trabalho apresentado nesta dissertação no seu grupo de investigação, por toda a disponibilidade e conhecimento transmitido, e por toda a boa disposição. Aos meus colegas de laboratório do grupo de fotoquímica, obrigada por me terem recebido tão bem. Um agradecimento em especial à Carla e à Mariana, por toda a ajuda e amizade.

À Doutora Susana Margarida Martins Lopes um agradecimento especial por ao longo da realização deste trabalho me ter ensinado todos os dias algo novo, por me ter motivado e dado a confiança necessária para me sentir mais à vontade na realização do trabalho laboratorial. Quero também agradecer por toda a disponibilidade e paciência que teve ao longo deste tempo.

À Doutora Mafalda Sofia Laranjo Cândido gostaria de agradecer por toda a disponibilidade e ensinamento transmitido, não só ao longo da realização deste projeto, mas desde o início do estágio de licenciatura, assim como por toda a energia, confiança e perfeccionismo transmitido.

À Doutora Ana Clara Beltran Rodrigues gostaria de agradecer por toda a disponibilidade e paciência necessária, por num curto espaço de tempo me ter transmitido tanto conhecimento e me ter proporcionado o gosto pela fotoquímica. Um especial obrigada por toda ajuda e amizade.

À Professora Doutora Marta Piñeiro, gostaria de agradecer por toda a disponibilidade e ajuda na realização deste projeto.

A todos os elementos do grupo de química orgânica, Doutora Elisa Serra, Doutora Dina Murtinho, Doutora Ana Lúcia Cardoso, Doutora Isabel Soares, obrigada por me terem recebido tão bem, por toda a disponibilidade e auxílio prestado na realização deste projeto.

Ao Doutor Nelson Pereira e ao Doutor Bruno Nascimento um agradecimento especial por terem contribuído para o meu gosto pela química orgânica e por me terem ensinado bases fundamentais para a realização deste projeto.

À D. Lurdes Cortesão agradeço por todo o apoio prestado, toda a disponibilidade, carinho e boa disposição com que inundava o laboratório cada vez que lá entrava.

Ao Mestre Pedro Cruz agradeço pela colaboração nos estudos de ressonância magnética nuclear.

A todos os colegas de laboratório, ao Américo, Carla e Nélia obrigada por todo o conhecimento que me transmitiram, ao João e à Cláudia obrigada por toda a diversão e por todas as vezes que ficaram até mais tarde para que conseguisse terminar o trabalho laboratorial, não me esqueço do vosso jantar, ao John, Ana, Bruno e Cristina. Um grande obrigada a todos por me terem recebido tão bem, por todo o conhecimento transmitido, por toda a animação e espírito de entreajuda.

Às minhas colegas de casa, Jo, Su, Andreia e Mascas, obrigada por toda esta caminhada que fizemos juntas. Obrigada por toda a paciência que tiveram ao longo destes anos para aturar o meu mau feitio, por todas as gargalhadas e por todas as idas ao 3,5.

À team ma(r)mita, Joana, Carolina, Carla e Cátia, obrigada por todas as marmitas que partilhámos, por todo o apoio e amizade. O vosso apoio e amizade foi fundamental ao longo deste ano, obrigada por tudo.

Às minhas belas, Inês e Catarina, são inúmeras as histórias que temos para contar, as risadas, as horas intermináveis de conversa, os conselhos e os raspanetes. Não podia, de todo, pedir melhores companheiras de vida do que vocês! Mil obrigadas por me acompanharem em todas as jornadas.

À minha madrinha e à minha Dora, um agradecimento muito especial por desde cedo me acompanharem em todas etapas da minha vida, por estarem sempre presentes e a torcer para que tudo corra da melhor forma possível. O vosso apoio é sem dúvida fundamental.

Aos meus avós, os meus queridos avós, obrigada por estarem sempre presentes, por fazerem questão de querer saber sempre o que estou a fazer e apoiarem incondicionalmente as minhas escolhas. A vocês faltam-me as palavras para agradecer tudo o que me dão e me ensinam a cada conversa, em cada olhar.

Ao meu irmão, uma das pessoas que mais admiro na vida, obrigada por teres desde sempre contribuído para que fosse a pessoa que sou hoje, por todos os risos, por todas as palavras de conforto e coragem, por mesmo longe teres feito questão de estar sempre perto, espero que estejas orgulhoso da tua pita. À minha Cátia, obrigada por teres entrado na nossa vida e por seres tão especial. Gosto muito de vocês.

Aos meus pais, aqueles que tornaram tudo isto possível, aqueles que me dão as asas para sonhar, um obrigada nunca chegará. Ao meu pai, obrigada por mesmo longe estares sempre presente, por me apoiares nas minhas decisões e me auxiliares a seguir o caminho correto. À minha mãe, a minha mãezinha, faltam-me as palavras para te agradecer, talvez tivesse que escrever uma tese para agradecer tudo o que fazes por mim. És e sempre foste o meu maior apoio, o meu grande pilar, a minha guerreira, a minha força fora do corpo, aquela que sempre me apoiou e me ajudou a escolher a direção certa, aquela que confortou todas as minhas lágrimas e que partilhou todos os meus sorrisos. Hoje, o final desta etapa é em especial para ti.

A vocês, espero um dia retribuir em dobro tudo o que fizeram e fazem por mim.

Obrigada a todos.

Índice

ABREVIATURAS	XVII
NOMENCLATURA	XIX
SÍMBOLOS	XXI
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT	XXVII
CAPÍTULO 1.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Cancro do Pulmão.....	3
1.2. Terapia Fotodinâmica	6
1.2.1. Fundamentos da terapia fotodinâmica	6
1.2.2. Componentes ativos da terapia fotodinâmica	8
1.3. Corróis	13
1.3.1. Estrutura e propriedades gerais.....	14
1.3.2. Síntese de corróis	16
1.3.2.1. Metodologia sintética clássica	16
1.3.2.2. Nova metodologia sintética via reação de hetero-Diels-Alder	18
1.4. Objetivos	23
CAPÍTULO 2.....	27
2. SÍNTESE QUÍMICA	27
2.1. Síntese de dipirrometanos e α,α -dicloro-hidrazonas	27
2.1.1. Síntese de dipirrometanos	27
2.1.2. Síntese de α,α -dicloro-hidrazonas	28
2.2. Síntese de bilanos e hexapirróis via bis-hetero-Diels-Alder	31
2.3. Síntese de corróis <i>trans</i> -A ₂ B.....	37
2.4. Conclusão	41
CAPÍTULO 3.....	45
3. ESTUDOS FOTOFÍSICOS	45

3.1. Introdução teórica	45
3.1.1. Espectroscopia de absorção eletrónica e fluorescência	45
3.1.2. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....	46
3.1.3. Fluorescência resolvida no tempo.....	47
3.2. Caracterização fotofísica	48
3.2.1. Coeficiente de absorvidade molar (ϵ)	48
3.2.2. Espectroscopia de absorção eletrónica e fluorescência em estado estacionário.....	51
3.2.3. Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ_F)	56
3.2.4. Caracterização do estado excitado tripleto: Formação de Oxigénio Singuleto (Φ_Δ)	60
3.3. Conclusão	62
CAPÍTULO 4	67
4. ESTUDOS BIOLÓGICOS IN VITRO	67
4.1. Fotocitotoxicidade e citotoxicidade no escuro	67
4.1.1. Fotocitotoxicidade.....	67
4.1.2. Citotoxicidade no escuro.....	73
4.2. Conclusão	76
CAPÍTULO 5	79
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	79
CAPÍTULO 6	83
6. SECÇÃO EXPERIMENTAL	83
6.1. Síntese química	83
6.1.1. Aparelhagem utilizada.....	83
6.1.2. Índice de compostos.....	85
6.1.3. Síntese dos compostos.....	87
6.1.3.1. Síntese de dipirrometanos	87
6.1.3.2. Síntese de hidrazonas.....	89
6.1.3.3. Síntese de bilanos e hexapirróis	91
6.1.3.4. Síntese de corróis	101
6.2. Fotofísica dos compostos	107
6.2.1. Materiais e Solventes	107
6.2.2. Espectrometria de absorção ultravioleta-visível.....	107
6.2.3. Espectros de emissão e de excitação de fluorescência.....	107
6.2.4. Rendimento quântico de fluorescência.....	108
6.2.5. Tempo de vida de fluorescência.....	108
6.2.6. Formação de oxigénio singuleto.....	109
6.3. Estudos biológicos <i>in vitro</i>	110

6.3.1.	Cultura celular	110
6.3.2.	Tratamento fotodinâmico	110
6.3.3.	Avaliação da citotoxicidade.....	111
CAPÍTULO 7		115
7.	Referências	115
CAPÍTULO 8.....		130
8.	Apêndice.....	130

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ar	Grupo aromático
CPNPC	Carcinoma pulmonar de não pequenas células
CPPC	Carcinoma pulmonar de pequenas células
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona
DLI	Intervalo fármaco luz, do inglês <i>drug-light interval</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Dipirrometano
EGFR	Recetor do fator de crescimento epitelial, do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
EMAR	Espectrometria de Massa de Alta Resolução
equiv.	Equivalentes
ESI	Do inglês <i>electrospray ionization</i>
FBS	Soro bovino fetal
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
HOMO	Do inglês <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina, do inglês <i>hematoporphyrin derivative</i>
ISC	Cruzamento intersistema, do inglês <i>Intersystem crossing</i>
IUPAC	Do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KRAS	Do inglês <i>Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue</i>
LEDs	Díodos emissores de luz, do inglês <i>light-emitting diode</i>
LUMO	Do inglês <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
m	Multiplete
M ⁺	lão molecular
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MTT	
NNK	Nitrosamina derivada da nicotina, do inglês <i>nicotine-derived nitrosamine ketone</i>
p.f.	Ponto de fusão
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDT	Terapia fotodinâmica, do inglês <i>photodynamic therapy</i>
Ph	Grupo fenilo
ppm	Partes por milhão

Abreviaturas

PS	Fotossensibilizador, do inglês <i>photosensitizer</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Protónica
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
s	singuleto
sl	Singuleto largo
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético, do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
THF	Tetra-hidrofurano
THF- <i>d</i> ₈	Tetra-hidrofurano deuterado
TLC	Cromatografia em camada fina, do inglês <i>thin-layer chromatography</i>
TP ⁵³	Proteína tumoral 53, do inglês <i>tumor protein p53</i>
TPP	<i>meso</i> -Tetrafenilporfirina, do inglês <i>meso-Tetraphenylporphyrin</i>
Ts	Grupo tosilo

Nomenclatura

A nomenclatura utilizada nesta dissertação segue as regras gerais da IUPAC, recorrendo, em alguns casos aos nomes triviais, posição *meso* e posição β -pirrolica, por uma questão de simplificação.

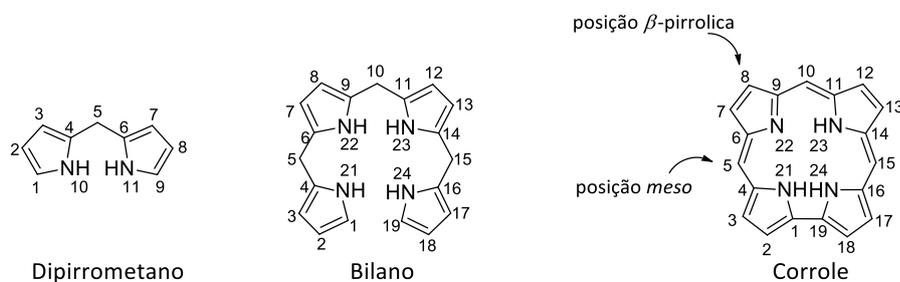


Figura 1. Sistema de numeração do dipirrometano, bilano e corrole.

Na escrita desta dissertação foi utilizado o plural “óis”, para compostos heterociclos em que o singular é “le”, como demonstra o exemplo 1.

Exemplo 1: pirrole \rightarrow pirróis; corrole \rightarrow corróis

Símbolos

Constantes Fundamentais

Símbolo	Nome	Valor
c	Velocidade da luz no vácuo	$2.99792 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$
h	Constante de <i>Planck</i>	$6.626068 \times 10^{-34} \text{ J.s}$
k_B	Constante de <i>Boltzmann</i>	$1.3806503 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$
R	Constante universal dos gases ideais	$8.314472 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$
π	Constante matemática	3.14159265359

Luz, Ondas, Ótica

Símbolo	Nome
c	Velocidade da luz no vácuo
$h\nu$	Incidência de luz/excitação por fotões
n	Índice de refração
ν	Frequência
$\tilde{\nu}$	Número de onda ou frequência (em cm^{-1})

Espetroscopia e Fotoquímica

Símbolo	Nome
a_{ij}	Fatores Pré-Exponenciais
A, Abs	Absorvância
IV	Espetroscopia de Infravermelho
I	Intensidade de luz após passar pela amostra
I_0	Intensidade de luz antes de passar pela amostra
ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
λ	Comprimento de onda (em nm)
$\lambda_{\text{max}}^{S_0 \rightarrow S_n}$	Comprimento de onda máximo de absorção (em nm)
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão (em nm)
$\lambda_{\text{max}}^{S_1 \rightarrow S_0}$	Comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência (em nm)
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação (em nm)
S	Estado eletrónico singuleto
S_n	Estado excitado
S_0	Estado fundamental
S_1	Estado singuleto excitado de mais baixa energia
$S_1 \rightarrow S_0$	Emissão de fluorescência
$S_0 \rightarrow S_n$	Absorção do estado singuleto fundamental S_0 para um estado excitado S_n
$S_{n,\pi^*} \rightarrow T_{\pi,\pi^*}$	Conversão intersistemas singuleto (n,π^*) - tripleto (π,π^*)

Símbolos

T	Estado eletrónico tripleto
T ₁	Estado tripleto de mais baixa energia
T ₁ → S ₀	Emissão de fosforescência
Δ _{SS}	Deslocamento de Stokes (em nm ou cm ⁻¹)
¹ O ₂	Estado molecular do oxigénio singuleto
³ O ₂	Estado molecular do oxigénio tripleto

Física Geral, Instrumental

Símbolo	Nome
A.C.	Função de autocorrelação
<i>E</i>	Energia
<i>m</i>	Massa
<i>t</i>	Tempo
<i>T</i>	Temperatura
<i>V</i>	Volume
ε'	Constante dielétrica
δ	Deslocamento químico (em ppm)
χ ²	Qui-quadrado (parâmetro estatístico referente à “qualidade do ajuste”)

Constantes, Constantes de Velocidade, Tempos de vida e Rendimentos Quânticos

Símbolo	Nome
<i>k_F</i>	Constante cinética de Fluorescência
<i>k_{NR}</i>	Constante cinética dos processos Não-Radiativos
φ _F	Rendimento quântico de emissão de Fluorescência
φ _Δ	Rendimento quântico de formação de Oxigénio Singuleto
τ _F	Tempo de decaimento de Fluorescência

Unidades

Símbolo	Nome
atm	Atmosfera
°C	Celsius (unidade de temperatura)
Hz	Hertz
J	Joule
K	Kelvin (unidade de temperatura)
MHz	Megahertz
min.	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mmol	Milimole
mol	Mole
nm	Nanómetro
ns	Nanosegundo
s	Segundo
W	Watt
μL	Microlitros

Prefixos

Símbolo	Nome	Fator
n	nano	10^{-9}
μ	micro	10^{-6}
m	mili	10^{-3}

Resumo

Em 2020, o cancro do pulmão foi o segundo tipo de cancro mais diagnosticado, assim como o que apresenta uma maior mortalidade. Nas últimas décadas, a Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês, *photodynamic therapy*) tem aparecido como um potencial tratamento para o cancro. A PDT depende de fotossensibilizadores que se acumulam seletivamente nos tumores e induzem citotoxicidade aquando irradiados através da formação de espécies reativas de oxigénio.

Portanto, o desenvolvimento de fotossensibilizadores mais eficientes certamente terá um grande impacto no resultado terapêutico da PDT. Corróis são porfirinóides contraídos com propriedades estruturais, espectroscópicas e fotofísicas únicas, o que faz com que sejam bons candidatos a fotossensibilizadores.

Neste contexto, o grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra desenvolveu, anteriormente, uma síntese inovadora de corróis *trans*-A₂B funcionalizados com um grupo oxima, explorando a reatividade de nitrosoalquenos com dipirrometanos. Assim, o objetivo central deste trabalho é alargar o estudo da reatividade de azoalquenos com dipirrometanos de modo a desenvolver uma nova classe de corróis *trans*-A₂B contendo um grupo hidrazona, nunca antes sintetizados. Além disso, pretendemos também estudar as propriedades fotofísicas dos corróis sintetizados, bem como avaliar o seu potencial *in vitro* como fotossensibilizadores na PDT do cancro do pulmão.

Na primeira parte deste trabalho, é apresentada uma nova abordagem para a síntese de corróis *trans*-A₂B com base na reatividade de azoalquenos. A estratégia sintética envolve a síntese de bilanos através de duas reações consecutivas de hetero-Diels-Alder de azoalquenos gerados *in situ* com dipirrometanos, seguida de macrociclicização oxidativa. Esta nova abordagem permitiu a síntese de onze novos corróis *trans*-A₂B, contendo um grupo hidrazona e diferentes substituintes.

As propriedades fotofísicas foram investigadas para todos os corróis sintetizados. Neste estudo, pretendemos explorar a influência do solvente em tais propriedades dos corróis. Para isso, utilizaram-se como solventes o THF e o DMSO, de modo a cobrir duas constantes dielétricas diferentes ($\epsilon' = 7.58$ e 46.45 , respetivamente). O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) e o tempo de vida de fluorescência (τ_F) foram determinados para cada solvente, observando-se uma forte influência do solvente. Além disso, o rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto

(Φ_{Δ}) foi determinado em THF com resultados que indicam uma potencial aplicação dos novos corróis como fotossensibilizadores.

Os estudos *in vitro* dos corróis sintetizados com base na PDT, foram realizados em linhas celulares de cancro do pulmão, nomeadamente na linha celular A549 e H1299. O ensaio MTT foi utilizado para estudar a viabilidade celular em culturas irradiadas e não irradiadas, de modo a avaliar a fotocitotoxicidade e citotoxicidade no escuro dos corróis. Os resultados *in vitro*, mostraram que todos os corróis apresentam uma elevada fotocitotoxicidade e uma baixa- ou nenhuma- citotoxicidade. Realçando valores de IC_{50} bastante promissores entre 25 e 100 nM.

Os resultados promissores obtidos *in vitro* para os corróis *trans*-A₂B bem como as propriedades fotofísicas dos corróis indicam que estes poderão ser aplicados como fotossensibilizadores em PDT de cancro do pulmão.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, corróis *trans*-A₂B, cancro do pulmão, fotofísica, reação de hetero-Diels-Alder.

Abstract

In 2020, lung cancer was the second most diagnosed cancer, being the leading cause of cancer death. In the last decades, photodynamic therapy (PDT) has been developed as a potential treatment for cancer. PDT relies on photosensitizers that accumulate selectively in tumours and induce cytotoxicity upon irradiation via the generation of reactive oxygen species. Therefore, the development of more efficient photosensitizers will certainly have a huge impact on the therapeutic outcome of PDT. Corroles are contracted porphyrinoids with unique structural, spectroscopic and photophysical properties, which makes them good photosensitizer candidates.

In this context, the Organic Chemistry research group of the University of Coimbra has previously developed an innovative synthesis of *trans*-A₂B-corroles, containing an oxime moiety, by exploring the reactivity of nitrosoalkenes toward dipyrromethanes. Thus, the initial purpose of this work is to develop a novel class of *trans*-A₂B-corroles with an hydrazone moiety, through the exploration of the reactivity of azoalkenes with dipyrromethanes. In addition, we also intend to study the photophysical properties of the synthesized corroles as well as *in vitro* evaluation of its potential use as photosensitizer in PDT of lung cancer.

In the first part of this work, a novel approach to *trans*-A₂B-corroles based on the reactivity of azoalkenes is disclosed. The synthetic strategy involves the synthesis of bilanes via two consecutive hetero-Diels-Alder reactions of *in situ* generated azoalkenes with dipyrromethanes, followed by oxidative macrocyclization. This novel approach allowed the synthesis of eleven new *trans*-A₂B-corroles.

The photophysical properties were investigated to all the synthesized corroles. In this study, we set out to explore the influence of the solvent in the photophysical properties of the corroles. For this, THF and DMSO have been used as solvent, covering two different dielectric constants (ϵ' =7.58 and 46.45, respectively). Quantum fluorescence yield (ϕ_F) and fluorescence lifetime (τ_F) were determined for each solvent, a strong solvent influence was observed. Additionally, quantum yield of oxygen singlet formation (ϕ_Δ) was obtained in THF with results that indicate the great potential of these derivatives as photosensitizers.

In vitro studies of the synthesized corroles based on PDT were carried out in lung cancer cell lines, specifically A549 and H1299 cell lines. The MTT assay has been used to study the cell viability on irradiated and non-irradiated cultures, in order to evaluate the photocytotoxicity and dark

cytotoxicity of corroles. The *in vitro* results showed that all corroles have high photocytotoxicity and low- or non-cytotoxicity.

The promising *in vitro* results obtained for the *trans*-A₂B-corroles together with the photophysical properties of the corroles supports its applicability as photosensitizer in PDT of lung cancer.

Keywords: Photodynamic therapy, *trans*-A₂B-corroles, lung cancer, photophysics, hetero-Diels-Alder reaction.

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1.

1. Introdução

1.1. Câncer do Pulmão

Ao longo da história da humanidade são diversos os relatos da existência de câncer. A evidência mais antiga de tumores malignos em humanos foi encontrada num fóssil na África do Sul com cerca de 1.8-1.6 milhões de anos, que apresentava sinais de osteossarcoma.¹ No que diz respeito aos tumores benignos humanos, a primeira evidência foi datada anteriormente, há cerca de 1.98 milhões de anos atrás.²

Atualmente, o câncer apresenta-se como a principal causa de morte em todo o mundo, representando cerca de 10 milhões de mortes no ano de 2020.^{3,4} De acordo com os dados divulgados pela *World Health Organization*, o câncer do pulmão foi o que apresentou a taxa de mortalidade mais elevada e o segundo com maior incidência a nível mundial.⁴

Ainda que o reconhecimento da existência do câncer tenha ocorrido há milhões de anos atrás, o câncer do pulmão apenas foi reconhecido como uma doença distinta em 1761, mas rapidamente sofreu um grande aumento epidêmico ultrapassando todos os outros tipos de câncer.^{5,6}

Mas a grande questão é, como é que surge o câncer? O câncer é o crescimento de células anormais, que se desenvolve quando o mecanismo de controlo deixa de efetuar devidamente a sua função. Esta deficiência no controlo do crescimento celular vai fazer com que as células cresçam descontroladamente, originando células anormais, que posteriormente podem formar uma massa de tecido, denominada de tumor.⁷ Este tecido tumoral pode ser desenvolvido em qualquer parte do corpo, sendo que o nome que lhe é atribuído corresponde ao local inicial de formação. Como é o caso do câncer do pulmão, que tem origem nos pulmões.

A nível histológico, o câncer do pulmão é dividido em dois tipos: carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC) e carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC).⁸ O CPNPC é o mais comum, representando cerca de 85% de todos os casos, enquanto que o CPPC representa cerca de 15%.⁹ Dentro do CPNPC existem três subtipos histológicos: o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas ou epidermóide e o carcinoma de células grandes (Figura 1.1).⁸

O adenocarcinoma é o tipo de cancro do pulmão mais comum, representando aproximadamente 40% do CPNPC, que se desenvolve nas células epiteliais que revestem as vias aéreas periféricas e apresentam uma rápida metastização para os gânglios linfáticos e outros órgãos.^{10,11} O carcinoma de células escamosas ou epidermóide representa entre 20 a 30% do CPNPC e resultam de um crescimento anormal de células que revestem as vias aéreas dos pulmões, geralmente encontradas perto dos brônquios, e apresentam um crescimento lento.^{10,12} O carcinoma de células grandes é o menos incidente, cerca de 10% e define-se como um CPNPC indiferenciado que não apresenta características de nenhum dos dois subtipos apresentados anteriormente, provocando tumores grandes na zona periférica.

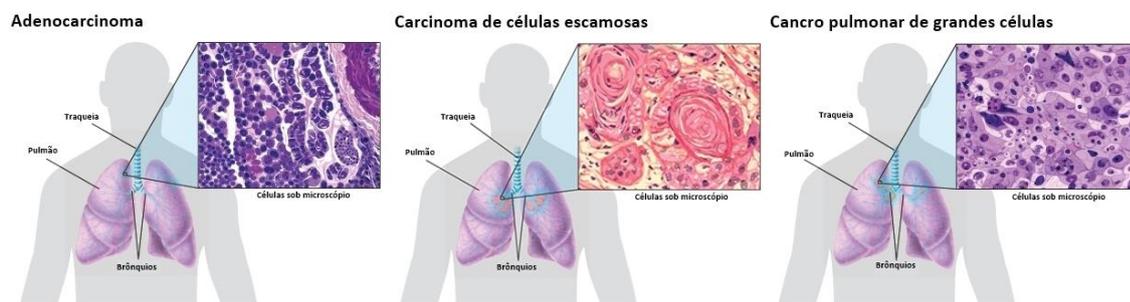


Figura 1.1. Histologia e localização dos diferentes tipos de CPNPC: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e cancro pulmonar de grandes células.

O cancro do pulmão resulta maioritariamente de causas comportamentais e ambientais, no entanto, o risco da doença pode ser uma consequência conjunta da inter-relação entre a exposição a agentes etiológicos e a suscetibilidade individual a esses agentes. Dada a etiologia multifatorial do cancro do pulmão, as interações sinérgicas entre os diversos fatores de risco podem ter consequências substanciais para o desenvolvimento da doença.¹³ Portanto, o aparecimento do cancro do pulmão deve-se a alguns fatores como os comportamentais, os ambientais e os genéticos.

Dentre esses fatores, o tabagismo é o que possui maior impacto no desenvolvimento de cancro do pulmão.¹⁴ Os cigarros são constituídos por mais de 7000 produtos químicos, entre os quais existem cerca de 55 substâncias que foram consideradas cancerígenas pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro, entre eles hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e derivados da nicotina como a 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK, do inglês *nicotine-derived nitrosamine ketone*).^{15,16} A ativação destas substâncias leva à formação de aductos de ADN e caso estes se mantenham sem serem reparados podem levar a uma codificação incorreta e provocar uma mutação permanente.¹⁶ Para além do tabagismo, a dieta faz parte dos fatores comportamentais

que também contribuem para o desenvolvimento de cancro do pulmão. O avanço de muitos estudos científicos sugerem a hipótese de que uma dieta rica em nutrientes antioxidantes podem proteger contra danos oxidativos ao ADN e, portanto, prevenir o desenvolvimento de cancro.¹⁷ A dieta típica do mundo ocidental desenvolvido é constituída por alimentos processados, que contém altos níveis de gordura, o que consequentemente aumenta o risco de desenvolvimento de cancro.¹⁸

A exposição a determinadas substâncias químicas carcinogénicas podem induzir o processo de carcinogénese. Entre estas substâncias temos o dióxido de carbono, proveniente da combustão de combustíveis fósseis, e os metais pesados. Estes últimos originam radicais livres que dada a sua natureza eletrofílica vão levar à formação de aductos com o ADN, sendo este o principal mecanismo de indução da carcinogénese.^{18,19}

A exposição a agentes físicos como a radiação ionizante também se apresenta como um fator de risco, uma vez que esta possui diversos efeitos a nível celular que aumentam a probabilidade de ocorrer mutações genéticas.²⁰ Estes efeitos podem ser provocados direta ou indiretamente. Os efeitos diretos ocorrem aquando a irradiação, que provoca uma quebra nas cadeias de ADN alterando a dupla hélice. Por outro lado, os efeitos indiretos levam à produção de espécies reativas de oxigénio que podem oxidar o material genético, danificando-o.²¹

Ainda que o consumo de tabaco e a poluição atmosférica sejam as principais causas do desenvolvimento de cancro do pulmão, existem vários estudos que demonstram a influência da suscetibilidade genética associada ao mesmo.²² A alteração e mutação de alguns genes específicos, como os genes supressores de tumores e os genes reparadores do ADN, estão na base do processo de carcinogénese.²³ Na grande maioria dos casos de cancro do pulmão, estas mutações ocorrem nas células somáticas e não nas células germinais dos progenitores.²² As mutações mais comuns do CPNCP ocorre nos genes TP⁵³ (proteína tumoral 53, 39%), EGFR (recetor do fator de crescimento epitelial, 31%) e KRAS (do inglês, *Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*, 19%).²⁴

A terapia utilizada para o cancro do pulmão inclui a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, no entanto, a eficiência destas terapias varia consoante o estágio deste tipo de cancro.²⁵ Além disso, mesmo em estágios iniciais, o tratamento é bastante invasivo e requer longos períodos de recuperação.²⁶ Assim, a resistência de alguns tumores aos tratamentos convencionais bem como os efeitos secundários muitas vezes a eles associados tem conduzido os investigadores à procura de novos tratamentos. É aí que surge a Terapia Fotodinâmica (PDT) descoberta há mais de um século.²⁷

1.2. Terapia Fotodinâmica

Há milhares de anos que a luz é reconhecida por fornecer um potencial terapêutico. Há mais de 3000 anos, que na Índia e na Grécia Antiga, a luz tem sido utilizada para o tratamento de várias doenças como o vitiligo, a psoríase e o cancro da pele.²⁸ No final do século XIX, Niels Ryberg Finsen demonstrou com sucesso o uso da fototerapia no tratamento da tuberculose cutânea que resultou no Prémio Nobel de Fisiologia/Medicina em 1903.²⁹

Ainda que a luz seja utilizada para fins terapêuticos há milhares de anos, as primeiras evidências científicas da terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) surgiram apenas no início do século XX por Raab e von Tappeiner. Foi com uma descoberta acidental que estes verificaram numa preparação de paramécias incubadas com determinados corantes, como o laranja de acridina, que estas podiam ser induzidas à morte quando expostas à luz de elevada intensidade.^{30,31} Posteriormente, foi descoberta a importância do oxigénio do ar para que se observasse o efeito mediado pela luz, foi então que surgiu o termo “ação fotodinâmica”. Rapidamente foram realizados os primeiros esforços para o uso desta técnica na terapia do cancro, no entanto as duas guerras mundiais seguintes e o crescimento farmacêutico nas décadas de 1950 e 1960 atrasaram a exploração da PDT.³¹

A PDT é uma forma de terapia moderna e não invasiva que tem sido utilizada com sucesso em dermatologia, oncologia, ginecologia e urologia.³²

1.2.1. Fundamentos da terapia fotodinâmica

A PDT baseia-se na aplicação tópica ou sistémica de um composto fotossensível, o fotossensibilizador (PS, do inglês *photosensitizer*).³³ Posteriormente este fotossensibilizador é ativado localmente, através de um feixe de luz de comprimento de onda adequado, que na presença de oxigénio molecular inicia uma sequência de reações químicas e fotobiológicas que produzem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), capazes de induzir a morte celular.³⁴

A PDT envolve diversos passos, sendo que o primeiro é a administração do fotossensibilizador no doente. Após a entrada do fotossensibilizador, este vai percorrer o suprimento vascular até que seja acumulado no tecido tumoral alvo, sendo este intervalo desde a administração do fotossensibilizador até à acumulação no tecido tumoral alvo denominado de intervalo fármaco-luz (DLI, do inglês *drug-light interval*).³⁵ Este intervalo depende da farmacocinética e da biodistribuição

do fotossensibilizador.³⁶ Posteriormente, há a incidência de luz, de comprimento de onda específico, que ativa o fotossensibilizador localmente, de modo a que ocorram diversas reações químicas que vão destruir o tumor com danos mínimos no tecido saudável.³⁷

Aquando da ativação do fotossensibilizador, isto é, quando o fotossensibilizador absorve um *quantum* de luz com energia apropriada, há a transferência de um eletrão para um estado de maior energia, ocorrendo a passagem do estado fundamental (PS_0) para um estado excitado singuleto de maior energia ($^1PS^*$). Esta espécie é muito instável e pode libertar energia ao emitir luz na forma de fluorescência quando ocorre a passagem de um eletrão do estado excitado para o estado fundamental, por conversão interna quando se dá o relaxamento vibracional e há emissão de energia sob a forma de calor, ou por cruzamento intersistema se o fotossensibilizador passar do estado excitado singuleto a um estado excitado tripleto mais estável.^{38,39} Neste estado tripleto o fotossensibilizador é capaz de transferir energia para moléculas próximas, processo denominado de fotossensibilização, o qual pode ocorrer por dois mecanismos, do Tipo I e do Tipo II (Figura 1.2).⁴⁰

O mecanismo de Tipo I diz respeito à transferência de um eletrão ou hidrogénio do fotossensibilizador no estado tripleto diretamente para um substrato celular, de modo a formar radicais livres (substrato^{-*}). Por sua vez, estes podem reagir com o oxigénio tripleto (3O_2) e água para formar espécies radicalares citotóxicas, frequentemente aniões superóxido, O_2^{*-} e radicais hidroxilo (OH \cdot), respetivamente.⁴⁰ Em sistemas biológicos o anião superóxido é relativamente inócuo, mas pode dar origem a ROS mais citotóxicas.⁴¹ O mecanismo da reação de Tipo II ocorre quando o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia para o estado fundamental do oxigénio molecular (3O_2), produzindo oxigénio singuleto (1O_2), espécie que é altamente oxidativa.⁴²

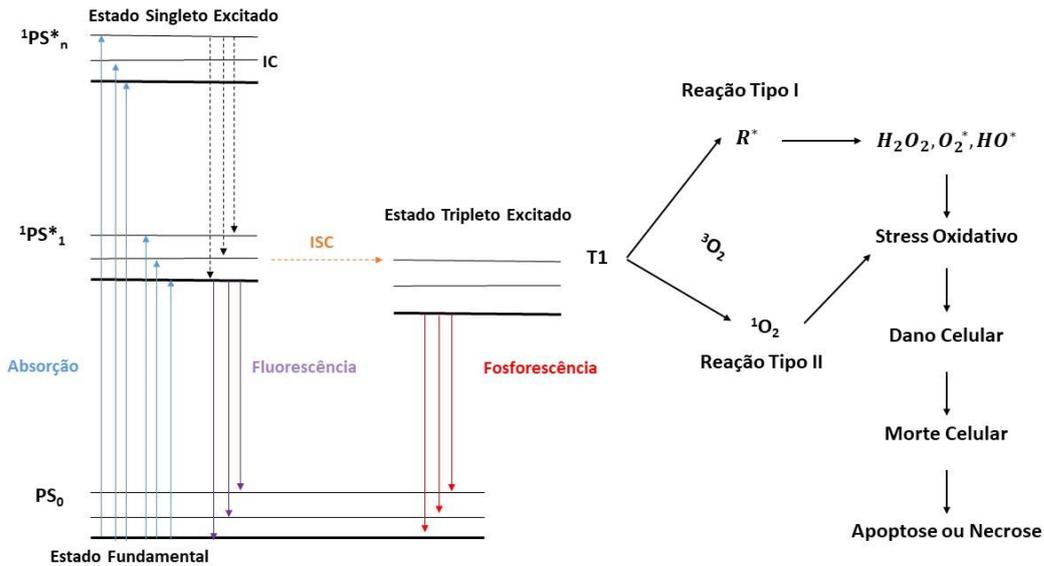


Figura 1.2. Diagrama de Jablonski adaptado.⁴³ Quando o PS é ativado, este passa do estado fundamental singuleto (S_0) para um estado excitado singuleto (S_1-S_n), que é seguido por um cruzamento intersistema para um estado excitado tripleto (T_1), que então leva a formação das espécies reativas de oxigênio via mecanismos de fotossensibilização do tipo I e II. Abreviaturas: IC: conversão interna; ISC: cruzamento intersistema; PS: fotossensibilizador; $^1PS^*$: fotossensibilizador excitado singuleto; T_1 : estado excitado tripleto; R: substrato biológico; R^* : substrato biológico oxidado; 1O_2 : oxigênio singuleto; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; O_2^* : superóxido; HO^* : radical hidroxilo.

O mecanismo do tipo II é o que ocorre preferencialmente na PDT, dado que é o mecanismo mais simples e geralmente o mais termodinamicamente favorável ao fotossensibilizador.³⁵ Dada a sua reatividade, o oxigênio singuleto tem um tempo de vida curto e uma distância de difusão limitada em ambientes biológicos, o que conseqüentemente provoca um dano celular principalmente na vizinhança imediata da localização do fotossensibilizador. No entanto, esta característica depende do tipo celular e do tipo de fotossensibilizador utilizado.³⁹

1.2.2. Componentes ativos da terapia fotodinâmica

A PDT utiliza a combinação de uma fármaco fotossensibilizador com a luz de modo a causar um dano seletivo no tecido alvo, sendo também necessária uma concentração adequada de oxigênio molecular para causar danos nos tecidos. Estes são os três componentes da PDT, cuja conjugação é a chave para a eficácia da PDT e na ausência de qualquer um deles o efeito pretendido não irá ocorrer.⁴⁴

1.2.2.1. Luz

Como referido anteriormente, a luz faz parte dos componentes principais da PDT. Luz de comprimento de onda entre os 600 e os 800 nm é idealmente utilizada em PDT, uma vez que este intervalo de comprimentos de onda é frequentemente chamada de janela terapêutica.⁴⁵ A janela terapêutica utilizada é ideal devido à profundidade de penetração da luz nos tecidos nestes comprimentos de onda, uma vez que a profundidade de penetração é de 5-6 mm aos 700-800 nm, 2-3 mm aos 630 nm, 1 mm aos 500 nm e inferior a 0,5 mm aos 400-430 nm de comprimento de onda (Figura 1.3).⁴⁶ Comprimentos de onda superiores a 800 nm não são utilizados devido à ineficiência de geração de oxigênio singuleto.⁴⁷

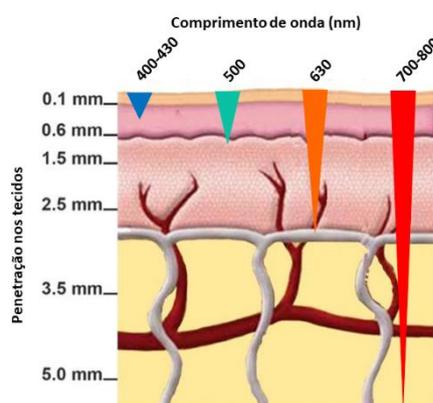


Figura 1.3. Penetração da luz nos tecidos em função do comprimento de onda.

Para além do comprimento de onda ideal, é também fundamental compreender a propagação da luz através dos tecidos assim como os efeitos associados aos processos de refração, reflexão, absorção e dispersão. Como em quaisquer dois meios distintos, com incompatibilidade de índice de refração é observado o efeito de reflexão e refração da luz, o mesmo se verifica em sistemas biológicos. Além destes efeitos, a luz incidente ao sofrer dispersão, vai sofrer uma redução de intensidade. Já a absorção da luz deve-se principalmente a moléculas existentes nos tecidos como a hemoglobina, a mioglobina e citocromos. Assim, quando ocorre a absorção da luz vai haver uma competição entre o fotossensibilizador e estas moléculas, o que pode diminuir o processo fotodinâmico.⁴⁶

Outra característica importante a ter em conta é a fonte de luz utilizada. As principais fontes de luz utilizadas incluem lasers, díodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light-emitting diode*) e lâmpadas.

As lâmpadas foram as primeiras fontes de luz utilizadas em PDT. Dado o largo espectro que a luz gerada pelas lâmpadas possuem (300-1200 nm de comprimento de onda), existe a necessidade de efetuar uma filtragem óptica, de modo a haver uma compatibilidade com a banda de absorção do fotossensibilizador, bem como a remoção de comprimentos de onda desnecessários. Para além desta adaptação, uma desvantagem da utilização de lâmpadas em PDT reside no facto destas apenas poderem ser utilizadas em locais de fácil acesso, como a pele ou a cavidade oral.⁴⁸

Os lasers são a fonte de luz mais utilizada em PDT. Estes produzem luz homogénea e com comprimentos de onda que podem ser controlados para fotossensibilizadores específicos. Ao contrário das lâmpadas, os lasers podem não só ser utilizados em locais de fácil acesso mas também aos mais inacessíveis. Existem vários tipos de laser, sendo que os lasers de díodo são os mais comuns para a PDT. Os lasers de díodo apresentam várias vantagens, como o facto de serem leves e compactos, terem um custo inferior a outros tipos de laser, não necessitarem de um sistema de refrigeração externo e serem mais fiáveis.⁴⁹

Os LEDs apresentam uma largura espectral mais ampla quando comparados com os lasers de díodo, o que provoca uma redução da eficiência de absorção pelo fotossensibilizador. No entanto, uma vantagem da utilização desta fonte de luz é o facto deste ser barato e portátil, o que permite o tratamento em regiões carentes de eletricidade.⁵⁰

1.2.2.2. Oxigénio

O oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) é um estado eletronicamente excitado do oxigénio molecular, que desempenha uma função fundamental no processo da PDT.⁵¹ Este é na maior parte dos casos a ROS mais importante neste processo. A importância desta espécie deve-se às suas características químicas, em particular a capacidade de oxigenar grupos funcionais. Quando ocorre a produção desta espécie a nível celular, esta pode levar à apoptose celular ou até mesmo provocar danos locais suficiente para levar à morte por necrose.⁵²

Ainda não existe um consenso na comunidade científica no que diz respeito ao tempo de vida do oxigénio singuleto em sistemas biológicos. Alguns investigadores defendem que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em sistemas celulares é aproximadamente o tempo de vida em água pura ($\approx 3.0 \mu\text{s}$), no entanto, a maioria defende que o seu valor seja substancialmente inferior devido à interação com diversas macromoléculas.^{53,54} Mais recentemente, foi possível a avaliação da fosforescência, percebendo-se então que o tempo de vida intracelular do oxigénio singuleto apresenta valores que

rondam entre 600 ns e 3 μ s; valores que por sua vez correspondem a um coeficiente de difusão de 2 a 4×10^{-6} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, ou seja, um raio de ação de cerca de 100 nm.^{54,52,53,55} Apesar de não haver um total consenso em relação ao raio de ação do oxigénio singuleto, sabe-se que o dano fotodinâmico irá ocorrer próximo da localização intracelular do fotossensibilizador administrado, o que faz desta terapêutica uma técnica seletiva.⁵⁶

A hipoxia tumoral é uma consequência típica da PDT, que pode ocorrer de forma direta ou indireta, pelo consumo de oxigénio durante o tratamento ou pela destruição da vascularização tumoral, respetivamente. Demonstrou-se que a baixa concentração de oxigénio ou tumores em condição de hipoxia, levam a reações fotodinâmicas menos eficazes ou até mesmo à resistência à PDT. Este facto, vem reforçar que a presença de oxigénio no tumor é fundamental para que ocorram reações fotodinâmicas.^{57,58}

1.2.2.3. Fotossensibilizador

Um dos componentes principais da PDT é também o fotossensibilizador. A eficiência da PDT depende bastante das características do fotossensibilizador, estas devem ter em conta diversos critérios como ser uma molécula pura e estável, não apresentar citotoxicidade no escuro, apresentar propriedades de absorção e coeficiente de absorvidade molar na região de comprimento de onda entre os 650-800 nm, distribuição, metabolismo e excreção ideais, apresentar um alto rendimento quântico de geração de oxigénio moléculas, seletividade tumoral e um processo de síntese fácil.⁵⁹

Nos últimos anos foram alcançadas muitas conquistas ao nível dos fotossensibilizadores utilizados em PDT. Havendo assim 3 classes mais importantes de fotossensibilizadores testados até agora, os de primeira, segunda e terceira geração.

A primeira geração inclui os derivados de hematoporfirina (HpD). A hematoporfirina (Hp) é uma mistura complexa de compostos porfirínicos e foi a primeira a ser utilizada como fotossensibilizador. O primeiro fotossensibilizador clinicamente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), é comercialmente conhecido como *Photofrin*[®] (Figura 1.4, 1.1). No entanto, apesar de terem uma ampla utilização no tratamento de diversos cancros, os fotossensibilizadores de primeira geração apresentam inúmeras desvantagens. Estes fotossensibilizadores apresentam uma baixa pureza química, assim como um comprimento de onda de ativação abaixo de 640 nm, que limitam uma

boa penetração da luz nos tecidos. Para além destas duas características, estes fotossensibilizadores apresentam um tempo de vida longo, o que leva a que os doentes tratados com estes fotossensibilizadores tenham que permanecer num local isolado de luz por até 6 semanas.⁶⁰

De modo a superar as limitações verificadas nos fotossensibilizadores de primeira geração, foram levadas a cabo investigações para desenvolver novos fotossensibilizadores com o objetivo de melhorar a sua eficácia. Os fotossensibilizadores de segunda geração consistem em compostos sintéticos puros com um macrociclo aromático, tais como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas. No caso das clorinas, a temoporfina (**1.2**) (*Foscan*[®]), foi aprovada na União Europeia para o tratamento de cancros na cabeça e pescoço. A mono-*L*-aspartilclorina e6 (**1.3**) (*Laserphyrin*[®]), foi aprovada no Japão para o tratamento de cancro do pulmão. O derivado monoácido do tipo benzoporfirina (**1.4**) (*Visudyne*[®]), foi aprovado para a degeneração macular associada ao envelhecimento. O complexo de estanho (IV) da etiopurpurina de etilo (**1.5**) (*Purlytin*[®]), encontra-se em fase de avaliação para o tratamento de adenocarcinoma da mama, sarcoma de Kaposi e carcinoma basocelular da pele. Já nas bacterioclorinas com resultados promissores como fotossensibilizadores para a PDT existem os complexos de paládio das bacteriofeoforbidas (**1.6**) (*Tookad*[®]), testado para o tratamento de cancro da próstata (Figura 1.4).⁶¹

Comparativamente com os fotossensibilizadores de primeira geração, os de segunda geração apresentam um comprimento de onda de ativação em comprimentos de onda entre 650-800 nm, permitindo uma melhor penetração da luz nos tecidos. Estes fotossensibilizadores apresentam um processo de eliminação mais rápido, o que possibilita uma redução do tempo de isolamento dos pacientes à luz para menos de 2 semanas. Ainda assim, os fotossensibilizadores de segunda geração apresentam uma desvantagem no que diz respeito à sua baixa solubilidade. Esta característica faz com que haja uma agregação molecular e conseqüentemente uma diminuição do rendimento de produção de ROS.^{60,33}

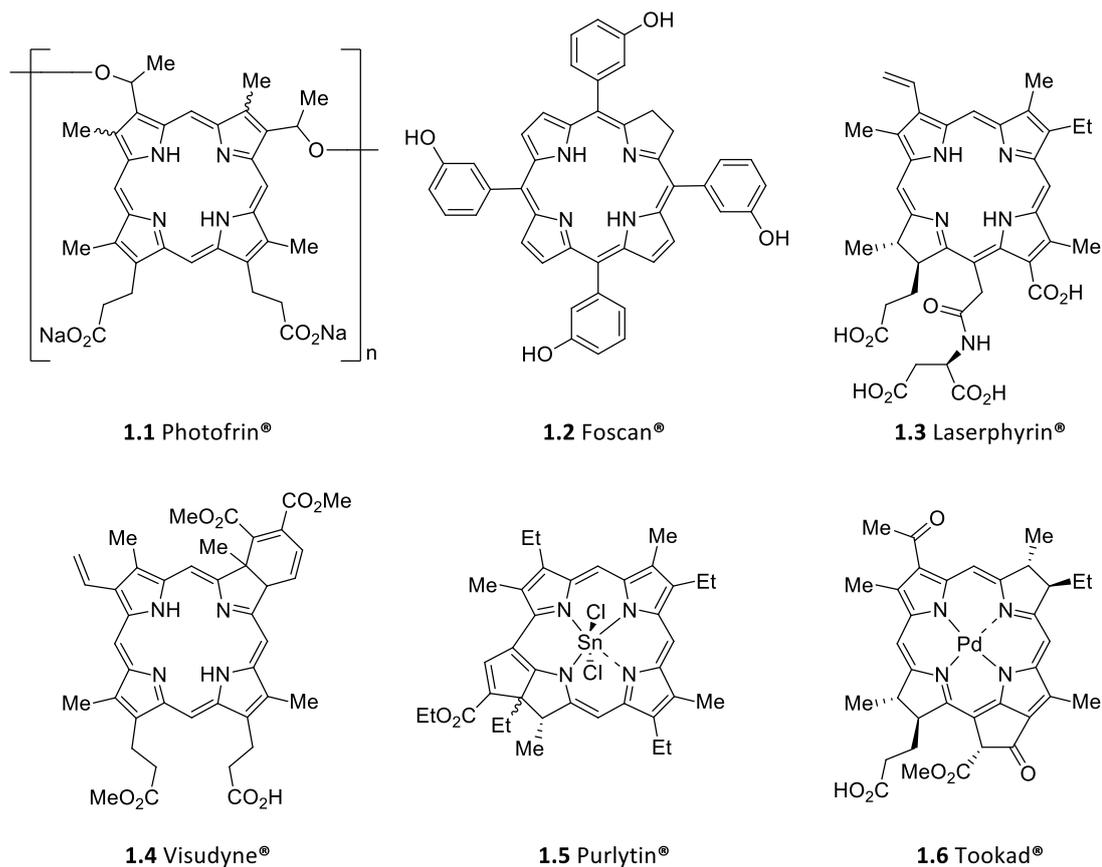


Figura 1.4. Estrutura dos fotossensibilizadores aprovados em PDT ou em fase de avaliação clínica.

O desenvolvimento de fotossensibilizadores de terceira geração têm como principal objetivo a síntese de estruturas com uma maior afinidade para as células-alvo. Contudo, estes fotossensibilizadores ainda se encontram em desenvolvimento.

1.3. Corróis

No início do século XX, a anemia perniciosa era uma das principais causas de morte no Norte da Europa. Esta devia-se a uma carência de fator intrínseco, uma substância que permite a absorção de vitamina B₁₂ no organismo. Em 1920, George Whipple estudou a influência da ingestão de diversos alimentos na regeneração de hemoglobina em cães com anemia, concluindo que o fígado cru era o alimento que permitia uma maior regeneração. Mais tarde, Minot e Murphy utilizaram a mesma metodologia para avaliar a sua eficiência em anemia perniciosa, verificando que a ingestão de fígado cru também curava a anemia perniciosa.⁶²

Após o sucesso verificado na utilização do fígado cru, alguns investigadores tentaram isolar o complexo presente no fígado responsável por este efeito. No final de 1940, Folkers e colaboradores conseguiram isolar um pigmento cristalino do fígado, chamando-o de vitamina B₁₂.⁶³ A vitamina B₁₂ e os seus derivados foram classificados como cobalaminas, uma classe de complexos octaédricos de Co (III).⁶⁴

As cobalaminas possuem uma estrutura complexa baseada num anel de corrina. Possuem uma estrutura plana com um núcleo tetrapirrólico, que contém um átomo de cobalto ligado a 4 átomos de azoto. Este átomo de cobalto pode estar ligado a diferentes grupos aniónicos, originando diferentes formas de cobalaminas, como cianocobalamina, hidroxicobalamina, adenosilcobalamina, metilcobalamina, nitritocobalamina, aquocobalamina e sulfitecobalamina.⁶⁴

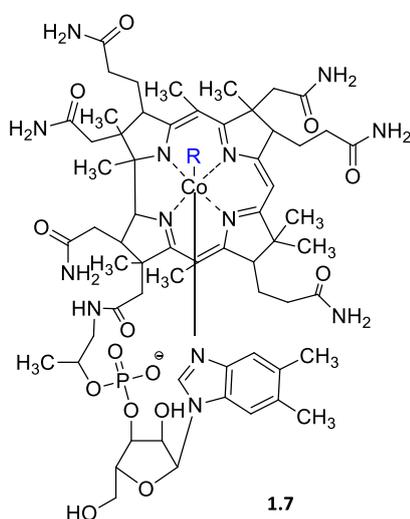


Figura 1.5. Representação da estrutura da cobalamina.

1.3.1. Estrutura e propriedades gerais

Os corróis são macrociclos tetrapirrólicos da família das porfirinas, que nas últimas décadas têm despertado muita atenção, nomeadamente como candidatos promissores para PDT.⁶⁵ Estes possuem a aromaticidade das porfirinas e a estrutura base das corrinas (Figura 1.6). Enquanto que nas porfirinas as quatro unidades pirrólicas se encontram ligadas por meio de quatro pontes de *meso*-carbonos, nos corróis existe uma ligação direta pirrole-pirrole.^{66,67}

Apesar da diferença ao nível do esqueleto molecular, os corróis, tal como as porfirinas, apresentam um sistema aromático de 18 eletrões π .⁶⁸ O esquema de numeração IUPAC dos corróis deriva das porfirinas, sendo que a diferença entre eles é a eliminação do carbono 20 das porfirinas.

As posições 5, 10 e 15 são designadas por posições *meso* e as 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são designadas posições β -pirrôlicas. No interior do macrociclo existem três átomos de nitrogénio do tipo amina e um do tipo imina. Ainda que haja a eliminação do carbono 20, estes átomos de nitrogénio mantêm a mesma numeração que as porfirinas (21 a 24) (Figura 1.6).⁶⁹

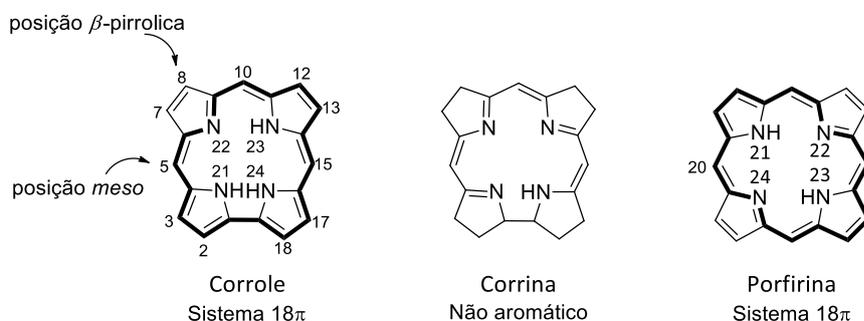
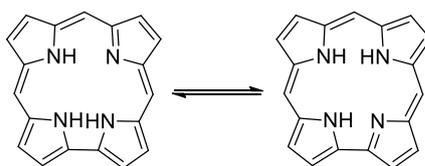


Figura 1.6. Representação da estrutura do corrole, corrina e porfirina.

A presença de três prótons NH no núcleo do macrociclo do corrole e a sua assimetria inerente, levantam muitas questões no que diz respeito ao seu mecanismo de tautomerização. A partir de cálculos quânticos, verificou-se que a barreira energética de tautomerização do corrole é inferior à da porfirina $2,45 \text{ Kcal mol}^{-1}$ e 17 Kcal mol^{-1} , respetivamente, e, conseqüentemente, a troca protónica ocorre de forma mais rápida (Esquema 1.1). Esta característica possibilita a deteção dos dois tautómeros, independentemente dos grupos substituintes periféricos.⁷⁰



Esquema 1.1. Tautomerização do corrole.

Existem várias classes de corróis como os corróis β -substituídos, *meso*-substituídos, *meso*- β -substituídos, dímeros de corróis conjugados, isocorróis e corróis com o núcleo modificado.

Os corróis *meso*-substituídos podem ser divididos em três grupos distintos. Os corróis que possuem três substituintes iguais nas três posições *meso* são chamados de corróis- A_3 . Corróis com dois substituintes iguais nas posições 5 e 15 e um substituinte diferente na posição 10 denominam-se corróis *trans*- A_2B . Corróis com dois substituintes iguais nas posições 5 e 10 e um substituinte

diferente na posição 15 denominam-se corróis *cis*-A₂B. Os corróis que possuem três substituintes diferentes nas três posições *meso* designam-se corróis-ABC (Figura 1.7).⁷¹

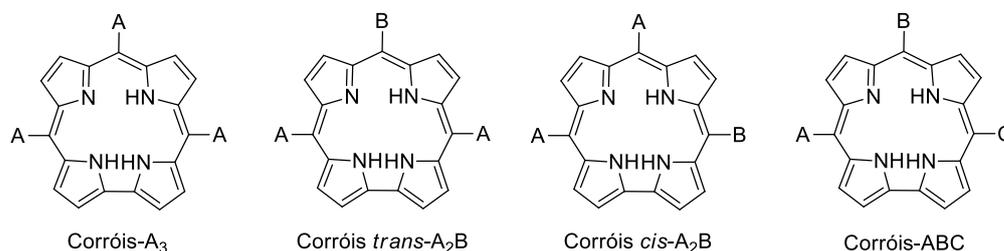


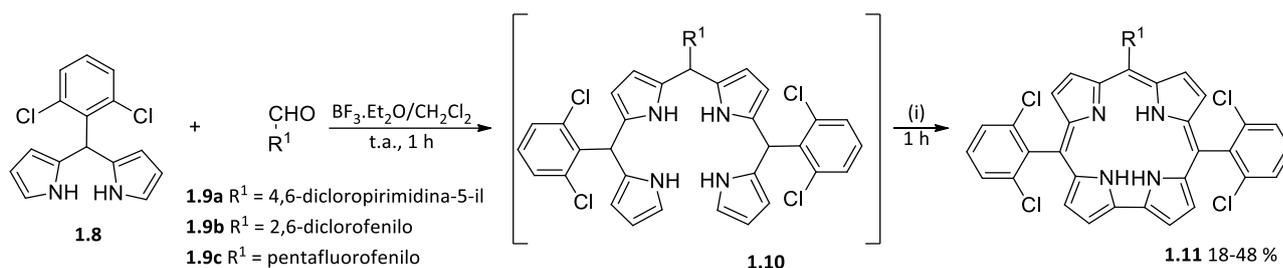
Figura 1.7. Tipos de corróis *meso*-substituídos.

No que diz respeito às propriedades fotofísicas dos corróis, o espectro de absorção destes apresenta transições eletrónicas bastante semelhantes às observadas nas porfirinas. Na faixa dos 400-450 nm de comprimento de onda é comum observar uma banda de alta intensidade, chamada de banda Soret ou banda B. São também observadas outras bandas de menor intensidade (bandas Q).⁷² No entanto, existem duas principais diferenças entre estes macrociclos, uma vez que o efeito dos substituintes nas propriedades dos corróis é significativamente superior do que nas porfirinas e a absorção nos corróis varia consoante o solvente, quando nas porfirinas apenas se observam pequenas mudanças.⁷³ A baixa simetria dos corróis também confere uma divisão da banda Soret, devido à resolução das transições polarizadas x e y, algo que raramente é observado nas porfirinas.⁷⁴

1.3.2. Síntese de corróis

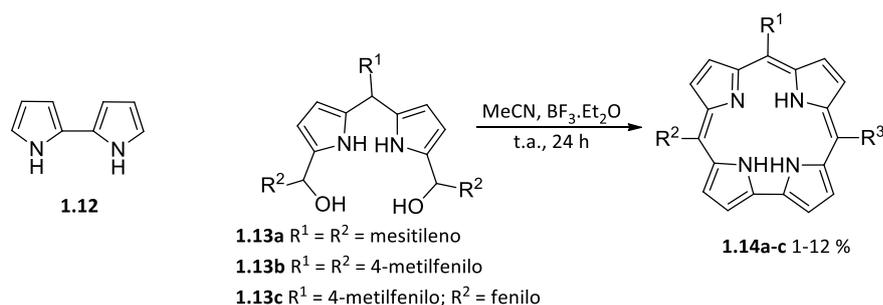
1.3.2.1. Metodologia sintética clássica

A síntese clássica de corróis *trans*-A₂B a partir da reação entre pirrole com aldeídos, segue a estratégia de síntese utilizada por Lindsey na síntese de porfirinas *trans*-A₂B₂.⁷⁵ Gryko em 2000, propôs a síntese de um corrole *trans*-A₂B sem um catalisador ácido a partir da reação entre um dipirrometano e um aldeído, embora com rendimentos baixos.⁷⁶ Mais tarde Brückner e colaboradores, descreveram que a utilização de dipirrometanos com aldeídos aromáticos, com uma proporção 6:1, na presença de TFA, seguida da adição de DDQ origina corróis *trans*-A₂B com rendimentos entre os 20 e os 40%.⁷⁷ Dehaen e colaboradores descreveram a síntese em duas etapas a partir de dipirrometanos e aldeídos. A reação catalisada por BF₃.Et₂O, do dipirrometano **1.8** com os aldeídos aromáticos **1.9**, seguida de ciclização oxidativa, originou corróis *trans*-A₂B **1.11** com rendimentos entre 18 e 48 % (Tabela 1.1).⁷⁸

Tabela 1.1. Síntese de corróis descrita por Dehaen e colaboradores.⁷⁸


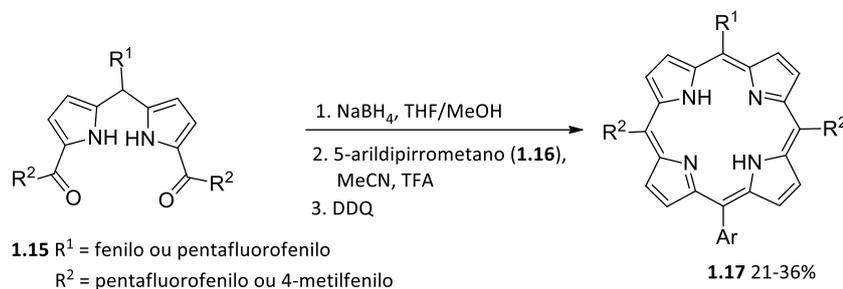
Reação	Aldeído	Razão	(i)	1.11
1	1.9a	1:1	Cloranil, refluxo	25%
2	1.9a	2:1	Cloranil, refluxo	25%
3	1.9b	2:1	EtCN, NH_4Cl , DDQ, t.a.	48%
4	1.9c	2:1	EtCN, NH_4Cl , DDQ, t.a.	18%

Para a síntese de compostos a partir da utilização de dipirrometanos-dióis (Tabela 1.2), Collman e Decréu fizeram reagir dipirrometanos-dióis **1.13** com 2,2'-bipirrole (**1.12**). Os corróis **1.14** foram obtidos com rendimentos de 6-12% usando $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ como catalisador em acetonitrilo. A utilização do dipirrometano **1.13c** em que o grupo meso R^1 é diferente do grupo R^2 permitiu a obtenção do corrole trans- A_2B **1.14c** com 12% de rendimento.⁷⁹

Tabela 1.2. Síntese de corróis descrita por Collman e Decréu.


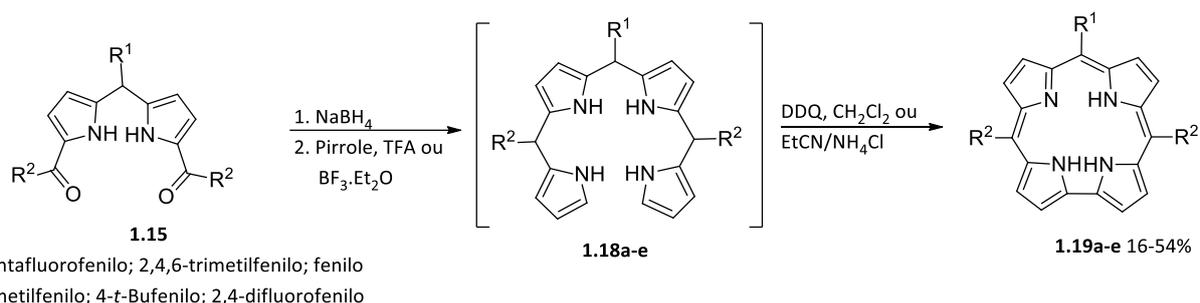
Reação	1.13	1.14
1	1.13a	1.14a 12.0%
2	1.13b	1.14b 6.2%
3	1.13c	1.14c 8.1%

Em 2000, Lindsey e colaboradores descreveram a utilização de dipirrometano dióis preparados pela redução de diacilo-dipirrometanos **1.15** que reagem com os 5-arildipirrometanos **1.16** para formar porfirinas (**1.17**) com rendimentos entre 21 e 36% (Esquema 1.2).⁸⁰



Esquema 1.2. Síntese de porfirinas a partir de diacildipirrometanos.

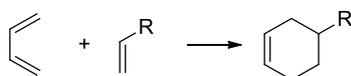
Gryko e Guilard, em 2002, utilizaram a estratégia de Lindsey para a síntese de corróis *trans*-A₂B, fazendo reagir os diacilo-dipirrometanos **1.15** com pirrole, obtendo os bilanos **1.18**, que podem ser oxidados aos respectivos corróis **1.19**, com rendimentos entre 16 e 54% (Esquema 1.3).⁸¹



Esquema 1.3. Síntese de corróis a partir de diacilo-dipirrometanos, utilizando a estratégia sintética de Lindsey.

1.3.2.2. Nova metodologia sintética via reação de hetero-Diels-Alder

Em 1928, estudos desenvolvidos por Otto Diels e Kurt Alder deram origem à reação de Diels-Alder, uma ciclo-adição [4π+2π], que mais tarde lhes valeu o prémio Nobel da Química, em 1950.⁸² Nesta reação ocorre a formação de um anel de seis membros através da interação entre um dieno e um dienófilo (Esquema 1.4).⁸³

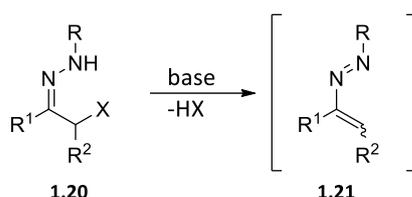


Esquema 1.4. Reação entre um dieno e um dienófilo.

A reação de Diels-Alder é descrita como um processo concertado onde é conservada a simetria orbital, sem a formação de intermediários.⁸⁴ Esta reação pode ser classificada em diferentes tipos com base na teoria das orbitais de fronteira, reação de Diels-Alder do tipo normal, neutro ou inverso. A reação de Diels-Alder do tipo normal ocorre quando estão presentes dienos ricos em elétrons e dienófilos deficientes em elétrons, havendo a interação entre as orbitais fronteira HOMO do dieno e LUMO do dienófilo. Por outro lado, as reações do tipo inverso ocorrem entre dienos deficientes em elétrons e dienófilos ricos em elétrons, sendo que estas ocorrem através da interação entre as orbitais fronteira LUMO do dieno e HOMO do dienófilo.⁸⁵

A reação de Diels-Alder pode ser classificada como homo- ou hetero-Diels-Alder, correspondendo a denominação de reação hetero-Diels-Alder a cicloadições envolvendo dienos e/ou dienófilos contendo heteroátomos.⁸⁶

O método mais comum para a geração de azoalquenos é através da desidro-halogenação, promovida por uma base, de α -halo-hidrazonas (Esquema 1.5).⁸⁷

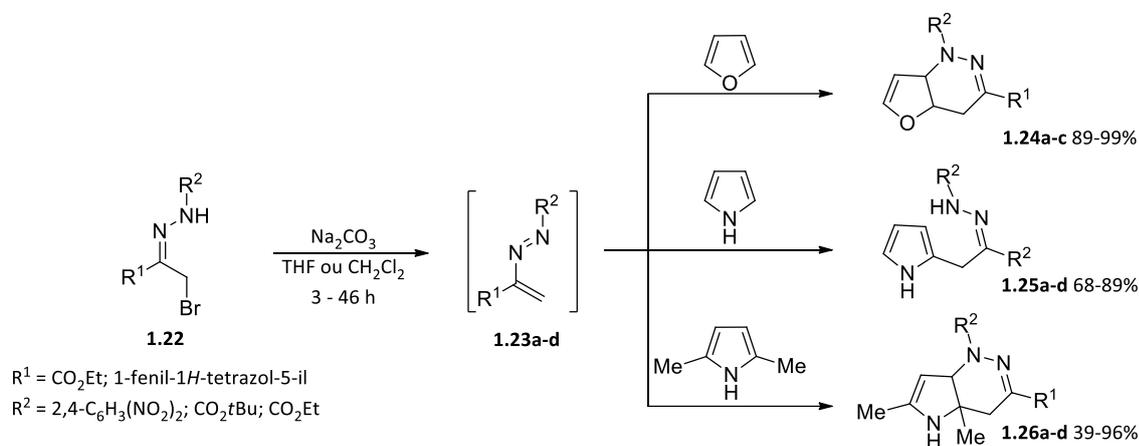


Esquema 1.5. Desidro-halogenação de α -halohidrazonas.

Os azoalquenos devido à presença de dois átomos de nitrogénio apresentam um carácter eletrofílico aumentado pela presença de substituintes atratores de elétrons, que permite que participem em reações de hetero-Diels-Alder como dienos, mas também podem atuar como aceitadores de Michael em reações de adição conjugada. Em reações de ciclo-adição $[4\pi+2\pi]$, estes atuam como heterodienos e reagem preferencialmente com alquenos e heterociclos ricos em elétrons, através da reação de Diels-Alder do tipo inverso. Os cicloadductos gerados através desta interação, são obtidos geralmente com uma regioselectividade e estereoselectividade elevada através da interação entre a LUMO do azoalqueno e a HOMO do dienófilo.⁸⁸

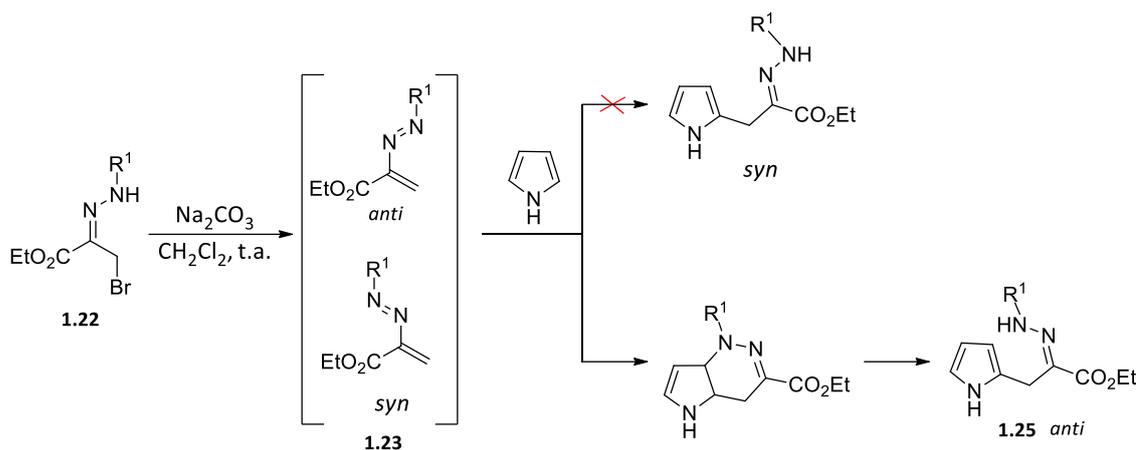
A reação de hetero-Diels-Alder de azoalquenos com dienófilos distintos é amplamente estudada na literatura, incluindo heterociclos aromáticos, tais como o furano, o pirrole, o 2,5-dimetilpirrole e o indole.

Em 1991, Clarke descreve a reatividade de diferentes azoalquenos com o furano e com o pirrole, originando produtos com bons rendimentos 92-99% (**1.24a** e **1.24b**) e 75% (**1.25**), respectivamente.⁸⁹ Em 1993, Gilchrist descreve a reatividade de azoalquenos substituídos na posição 3 (R^1) com um grupo CO_2Et com diferentes dienófilos, entre eles o pirrole e o 2,5-dimetilpirrole, onde obteve os produtos com rendimentos de 75-89% (**1.25c** e **1.25a**) e 91-96% (**1.26c** e **1.26a**), respectivamente.⁹⁰ Mais tarde, Pinho e Melo e colaboradores também estenderam a reatividade de azoalquenos, fazendo reagir a α -halo-hidrazona (**1.22**) com um grupo substituinte tetrazole (R^1 = 1-fenil-1H-tetrazol-5-il; R^2 = CO_2tBu) (**1.22**) e diversos dienófilos, entre eles o furano, o pirrole e o 2,5-dimetilpirrole, originando produtos com rendimentos de 89% (**1.24d**), 68% (**1.25d**) e 39% (**1.26d**).⁹¹ (Esquema 1.6)



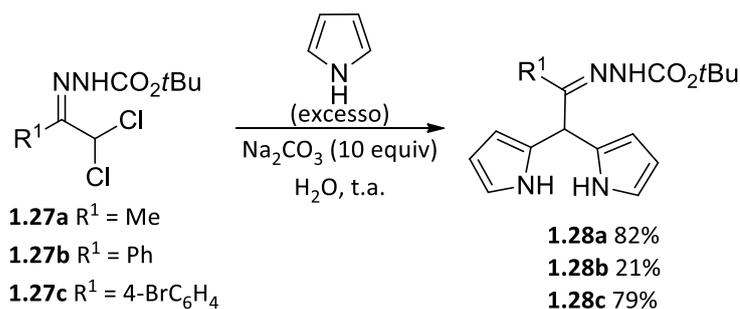
Esquema 1.6. Reatividade de diferentes azoalquenos com o furano, pirrole e 2,5-dimetilpirrole.

Ao contrário do que é verificado na reação do azoalqueno com o furano e com o 2,5-dimetilpirrole, a reação com o pirrole origina compostos de cadeia aberta. Tais resultados foram aprofundados por Gilchrist. A reação ocorre em condições suaves, na hipótese de se tratar de uma reação de adição conjugada ambos os isômeros *syn* e *anti* poderiam ser formados. No entanto, no caso de ocorrer uma reação de Diels-Alder, com subsequente abertura do anel, apenas o isômero *anti* seria obtido. Para reforçar esta afirmação, na reação entre o azoalqueno **1.23** e pirrole houve evidências da formação de um intermediário cíclico, antes da abertura de anel. Assim, Gilchrist e colaboradores concluem que se trata de uma reação de ciclo-adição e não de adição conjugada (Esquema 1.7).⁹⁰



Esquema 1.7. Estudo de Gilchrist e colaboradores.

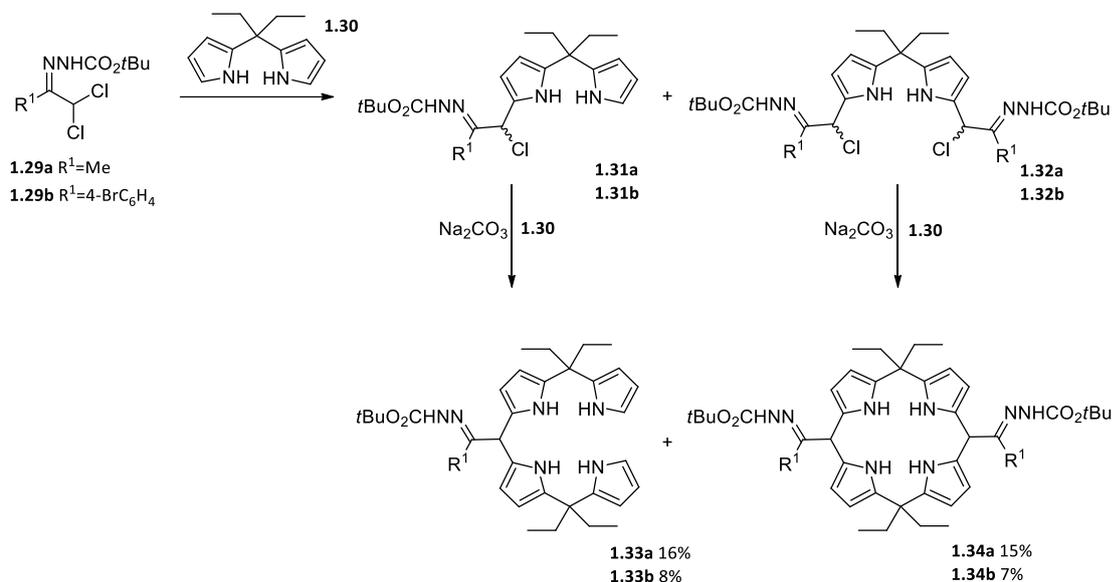
Pinho e Melo e colaboradores exploraram a reação de hetero-Diels-Alder de azoalquenos com pirrole para a síntese de dipirrometanos substituídos na posição *meso* com um grupo hidrazona. Na abordagem sintética utilizada ocorre uma primeira desidro-halogenação mediada por base das hidrazonas α,α -di-halogenadas **1.27**, que reagem com o pirrole. Após a reação, o pirrole recupera a aromaticidade originando o produto de cadeia aberta. A cadeia lateral deste primeiro produto sofre eliminação de outra molécula de HX formando um novo azo-alqueno capaz de participar em mais uma reação de hetero-Diels-Alder com outra molécula de pirrole, formando o dipirrometano (Esquema 1.8). As condições de reação foram testadas em diclorometano, sem solvente e em água, sendo que as que originaram compostos com rendimentos mais elevados ocorreram em água.⁹²



Esquema 1.8. Síntese de dipirrometanos substituídos na posição *meso* com um grupo hidrazona.

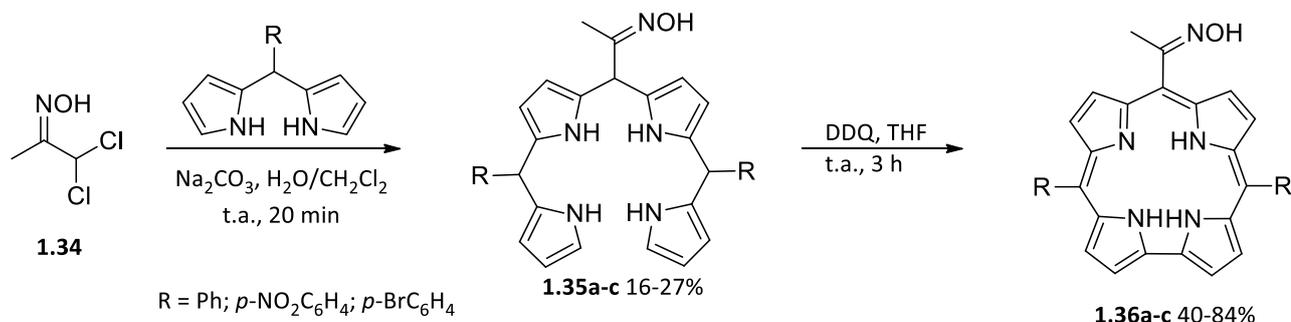
Conseguida a funcionalização de dipirrometanos, Pinho e Melo e colaboradores investigaram a possibilidade de síntese de macrociclos tetrapirrólicos através da reação de bis-hetero-Diels-Alder. Tal como na reação com o pirrole, a desidro-halogenação das hidrazonas α,α -dihalogenadas, permitem a reação com o dipirrometano **1.30**, o que consequentemente origina bilanos (**1.33**) e

calix[4]pirróis (**1.34**) (Esquema 1.9). Os bilanos resultam da mono-alkilação inicial do dipirrometano seguida de uma nova desidro-halogenação e reação de hetero-Diels-Alder com uma segunda molécula de dipirrometano enquanto que a síntese dos calix[4]pirróis tem como composto intermediário dipirrometanos di-alkilados. Os melhores rendimentos foram obtidos em diclorometano como solvente, durante 16 h.⁹³



Esquema 1.9. Síntese de macrociclos tetrapirrólicos através da reação de bis-hetero-Diels-Alder.

Recentemente, Pinho e Melo e colaboradores descreveram a síntese de novos corróis *trans*-A₂B explorando a reatividade de dipirrometanos e nitrosoalquenos. A estratégia sintética desenvolvida baseou-se na síntese de bilanos **1.35** através de duas reações de hetero-Diels-Alder consecutivas de α,α -dihalo-oximas **1.34** com os dipirrometanos **1.33**, com rendimentos entre 16 e 27%. A macrociclicação oxidativa destes bilanos originou os novos corróis *trans*-A₂B **1.36**, com bons rendimentos 40-84% (**1.36**) (Esquema 1.10).⁹⁴



Esquema 1.10. Síntese de corróis utilizando uma nova estratégia sintética através da reação de dipirrometanos e dihalo-oximas.

1.4. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver uma nova classe de corróis *trans*-A₂B, dos quais nada se sabe quanto às suas propriedades fotofísicas e às suas possíveis aplicações.

De modo a concretizar o objetivo geral, a primeira etapa passa pelo desenvolvimento de novos derivados bilanos e corróis, através da reação de hetero-Diels-Alder de azoalquenos, gerados *in situ* a partir de dihalo-hidrazonas, com dipirrometanos. Os novos corróis contendo um grupo hidrazona serão obtidos por macroclicização dos novos bilanos.

Concluída a síntese dos corróis, a segunda etapa será avaliar as suas potencialidades como fotossensibilizadores através da sua caracterização fotofísica e posteriormente a realização de estudos *in vitro* para avaliar a sua aplicabilidade como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica do cancro do pulmão.

De modo a atingir este objetivo geral, o passo inicial passa pela síntese destes novos corróis *trans*-A₂B que contêm um grupo hidrazona (Figura 1.8).

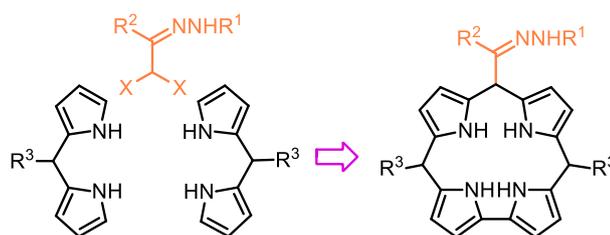


Figura 1.8. Corróis *trans*-A₂B com uma porção hidrazona.

Capítulo 2

Síntese Química

Capítulo 2.

2. Síntese Química

2.1. Síntese de dipirrometanos e α,α -dicloro-hidrazonas

Com o intuito de obter novos compostos tetrapirrólicos via reação hetero-Diels-Alder, é necessária uma síntese prévia de dipirrometanos e α,α -dicloro-hidrazonas. As hidrazonas funcionam como precursores dos intermediários azoalquenos, que vão atuar como dienos. Posteriormente estes irão reagir com os dipirrometanos, que atuam como dienófilos na reação de hetero-Diels-Alder.

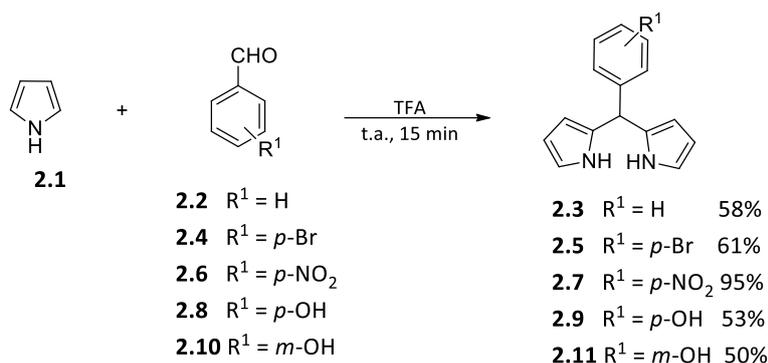
Os dipirrometanos são blocos de construção com elevada importância para a síntese de compostos porfirínicos e análogos tais como os corróis, as clorinas, os BODIPYs, os cálix[4]pirróis e as porfirinas expandidas.

As hidrazonas pertencem a uma classe de compostos orgânicos com a estrutura $R_1R_2C=NNHR_3$. Estas possuem diversas propriedades biológicas, tal como atividade antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, antitubercular, antiplaquetária e antitumoral.

Procedeu-se à síntese de hidrazonas di-halogenadas, α,α -dicloro-hidrazonas, com o intuito de introduzir dois potenciais grupos abandonantes, de modo a possibilitar as duas reações de hetero-Diels-Alder sequenciais que levam à formação dos bilanos.

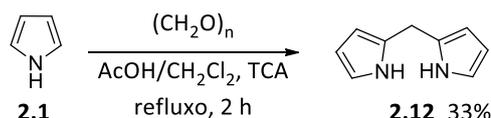
2.1.1. Síntese de dipirrometanos

Para a síntese dos dipirrometanos apresentados neste capítulo foram utilizadas metodologias descritas na literatura (Esquema 2.1).^{95,96} Assim a reação de aldeídos com excesso de pirrole (40 equiv.) (2.1), na presença de TFA, à temperatura ambiente durante 15 minutos sob atmosfera inerte, originou os dipirrometanos pretendidos com bons rendimentos (50-95%).



Esquema 2.1. Síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos.

Para além da síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos, foi também sintetizado um dipirrometano *meso*-livre. O dipirrometano **2.12** foi obtido com um rendimento de 33% através da reação do pirrole com o paraformaldeído, numa mistura de ácido acético e diclorometano em refluxo, na presença de uma quantidade catalítica de ácido tricloroacético.⁹⁷

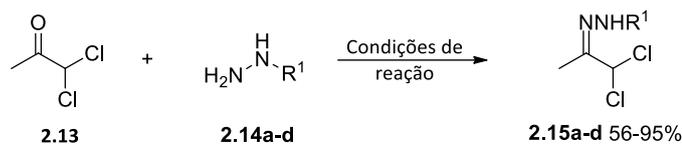


Esquema 2.2. Síntese do dipirrometano.

2.1.2. Síntese de α,α -dicloro-hidrazonas

O método mais utilizado para a síntese de α,α -dicloro-hidrazonas é a condensação de dicloroacetonas com hidrazinas. Assim, as hidrazonas **2.15a-d** foram preparadas através da reação da 1,1-dicloroacetona (**2.13**) com diferentes hidrazinas, seguindo procedimentos descritos na literatura (Tabela 2.1).⁹²⁻⁹⁸ Começou por se sintetizar a hidrazona **2.15a** que foi obtida com um rendimento de 58%, quando se fez reagir a 1,1-dicloroacetona (**2.13**) com o *t*-butilcarbazato (**2.14a**), em éter dietílico, na presença de quantidades catalíticas de ácido acético (reação 1).

Com o intuito de obter uma hidrazona com substituintes atratores de eletrões, de modo a aumentar a eficiência das reações de hetero-Diels-Alder, fez-se reagir a 1,1-dicloroacetona (**2.13**) com a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (**2.14b**), em fosfito de dietilo, obtendo-se a hidrazona **2.15b** com um rendimento de 95% (reação 2).

Tabela 2.1. Síntese de hidrazonas derivados de 1,1-dicloroacetona (**2.13**).

Reação	Hidrazina	R ¹	Condições de reação	2.15
1	2.14a	CO ₂ tBu	Et ₂ O, AcOH (cat.), 12 h	2.15a 58%
2	2.14b	2,4-Dinitrofenilo	Dietilfosfito, 3 h	2.15b 95%
3	2.14c	COPh	MeOH, AcOH, 1 h	2.15c 56%
4	2.14d	Ts	MeOH, HCl, 2 h	2.15d 67%

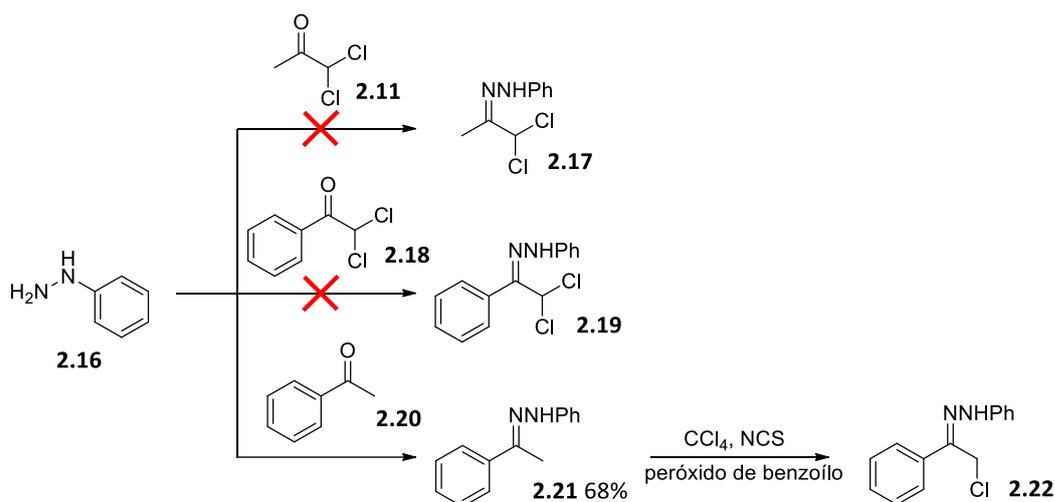
De modo a obter uma maior diversidade de hidrazonas, e tendo em conta que existem evidências na literatura que em geral as hidrazonas com atividade anticancerígena possuem um grupo carbonilo ou sulfonilo na posição 1 da hidrazona,⁹⁹ sintetizou-se uma hidrazona com o grupo benzoílo (**2.15c**) e outra com o grupo tosilo (**2.15d**).

A hidrazona **2.15c** foi obtida com um rendimento de 56% quando se fez reagir a 1,1-dicloroacetona (**2.13**) com a benzoílo-hidrazina (**2.14c**), em metanol, catalisada por ácido acético (reação 3). De modo a obter a hidrazona com o grupo tosilo, fez-se reagir a 1,1-dicloroacetona (**2.13**) com a *p*-toluenossulfonil-hidrazina (**2.14d**) em metanol, na presença de ácido acético, obtendo-se a hidrazona **2.15d** com um rendimento de 67% (reação 4).¹⁰⁰

Com a intenção de sintetizar uma hidrazona contendo um grupo *N*-arilo (R¹ = Ph) (**2.17** ou **2.19**), fez-se reagir a 2,2-dicloroacetofenona (**2.18**) com a fenil-hidrazina (**2.16**), em fosfito de dietilo, éter dietílico ou etanol, no entanto, não houve formação da hidrazona **2.19**. Como não se conseguiu obter a hidrazona **2.19**, resolvemos usar a 1,1-dicloroacetona (**2.13**) em éter dietílico na presença de ácido acético. No entanto, não se conseguiu obter o produto esperado, apenas foi recuperada a hidrazina **2.16**. Alterando o solvente da reação para fosfito de dietilo, também não foi observada a formação do produto esperado (Esquema 2.3).

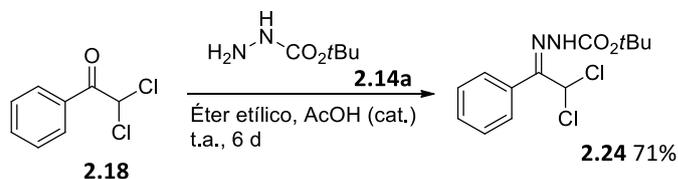
Com o intuito de entender a razão pela qual não houve formação da hidrazona **2.19** através do procedimento anterior, utilizou-se a acetofenona de modo a compreender a influência dos átomos de cloro na reação. Esta abordagem foi utilizada no caso da acetofenona e não na acetona, uma vez que aquando a halogenação da acetona não haveria seletividade. Assim, fez-se reagir a acetofenona (**2.20**) com a fenil-hidrazina (**2.16**), em hexano, novamente sem sucesso. Alterou-se o solvente de

hexano para etanol, onde se obteve a hidrazona **2.21** com um rendimento de 68%. De seguida, fez-se reagir a hidrazona **2.21** com a *N*-clorossuccinimida (NCS) em refluxo de tetracloreto de carbono, com uma quantidade catalítica de peróxido de benzoílo, durante 1 h. No espectro de RMN do bruto da reação foi possível observar evidências da formação da hidrazona monoclorada (**2.22**) contudo não se conseguiu isolar. Voltou-se a colocar a reação em refluxo com a adição de mais um equivalente de NCS, no entanto, não foi possível observar a formação da hidrazona diclorada (Esquema 2.3).



Esquema 2.3. Reatividade entre diferentes cetonas e a fenilhidrazina.

A α,α -dicloro-hidrazona **2.24**¹⁰¹ foi sintetizada com um rendimento de 71% através da reação da 2,2-dicloroacetofenona (**2.18**) com o *t*-butilcarbazato (**2.14a**), em éter dietílico na presença de uma quantidade catalítica de ácido acético glacial (Esquema 2.4).



Esquema 2.4. Síntese de hidrazona substituída com um grupo fenilo (R^2 = fenilo).

2.2. Síntese de bilanos e hexapirróis via bis-hetero-Diels-Alder

Depois de preparados os precursores, passou-se ao estudo da reação de bis-hetero-Diels-Alder de azoalquenos com dipirrometanos para a obtenção de bilanos.

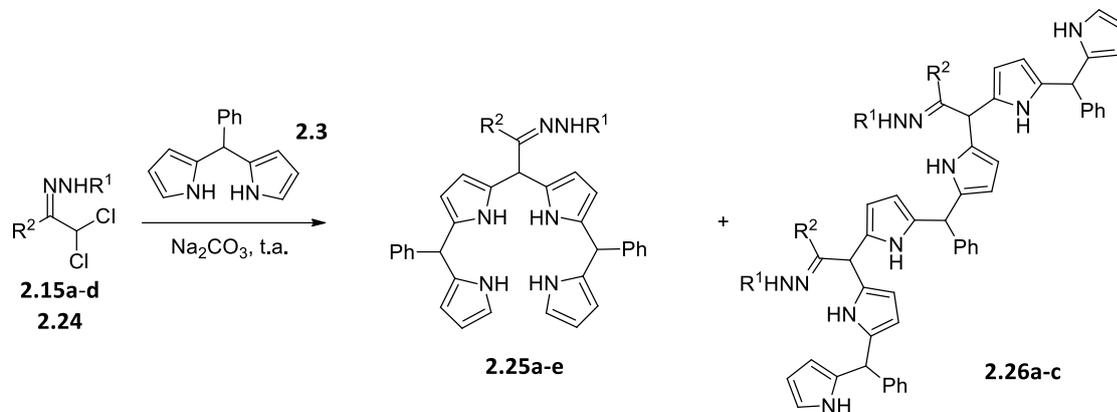
Inicialmente, efetuou-se o estudo da reação dos azoalquenos gerados *in situ*, a partir das α,α -dicloro-hidrazonas **2.15** (Tabela 2.2) usando as condições de reação otimizadas para a síntese de bilanos *meso*-substituídos com grupos oxima.¹⁰² A reação realizada com a proporção (1:4) de hidrazona (**2.15a**)/DP em H₂O/DCM (6:1) à temperatura ambiente durante 20 minutos, levou à formação do bilano **2.15a** com 44% de rendimento. Desta reação foi também isolado o hexapirrole **2.26** com um rendimento de 8% (reação 1).

O bilano **2.25b** foi obtido a partir da reação com a hidrazona **2.15b** em água/acetato de etilo (6:1), durante 20 minutos, com rendimento de 62%, sendo possível também isolar o hexapirrole **2.26b** com um rendimento de 9% (reação 2). Na síntese do bilano **2.25b** foi utilizado o acetato de etilo como co-solvente da reação devido à baixa solubilidade da hidrazona em diclorometano. A reação da hidrazona **2.25b** com o DP **2.3** foi também realizada utilizando diclorometano como solvente. Neste caso o tempo de reação foi muito superior, tendo-se isolado o bilano **2.25b** com um rendimento de 34% e o hexapirrole **2.26b** com 4% de rendimento (reação 3). A reação entre o dipirrometano e o azoalqueno demonstrou ser mais rápida e conduzir a rendimentos mais elevados usando um sistema de solventes contendo água do que usando diclorometano como solvente. Tal evidência foi também observada em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de Química Orgânica entre dipirrometanos e nitrosoalquenos.⁹⁴ As principais causas que proporcionam uma maior eficiência de reações hetero-Diels-Alder realizadas em meio aquoso, deve-se não só ao efeito hidrofóbico que possibilita a agregação conduzida por entropia de duas moléculas não polares dissolvidas em água, mas também devido às interações de ligações de hidrogénio. Para além deste efeito, observa-se também que os solventes aquosos possibilitam um aumento da seletividade e regiosseletividade da reação.^{103,104}

Os bilanos **2.25c** e **2.25e** foram obtidos a partir da reação das hidrazonas **2.15c** e **2.24**, respetivamente, em água/diclorometano com rendimentos de 38% e 40%, respetivamente (reações 4 e 6). Em ambas as reações foi possível ter evidência por TLC da formação dos respetivos hexapirróis, no entanto, não foi possível isolá-los. A reação entre o DP **2.3** e a hidrazona **2.15d**, em

água/acetato de etilo, originou o bilano **2.25d** e o hexapirrole **2.26c** com rendimentos de 40% e 5%, respetivamente (reação 5).

Tabela 2.2. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas com o dipirrometano **2.3**.



Reação	Hidrazona	R ¹	R ²	Condições de reação	2.25	2.26
1	2.15a	CO ₂ tBu	Me	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ , 20 min	2.25a 44%	2.26a 8%
2	2.15b	2,4-Dinitrofenilo	Me	H ₂ O/AcOEt, 20 min	2.25b 62%	2.26b 9%
3	2.15b	2,4-Dinitrofenilo	Me	CH ₂ Cl ₂ , 41 h	2.25b 34%	2.26b 4%
4	2.15c	COPh	Me	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ , 20 min	2.25c 38%	-
5	2.15d	Ts	Me	H ₂ O/AcOEt, 20 min	2.25d 40%	2.26c 5%
6	2.24	CO ₂ tBu	Ph	H ₂ O/CH ₂ Cl ₂ , 20 min	2.25e 40%	-

Na figura 2.1, está apresentado o espetro de RMN protónico do bilano **2.15a** como exemplo do espetro típico obtido para esta classe de compostos. Os sinais mais característicos correspondem aos prótons *meso*, nomeadamente o próton da posição 10 a 4.85 ppm e os prótons H-5 e H-15, que aparecem como um único sinal a 5.37 ppm, devido à simetria da molécula. Outros sinais, característicos correspondem aos prótons β -pirrólicos que aparecem entre 5.71 e 6.14 ppm e os prótons α -pirrólicos que aparecem como um singuleto largo a 6.64 ppm. É possível também observar os sinais correspondentes aos prótons dos grupos NH's, a desvios químicos mais altos.

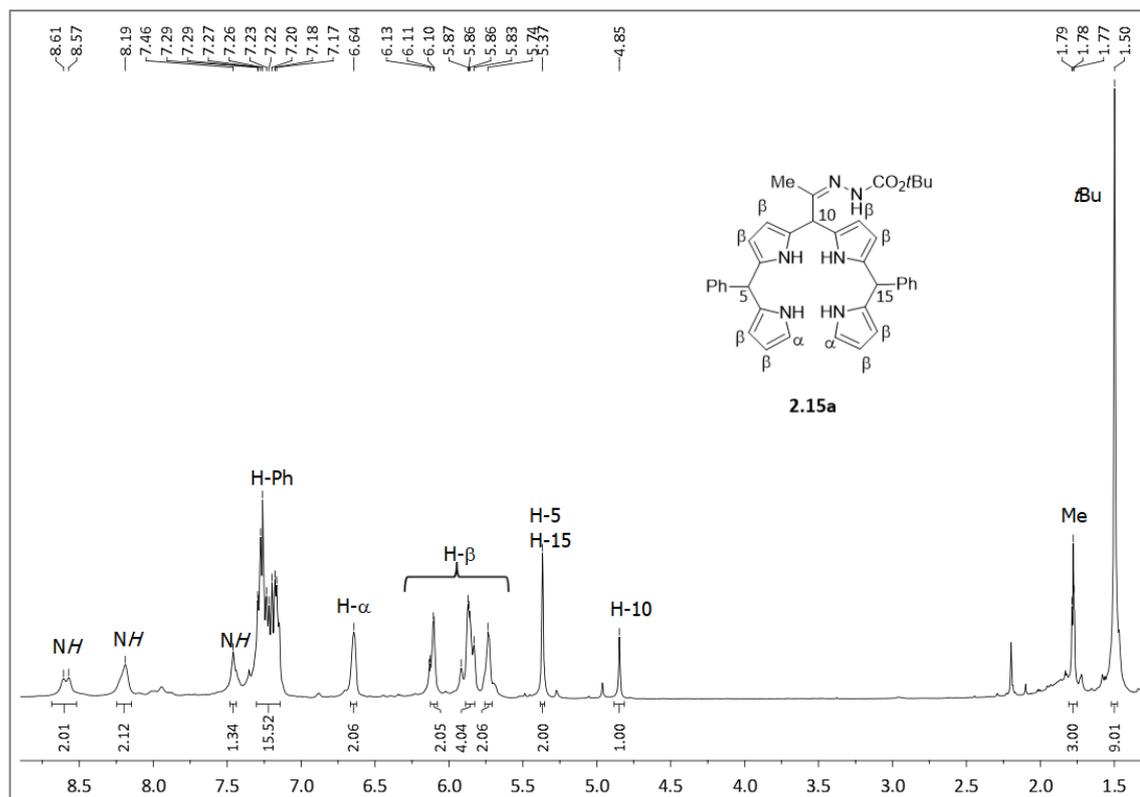
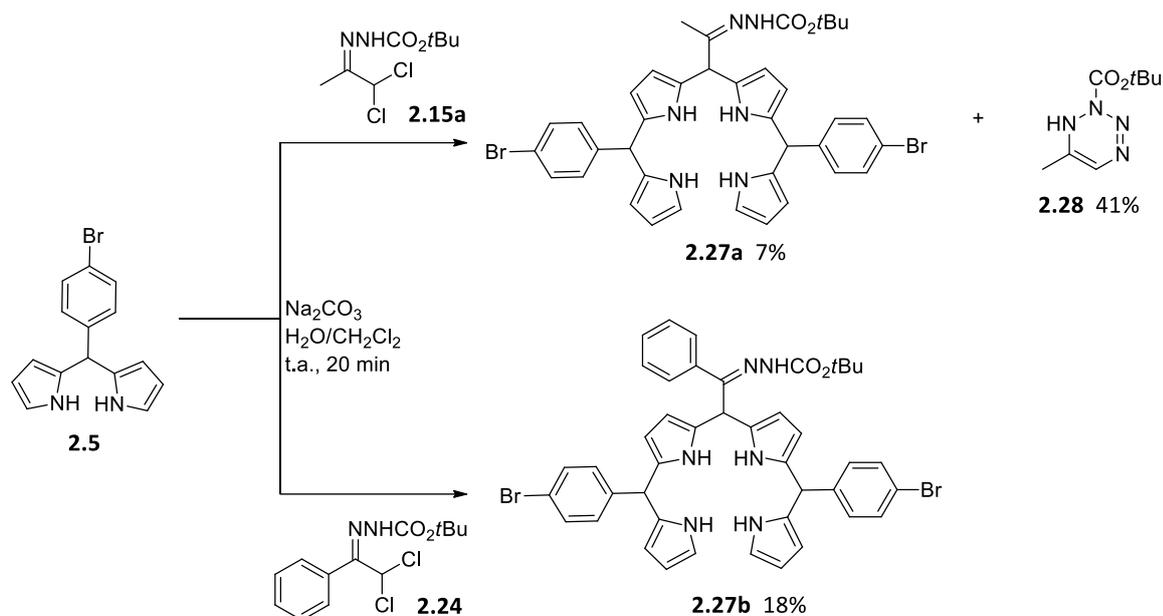


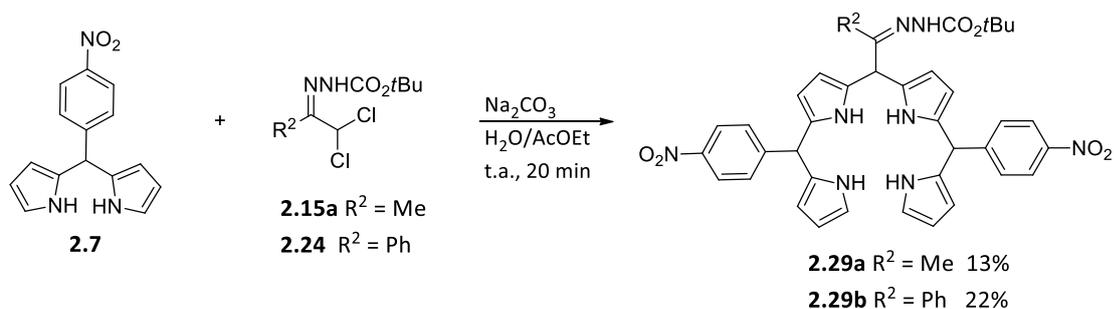
Figura 2.1. Espectro de RMN ^1H do bilano **2.15a** (CDCl_3).

A reação das hidrazonas **2.15a** e **2.24**, precursores dos respetivos azoalquenos, com o DP **2.5** foi também estudada. Assim, a desidro-halogenação da hidrazona **2.15a** na presença do DP **2.5**, usando o sistema de solventes $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ levou à formação de dois produtos. Ao contrário dos casos anteriores, estes dois produtos não correspondiam ao bilano e ao hexapirrole, mas sim ao bilano **2.27a** e a um produto resultante da auto-condensação da hidrazona **2.15a**. A formação do composto **2.28** resultante da auto-condensação da hidrazona já tinha sido observada anteriormente.⁹³ Pelo facto da hidrazona ter sofrido esta reação secundária, a quantidade de hidrazona livre que ficou disponível para reagir com o DP foi bastante inferior ao previsto, e assim o rendimento do bilano **2.27a** foi também baixo (7%). O bilano **2.27b** foi obtido com um rendimento de 18%, quando se fez reagir a hidrazona **2.24** com o DP **2.5** (Esquema 2.5).



Esquema 2.5. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas com o *p*-bromofenildipirrometano (**2.5**).

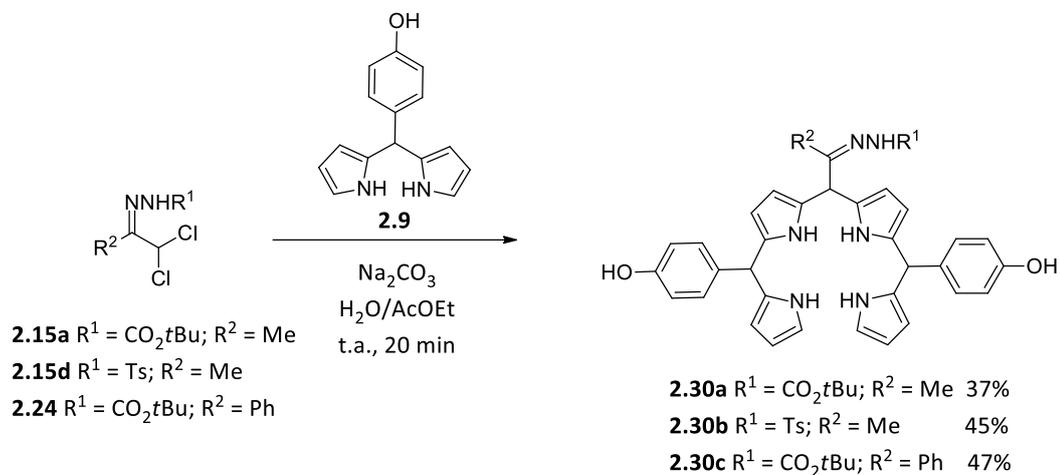
Os bilanos **2.29a** e **2.29b** foram obtidos através da reação do DP **2.7** com os azoalquenos gerados *in situ* a partir das hidrazonas **2.15a** e **2.24**, respetivamente. Usando o sistema de solventes água/acetato de etilo. Os bilanos **2.29a** e **2.29b** foram obtidos com rendimentos de 13% e 22%, respetivamente (Esquema 2.6).



Esquema 2.6. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas com o *p*-nitrofenildipirrometano (**2.7**).

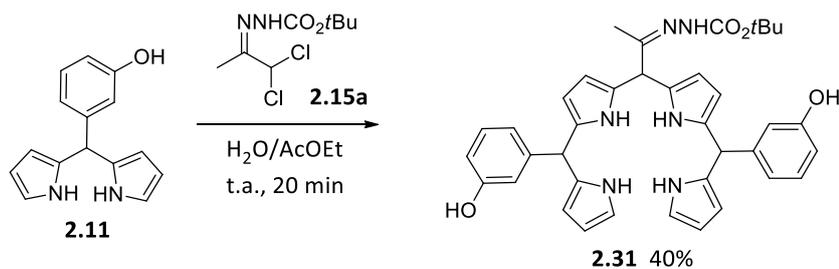
De modo a aumentar a hidrofiliçidade dos bilanos, resolvemos alargar o estudo ao DP **2.9** que contém um grupo *p*-hidroxifenilo na posição *meso*. Assim, a reação da hidrazona **2.15a** com o DP **2.9** em $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOEt}$ durante 20 minutos, à temperatura ambiente, resultou na formação do bilano **2.30a** com 37% de rendimento. Usando as mesmas condições de reação e a hidrazona **2.15d** como

precursora do azoalqueno, foi obtido o bilano **2.30b** com rendimento de 45%. O bilano **2.30c** foi obtido com um rendimento de 47% quando se utilizou a hidrazona **2.24** (Esquema 2.7).



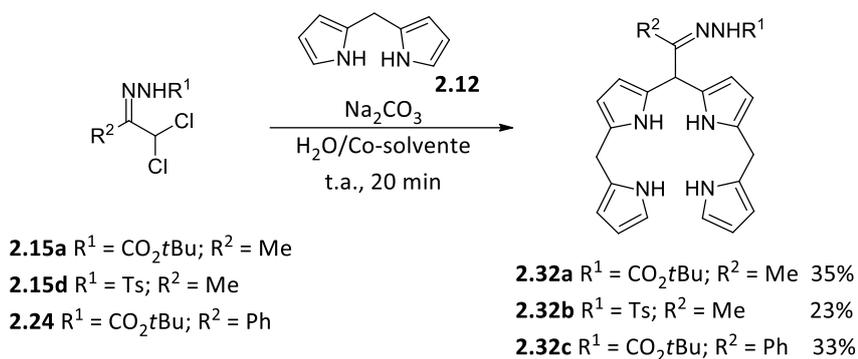
Esquema 2.7. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas com o *p*-hidroxifenildipirrometano (**2.9**).

Após a síntese de bilanos utilizando o dipirrometano *meso*-substituído com o grupo *p*-hidroxifenilo, decidiu sintetizar-se um bilano com um substituinte nas posições 5 e 10 *m*-hidroxifenilo. Com esta alteração pretendia-se analisar o efeito do substituinte do grupo hidroxifenilo do dipirrometano na reação de hetero-Diels-Alder, assim como avaliar a sua influência na atividade fotodinâmica. Para além disso, o objetivo da síntese de um bilano a partir do dipirrometano *meso*-substituído com um grupo *m*-hidroxifenilo, foi sintetizar um corrole com esta funcionalização de modo a poder comparar a sua atividade fotodinâmica com o Foscan[®], uma vez que este possui 4 grupos *m*-hidroxifenilo nos carbonos *meso* da clorina, que lhe confere propriedades muito interessantes como fotossensibilizador. Assim, a reação do DP **2.11** com o azoalqueno gerado a partir da hidrazona **2.15a**, originou o bilano **2.31** com rendimento de 40% (Esquema 2.8). Comparando os rendimentos obtidos na síntese do bilano **2.30a** e **2.31**, podemos concluir que a posição do grupo hidroxilo no grupo fenilo da posição *meso* do dipirrometano não influencia a reação de hetero-Diels-Alder.



Esquema 2.8. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas (2.15a) com o *m*-hidroxifenildipirrometano.

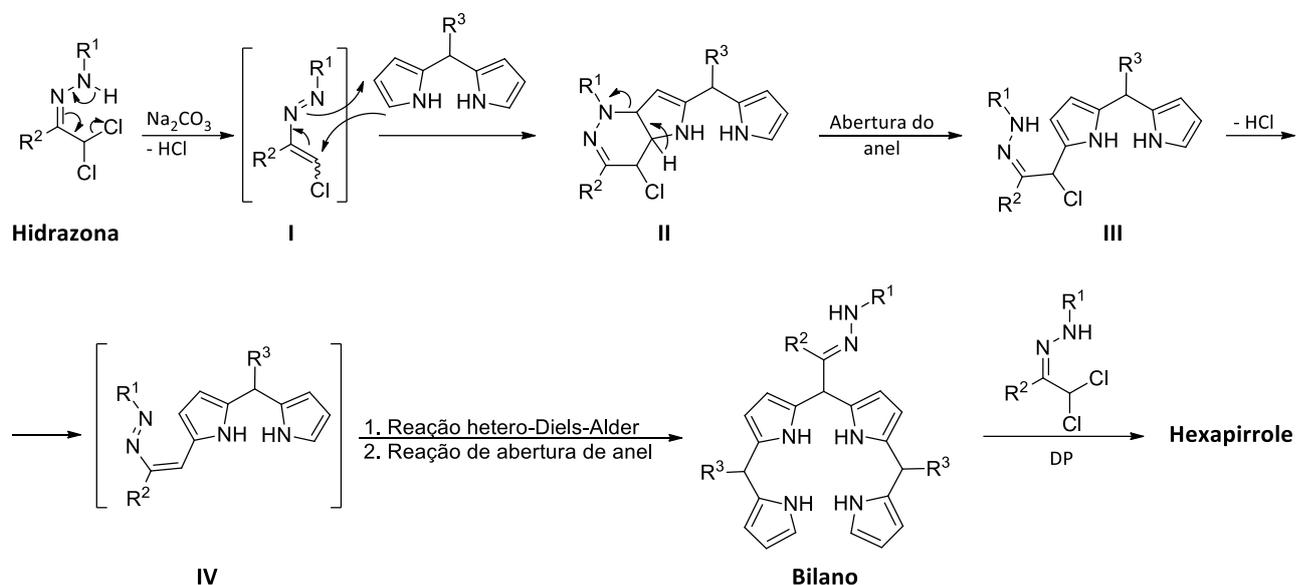
Por fim, sintetizaram-se bilanos sem substituintes nas posições 5 e 15 utilizando-se o DP 2.12. Os bilanos 2.32a e 2.32c foram obtidos através da reação das hidrazonas 2.15a e 2.24, respectivamente, na presença do DP 2.12, em água/diclorometano, tendo sido obtidos com rendimentos de 35% e 33%, respectivamente. O bilano 2.32b foi obtido utilizando a hidrazona 2.15d como precursor do azoalqueno, em água/acetato de etilo, com um rendimento de 23%. Neste caso foi utilizado o acetato de etilo como co-solvente devido à baixa solubilidade da hidrazona 2.15d em DCM.



Esquema 2.9. Reactividade de α,α -dicloro-hidrazonas com o dipirrometano (2.12).

O mecanismo geral para a síntese de bilanos e hexapirróis, é iniciado pela formação *in situ* do α -cloroazoalqueno (I), a partir da desidro-halogenação da α,α -dicloro-hidrazona na presença de carbonato de sódio. Este reage com o dipirrometano via reação hetero-Diels-Alder, para formar o cicloadducto (II). A abertura do anel e consequente rearomatização da unidade pirrólica do intermediário leva à formação do dipirrometano funcionalizado (III). Posteriormente, ocorre uma segunda desidro-halogenação formando o intermediário (IV), que reage com uma segunda molécula de dipirrometano para formar os respectivos bilanos (Esquema 2.10). A síntese dos hexapirróis resulta de duas reações consecutivas de hetero-Diels-Alder, primeiro a reação do bilano com o

azoalqueno gerado *in situ*, seguida de formação de um segundo azoalqueno que é intercetado por uma terceira molécula de dipirrometano (Esquema 2.10).

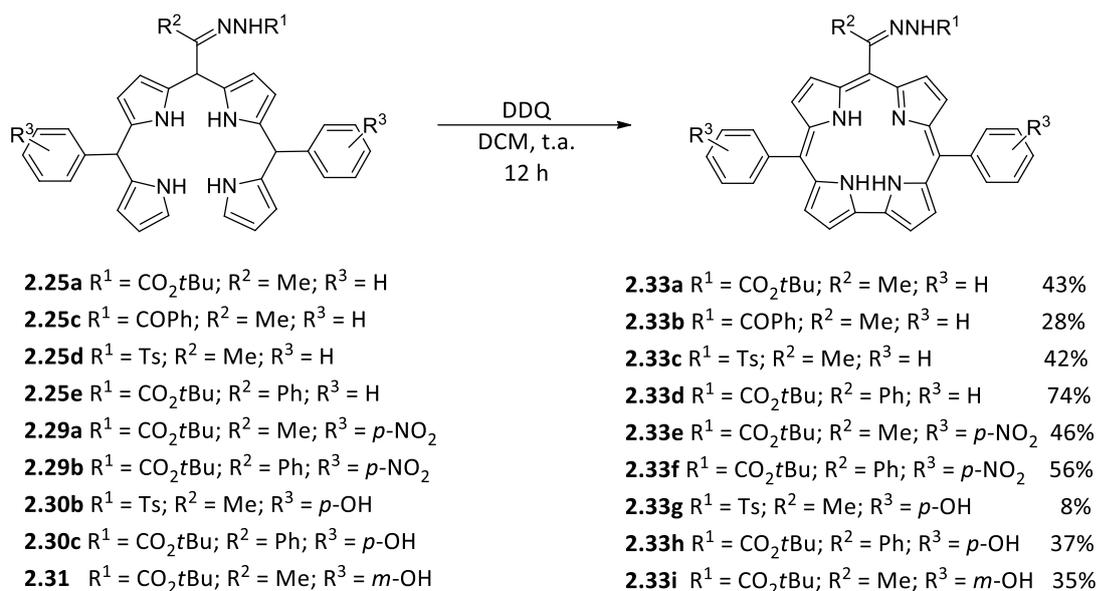


Esquema 2.10. Esquema geral para a síntese de bilanos e hexapirróis.

2.3. Síntese de corróis *trans*-A₂B

Concluída a síntese dos bilanos procedeu-se à macroclicização oxidativa com formação dos corróis. Em todos os casos utilizou-se a 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) como agente oxidante.

Os corróis **2.33a-i** foram obtidos com rendimentos moderados a bons (8-74 %), através da oxidação com DDQ em DCM, à temperatura ambiente durante 12 h dos respetivos bilanos (Esquema 2.10).



Esquema 2.10. Síntese de corróis através da macroclicização oxidativa dos bilanos sintetizados.

Na figura 2.2, está representado o espectro de RMN ^1H do corrole **2.33a** de forma a representar o espectro típico desta classe de compostos. Comparando com o espectro de RMN ^1H do respetivo bilano (**2.15a**) representado na figura 2.1, podemos observar que ocorreu a macroclicização oxidativa pelo desaparecimento dos prótons *meso*, α -pirrólicos e também dos prótons correspondentes aos $\text{NH}'\text{s}$. Para além do desaparecimento desses sinais, também é possível observar que os prótons correspondentes às posições β -pirrólicas sofreram um deslocamento para desvios químicos mais elevados, tal como esperado para um sistema aromático de 18 eletrões π característico dos corróis.

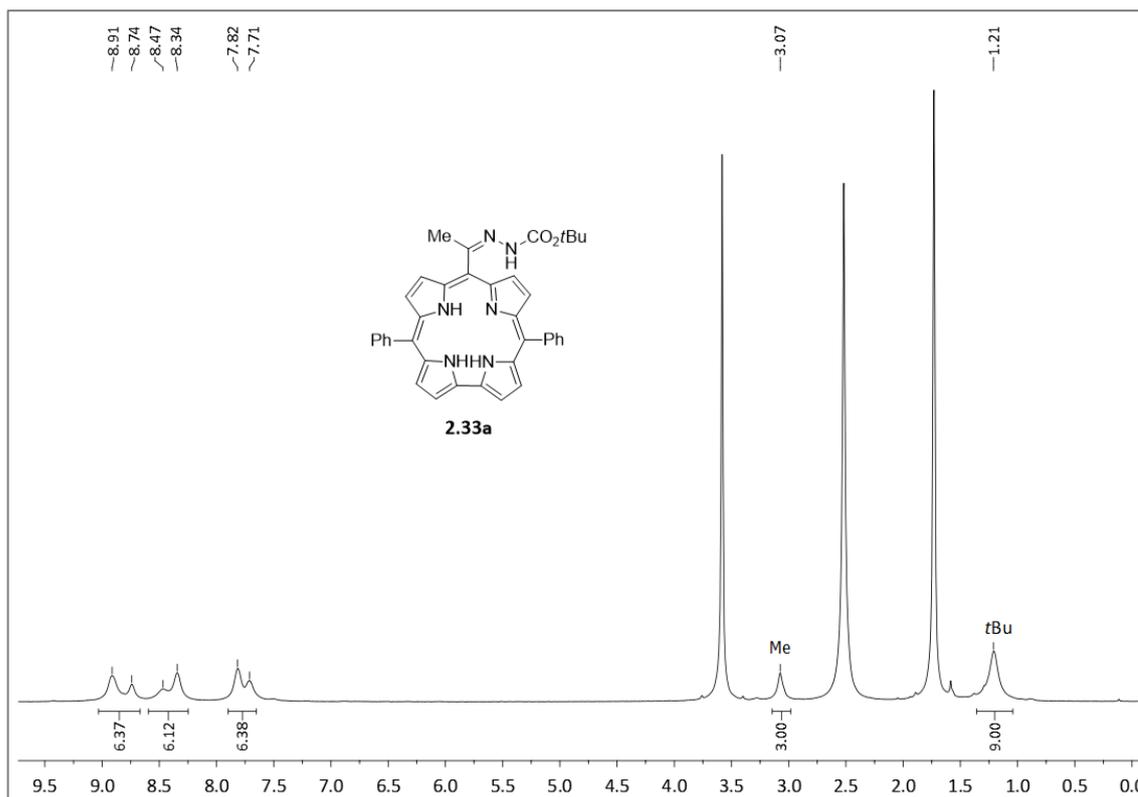
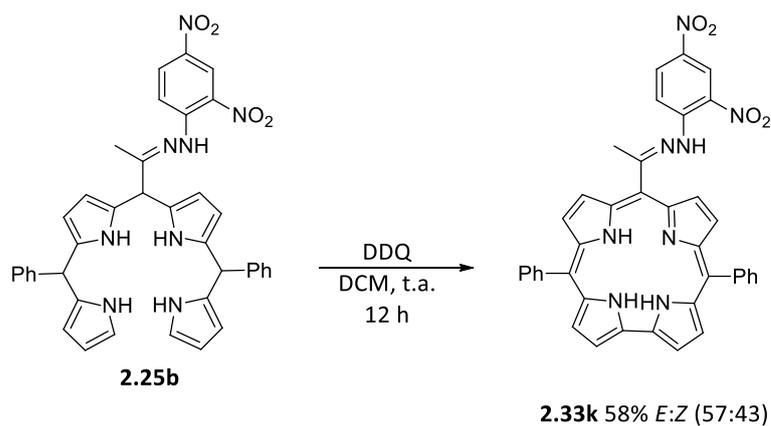


Figura 2.2. Espectro de RMN ¹H do corrole **2.33a** (THF-*d*₈).

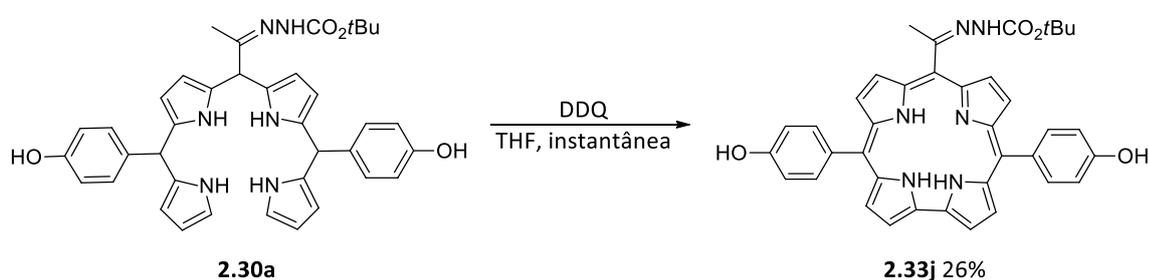
A oxidação do bilano **2.25b** resultou na formação do corrole **2.33k** como uma mistura de isómeros *E* e *Z* (57:43), com um rendimento global de 58% (Esquema 2.11). A proporção dos isómeros foi calculada com base no espectro de RMN protónico.



Esquema 2.11. Síntese do corrol **2.33k** através da macroclicização oxidativa do bilano **2.25b**.

Quando se aplicaram as condições de oxidação ao bilano **2.30a**, havia evidências da formação do produto no controlo por TLC, no entanto aquando da realização da purificação por cromatografia

em coluna não era possível isolar o produto. Assim, alterou-se o solvente da reação para THF, de modo a melhorar a solubilidade do composto, e deixou-se reagir durante a noite, contudo, tal como na reação em DCM não foi possível isolar o produto. De modo a otimizar as condições utilizadas, resolvemos reduzir o tempo de reação. Notámos que quando se adicionou a DDQ à solução do bilano **2.30a** em THF, ocorria uma mudança de cor instantânea. Ao realizar um TLC à reação imediatamente após a adição era visível a formação do produto e o consumo total do reagente. Procedeu-se então ao isolamento e purificação da reação, e foi possível isolar o composto **2.33j** com um rendimento de 26% (Esquema 2.12).



Esquema 2.12.

As tentativas de oxidação dos bilanos **2.32a-c**, derivados do dipirrometano não substituído **2.12**, com DDQ em DCM e THF, não levaram à formação dos coróis pretendidos. Com o intuito de perceber se o fator tempo estaria a ser o responsável pela não formação dos coróis, fez-se um TLC logo após a adição da DDQ, no qual se verificou que o reagente já tinha sido totalmente consumido, no entanto não se observaram evidências da formação dos produtos pretendidos. Em perspetiva futura, um caminho possível a seguir será a substituição da DDQ por um oxidante mais fraco, uma vez que o dipirrometano não substituído **2.12** apresenta uma menor estabilidade, de modo a perceber se a causa para a não obtenção do produto pretendido é o oxidante utilizado.

Não foi possível promover a macroclicação dos bilanos **2.27a** e **2.27b**. Devido ao baixo rendimento do bilano **2.27a**, por causa da auto-condensação da hidrazona, nunca foi possível isolá-lo em quantidades suficientes para se efetuar o estudo da reação de oxidação. No caso do bilano **2.27b**, foram aplicadas as condições de oxidação iguais às referidas anteriormente, no entanto apesar da evidência de formação do produto no controlo por TLC, não foi possível isolar o corrole pretendido.

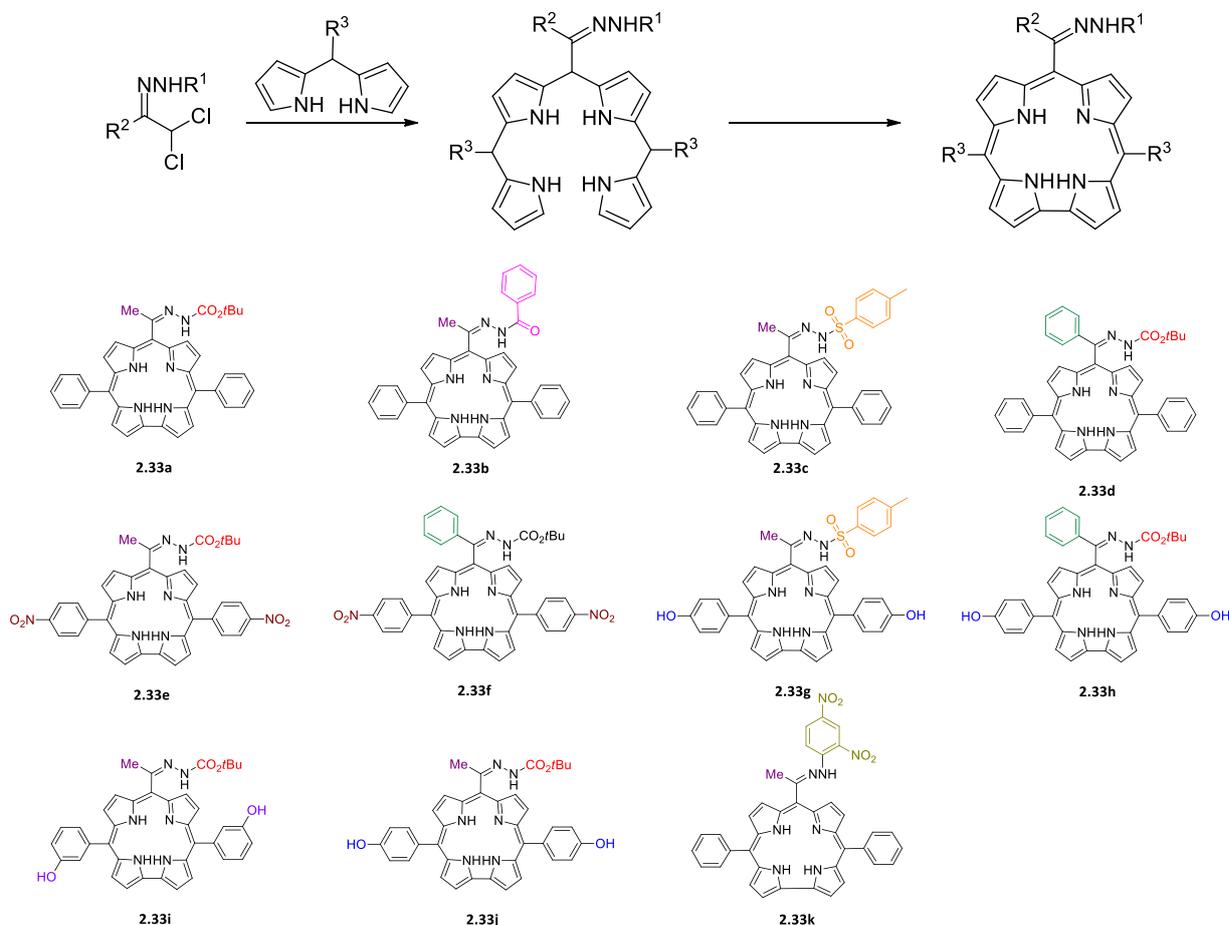
2.4. Conclusão

Neste capítulo pretendia-se sintetizar novos corróis *trans*-A₂B com base na reatividade de azoalquenos.

A estratégia sintética envolveu a síntese de bilanos através de duas reações consecutivas de hetero-Diels-Alder de azoalquenos com dipirrometanos. Neste passo sintético foi possível sintetizar uma nova classe de compostos tetrapirrólicos, os bilanos substituídos com um grupo hidrazona. As reações de síntese dos bilanos apresentam uma particularidade bastante interessante, uma vez que a metodologia sintética realizada em água apresenta rendimentos superiores e tempos de reação mais curtos do que em solvente orgânico, para além de que é um processo mais sustentável.

A macrociclicização oxidativa dos bilanos sintetizados originou novos corróis *trans*-A₂B com rendimentos entre os 8% e os 74%. Desta forma foram sintetizados onze novos corróis *trans*-A₂B novos, fazendo variar tanto os substituintes das α,α -dihalohidrazonas como dos DPs.

Os corróis sintetizados serão utilizados para realizar estudos fotofísicos e atividade biológica *in vitro* apresentados no capítulo 3 e 4, respetivamente.



Capítulo 3

Estudios Fotofísicos

Capítulo 3

3. Estudos fotofísicos

3.1. Introdução teórica

3.1.1. Espectroscopia de absorção eletrónica e fluorescência

Uma molécula no estado fundamental pode absorver um fóton com energia adequada para elevar um eletrão de um nível fundamental (S_0) para um nível excitado (S_n). Esta transição de estados apenas ocorre se a energia do fóton for igual à diferença energética entre o estado fundamental e o estado excitado dessa molécula (lei de Plack, $E = h \cdot \nu$).

A Lei de *Beer-Lambert* estabelece uma relação entre a luz absorvida num dado comprimento de onda por uma espécie, com a concentração c ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com o comprimento do percurso ótico l (cm) e com o coeficiente de absorvidade molar $\varepsilon(\lambda)$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Verifica-se que nem toda a luz emitida pela fonte chega ao detetor, assim, através do logaritmo entre a intensidade de radiação transmitida, I_0 , e a intensidade de radiação incidente, I , pode ser obtido o valor da absorção¹⁰⁵

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (\text{Eq. 3.1})$$

A lei de *Beer-Lambert* estabelece que:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Após a absorção de luz, os eletrões que vão migrar para estados eletronicamente excitados, podem dissipar energia de forma radiativa ou não radiativa.

A luminescência é a emissão de luz que resulta do decaimento radiativo de uma espécie num estado eletronicamente excitado para o estado fundamental. Dependendo da natureza do estado excitado em que a espécie se encontra a luminescência é dividida em duas categorias, a fluorescência e a fosforescência.¹⁰⁶

O fenómeno de fluorescência consiste no processo de desativação do estado excitado para o estado fundamental da mesma multiplicidade de spin. Este possui parâmetros característicos, como a variação do rendimento quântico entre 0 e 1 e o tempo de vida típico de fluorescência varia da ordem de pico a nanossegundos (ps-ns). Em alternativa, quando a emissão ocorre entre dois estados com diferente multiplicidade de spin (T_1 e S_0), estamos perante o fenómeno de fosforescência, com tempos de vida de micro a milissegundos (μs -ms).

A emissão de fluorescência ocorre quando há o retorno de um fotão ao estado fundamental S_0 . No estado excitado há dissipação de energia, o que provoca uma diminuição a energia do fotão e, conseqüentemente, um comprimento de onda maior, uma vez que:

$$E = h \cdot f \quad (\text{Eq. 3.3})$$

e

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

onde h é a constante de Planck ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$), f a frequência (s^{-1}) e c a velocidade da luz no vázio ($2.99 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Esta diferença energética está relacionada com o desvio de Stokes, que se caracteriza como a diferença entre o comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{em}}$) em relação ao máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}^{\text{abs}}$),

$$\Delta\lambda_{\text{Stokes}} = \lambda_{\text{máx}}^{\text{em}} - \lambda_{\text{máx}}^{\text{abs}} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

3.1.2. Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

Um dos principais parâmetros de caracterização de um fluoróforo é o rendimento quântico de fluorescência, ϕ_F , uma vez que nem todas as moléculas que absorvem radiação UV são fluorescentes.

O rendimento quântico de fluorescência é definido pela razão entre o número de *quanta* (fotões) emitidos por fluorescência e o número de *quanta* (fotões) absorvidos, e esta medida pode ser realizada por dois métodos distintos, o relativo e o absoluto.¹⁰⁷

$$\phi_F = \frac{\text{n}^\circ \text{ de quanta emitidos}}{\text{n}^\circ \text{ de quanta absorvidos}} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

O método relativo corresponde à determinação do rendimento quântico de fluorescência de um composto (ϕ_F^{cp}) em relação a um padrão fluorescente de rendimento quântico de fluorescência conhecido (ϕ_F^{ref}). Este método tem algumas características a ter em conta, como o facto de que os rendimentos quânticos de emissão dos compostos são independentes do comprimento de onda de excitação, no entanto, a gama de comprimentos de onda de absorção e emissão do composto e da referência devem coincidir o melhor possível. A determinação relativa do ϕ_F , é feita através da

comparação entre o valor da integração das áreas dos espectros de emissão de fluorescência do composto ($\int I(\lambda)^{cp} d\lambda$) e da referência ($\int I(\lambda)^{ref} d\lambda$).

Por outro lado, o método absoluto é determinado através de uma configuração de esfera integradora que é vantajoso em relação ao método comparativo, uma vez que permite a captura de toda a luz emitida e dispersa pela amostra em qualquer direção.

3.1.3. Fluorescência resolvida no tempo

No estudo da fluorescência resolvido no tempo, são utilizados pulsos de luz ou luz modulada, que permite a avaliação de tempos de vida de decaimento de uma espécie fluorescente, a partir da diminuição da sua intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

O tempo de vida de fluorescência τ é definido como o tempo que uma molécula reside no estado excitado antes de emitir um fóton e é também definido em termos do tempo que decorre entre a população das moléculas excitadas decair de I_0 até I_0/e .

Uma das técnicas para a determinação de tempos de vida é a técnica de contagem de monofóton correlacionada temporalmente, que se baseia no princípio de probabilidade de detecção de um fóton, após um tempo de pulso de excitação, ser proporcional à intensidade de fluorescência nesse mesmo instante. A curva de decaimento da intensidade fluorométrica pode ser obtida por aplicação de uma sequência de pulsos de excitação.

A determinação do tempo de vida de fluorescência é bastante útil para compreender as propriedades estruturais e dinâmica do meio, nomeadamente a existência de interações intermoleculares que podem levar, por exemplo, à formação de novas espécies em solução, tais como agregados.

Por meio da determinação do tempo de vida de fluorescência é possível determinar outras grandezas importantes como a constante de velocidade radiativa k_F e não radiativa k_{NR} .

A constante de velocidade não radiativa, k_F , esta relacionada com o rendimento quântico de fluorescência através da seguinte expressão:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

A constante de velocidade não radiativa, k_{NR} , pode ser obtida através da seguinte equação,

$$k_{NR} = \frac{1 - \phi_F}{\tau_F} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

onde ϕ_F é o rendimento quântico de fluorescência e τ_F o tempo de vida de fluorescência do composto.

3.2. Caracterização fotofísica

Para proceder à caracterização fotofísica dos corróis, começou por se caracterizar o primeiro estado excitado singuleto aplicando-se várias técnicas como a espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência. Efetuaram-se estudos em dois solventes: sulfóxido de dimetilo (DMSO) e tetra-hidrofurano (THF), sendo estes escolhidos com o intuito de abranger dois solventes com constantes dielétricas distintas $\epsilon' = 46.45$ e 7.58 , respetivamente. Além da caracterização fotofísica do estado singuleto, também foi verificado o potencial destes corróis para gerar oxigénio singuleto. Tais propriedades foram comparadas com o 5,10,15-trifenilcorrole, usado como modelo.

Todas as estruturas dos corróis referenciados neste capítulo podem ser consultadas no capítulo 6.1.2.

3.2.1. Coeficiente de absortividade molar (ϵ)

Com recurso à lei de *Beer-Lambert*, foi possível determinar os coeficiente de absortividade molar do corrole modelo e dos corróis **2.33a-k**. Para esse fim, prepararam-se soluções em THF e DMSO, com concentrações entre 1×10^{-6} M e 7.74×10^{-6} M, das quais se traçaram os respetivos espectros de absorção. Na figura 3.1 são apresentados os espectros de absorção do corrole **2.33a** bem como os máximos de absorvância em função da concentração das soluções em diferentes concentrações e os respetivos coeficientes de correlação linear (R^2). O declive do ajuste corresponde ao coeficiente de absortividade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tabela 3.1). Os dados correspondentes aos corróis **2.33b-k** apresentam-se no Apêndice (Capítulo 7).

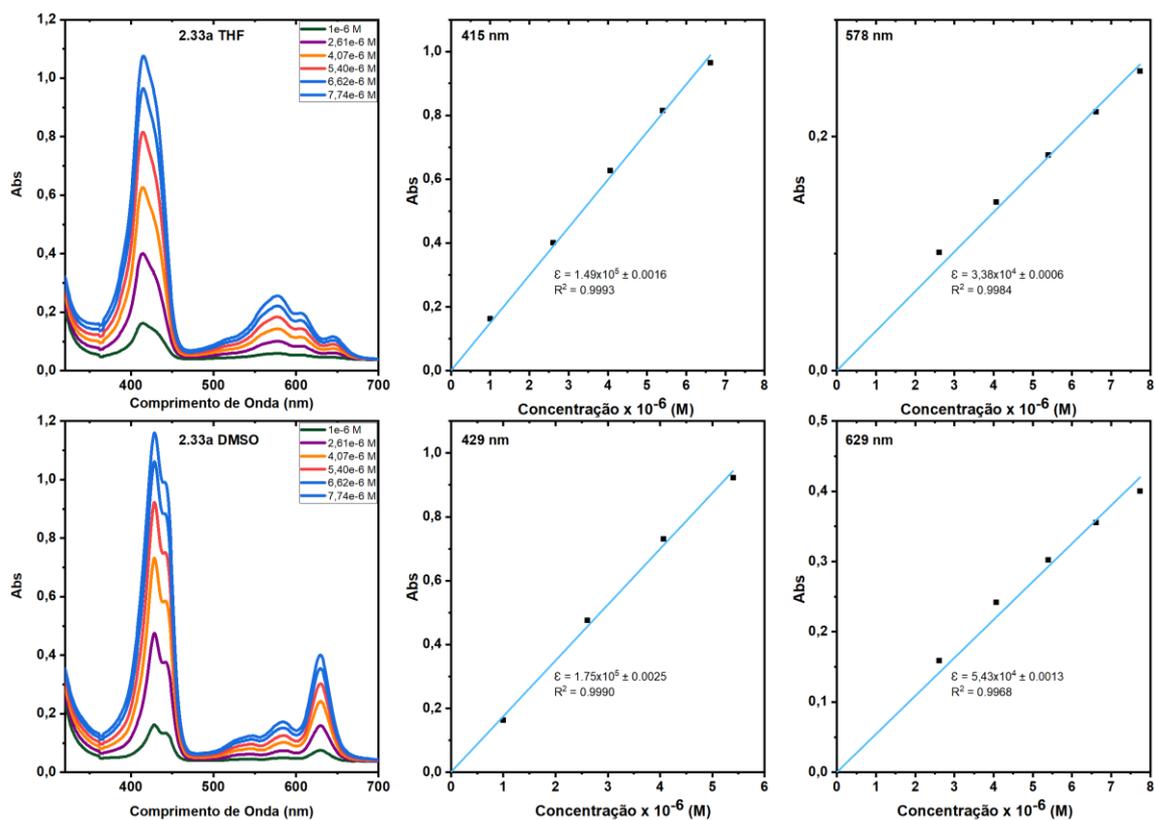


Figura 3.1. Representação gráfica do espectro de absorção nas diferentes concentrações e relação obtida entre a concentração e a absorvância nos comprimentos de onda indicados, em THF e DMSO, do composto **2.33a**.

A tabela 3.1 resume os valores obtidos de absortividade molar (ϵ), para os compostos **2.33a-k** em THF e DMSO, respetivamente.

Tabela 3.1. Valores obtidos para o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de cada composto, em THF e DMSO, e respectivo coeficiente de correlação linear (R^2).

Corrole	THF			DMSO		
	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	R^2	λ_{\max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	R^2
Modelo	417	4.27×10^4	0.9963	427	3.09×10^4	0.9988
	577	5.83×10^4	0.9983	641	1.68×10^4	0.9990
2.33a	415	1.49×10^5	0.9993	429	1.75×10^5	0.9990
	578	3.38×10^4	0.9984	629	5.43×10^4	0.9968
2.33b	416	1.29×10^5	0.9996	429	1.18×10^5	0.9985
	578	2.92×10^4	0.9998	632	4.30×10^4	0.9983
2.33c	416	1.53×10^5	0.9987	429	1.32×10^5	0.9960
	580	3.15×10^4	0.9994	631	4.23×10^4	0.9971
2.33d	416	1.48×10^5	0.9984	431	1.41×10^5	0.9977
	580	3.14×10^4	0.9988	627	4.57×10^4	0.9984
2.33e	442	7.49×10^4	0.9999	412	5.89×10^4	0.9973
	600	3.05×10^4	0.9998	683	3.16×10^4	0.9952
2.33f	440	7.28×10^4	0.9998	415	6.26×10^4	0.9983
	602	2.79×10^4	0.9990	675	3.57×10^4	0.9967
2.33g	580	3.14×10^4	0.9988	431	9.07×10^4	0.9935
	583	2.46×10^4	0.9983	632	2.92×10^4	0.9902
2.33h	417	1.20×10^5	0.9990	430	1.06×10^5	0.9962
	581	2.68×10^4	0.9986	630	3.44×10^4	0.9959
2.33i	415	1.45×10^5	0.9993	429	1.19×10^5	0.9995
	580	3.11×10^4	0.9993	630	4.23×10^4	0.9997
2.33j	416	1.42×10^5	0.9993	429	1.33×10^5	0.9966
	581	2.99×10^4	0.9991	632	4.36×10^4	0.9977
2.33k	-	-	-	430	1.21×10^5	0.9975
	-	-	-	632	3.92×10^4	0.9979

3.2.2. Espectroscopia de absorção eletrônica e fluorescência em estado estacionário

Nas figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5, podemos observar os espectros de absorção, linha contínua, e os espectros de emissão de fluorescência, linha tracejada. As figuras apresentam os corróis agrupados consoante o dipirrometano utilizado, e de seguida é apresentada a tabela 3.2 como resumo das propriedades observadas nas figuras. Em todas as figuras podemos observar o perfil do espectro do corrole modelo, à exceção da figura 3.5.

Na figura 3.2, estão representados os espectros dos corróis sintetizados com *meso*-fenildipirrometano (**2.3**), em THF e DMSO.

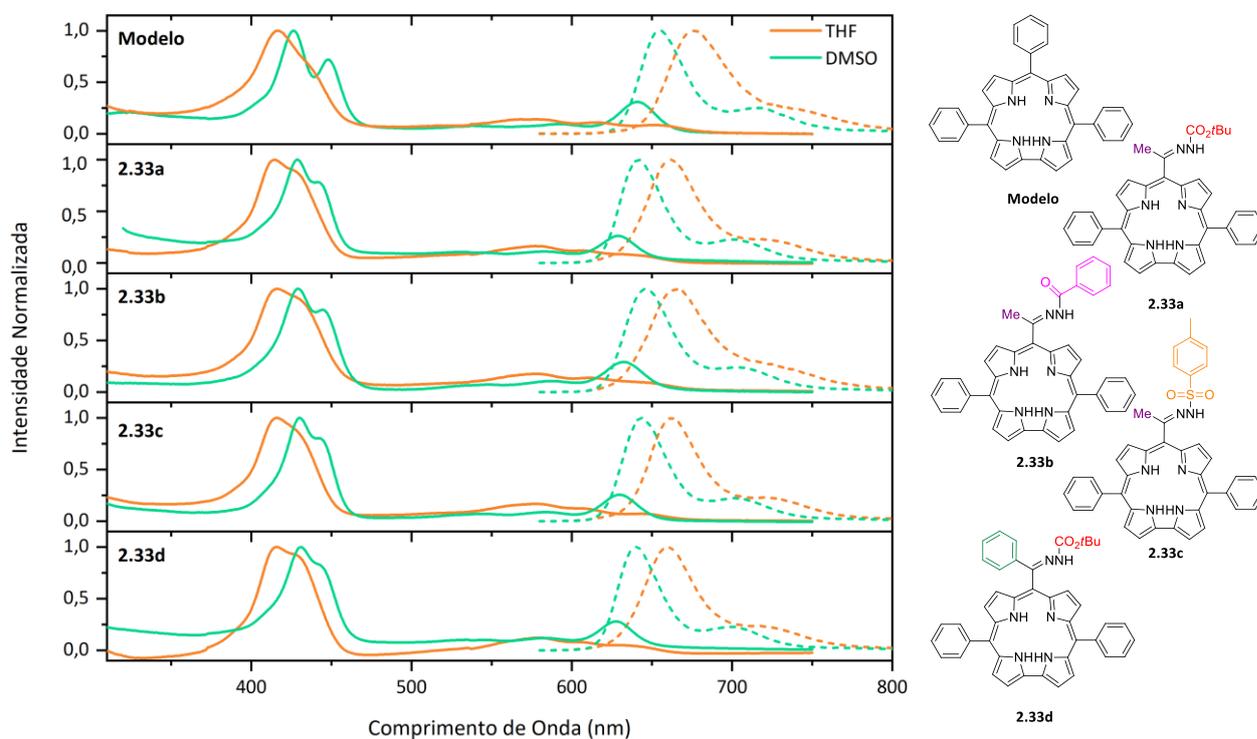


Figura 3.2. Espectros normalizados de absorção de UV-Vis e de fluorescência dos corróis Modelo, **2.33a**, **2.33b**, **2.33c** e **2.33d**, em THF e DMSO.

Na figura 3.3, estão representados os espectros dos corróis sintetizados com o *meso*-(*p*-hidroxifenilo)dipirrometano *para* (**2.9**), em THF e DMSO.

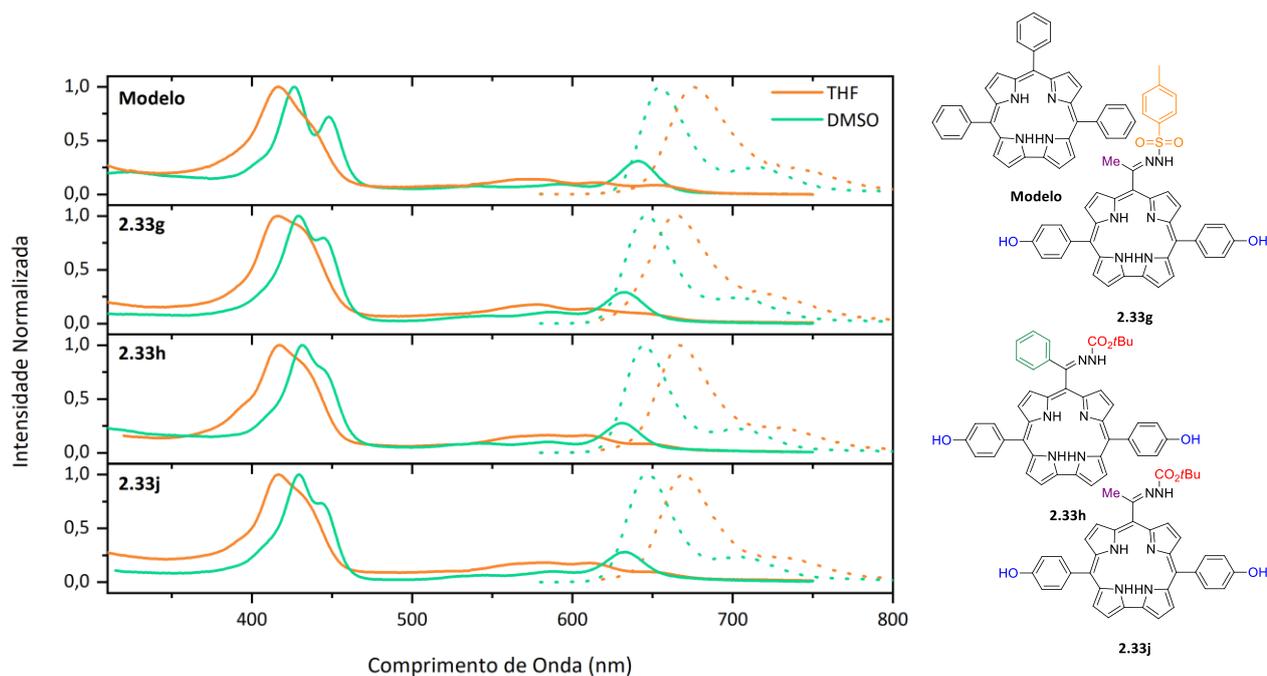


Figura 3.3. Espectros normalizados de absorção de UV-Vis e de fluorescência dos corróis Modelo, **2.33g**, **2.33h** e **2.33j**, em THF e DMSO.

Na figura 3.4, estão representados os espectros dos corróis sintetizados com o *meso*-(*m*-hidroxifenil)dipirrometano (**2.11**), em THF e DMSO.

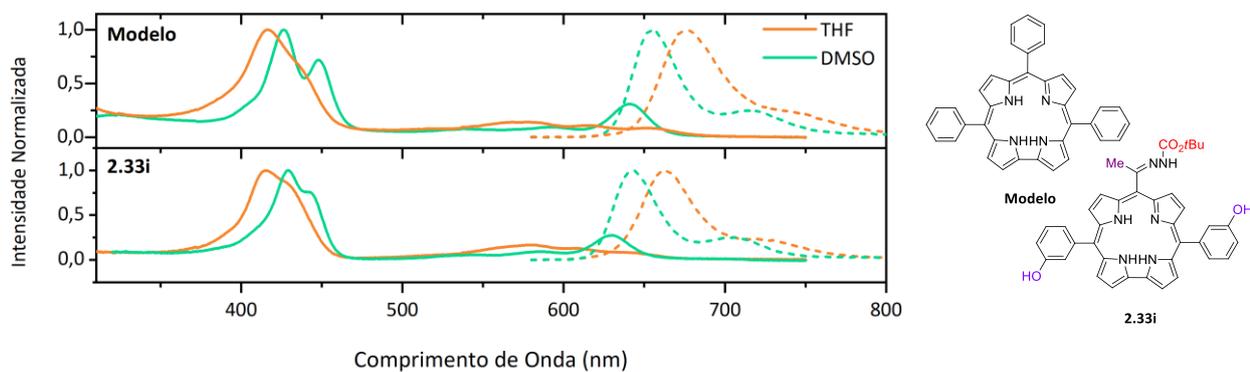


Figura 3.4. Espectros normalizados de absorção de UV-Vis e de fluorescência do corrole **2.33i**, em THF e DMSO.

Tabela 3.2. Resumo das propriedades fotofísicas dos corróis em THF e DMSO. Comprimento de onda de Absorção (λ^{abs}) e emissão (λ^{em}), e deslocamento de Stokes (Δ_{ss}) dos corróis.

Corrole	Solvente	λ^{abs} (nm)	λ^{em} (nm)	Δ_{ss} (cm ⁻¹)
Modelo	THF	416/572/616/653	677/740	543
	DMSO	427/542/593/642	656/718	332
2.33a	THF	414/578/607/635	661/722	619
	DMSO	429/537/583/629	642/699	323
2.33b	THF	416/578/612/648	667/733	440
	DMSO	429/547/587/632	645/705	319
2.33c	THF	416/578/608/647	662/731	350
	DMSO	429/544/581/631	644/699	320
2.33d	THF	416/580/605/634	659/721	598
	DMSO	431/536/582/627	640/698	324
2.33g	THF	419/583/611/653	670/735	389
	DMSO	431/545/587/632	648/710	391
2.33h	THF	417/581/608/649	667/735	416
	DMSO	430/545/585/630	644/703	345
2.33j	THF	416/581/611/651	669/735	413
	DMSO	429/543/587/632	645/707	319
2.33i	THF	415/580/609/642	662/727	471
	DMSO	429/542/585/630	644/705	345

Através da análise da figura 3.2, 3.3 e 3.4 e da tabela 3.2, podemos observar que a mudança de solvente de THF para DMSO provocou um desvio batocrómico da banda Soret (desvio para a região do vermelho). No entanto, todas as outras bandas sofreram um desvio hipsocrómico (desvio para a região do azul), sendo todos estes desvios aproximadamente com a mesma proporção. Para além deste efeito do solvente no espectro de absorção, também é possível observar um desvio hipsocrómico das bandas no espectro de fluorescência.

O DMSO demonstrou para além de um desvio hipsocrómico das bandas Q, um aumento de intensidade na última banda quando comparado com THF (Figura 3.5). Este efeito foi observado também em estudos descritos na literatura aquando da utilização de DMSO, mas também aquando da utilização de DMF, um solvente que apresenta uma constante dielétrica próxima do DMSO ($\epsilon' = 37.51$).¹⁰⁸

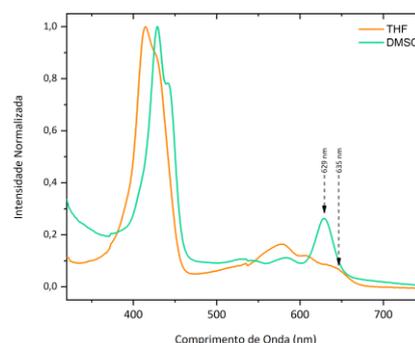


Figura 3.5. Espectro de absorção em THF e DMSO

No que diz respeito ao deslocamento de Stokes (Δ_{SS}), observamos uma diminuição deste com a alteração do solvente de THF para DMSO, em todos os casos exceto no caso do corrole **2.33g**.

Comparando as bandas dos corróis **2.33a**, **2.33i** e **2.33j**, observamos que o desvio das bandas na mudança de solvente ocorre proporcionalmente independentemente do substituinte dos grupos meso-arílicos. Quando fazemos a análise do deslocamento de Stokes nos diferentes solventes, podemos observar que há uma diferença mais significativa no caso do 5,15-difenilcorrole **2.33a** relativamente ao observado para o 5,15-di(*m*-hidroxifenil)corrole (**2.33i**) e para o 5,15-di(*p*-hidroxifenil)corrole (**2.33j**). O que indica que existe influência do grupo hidroxilo no deslocamento de Stokes. Comparando ainda os dados obtidos para os corróis **2.33i** e **2.33j**, em que a diferença ocorre na posição do grupo hidroxilo, observamos que não existe uma diferença significativa entre os valores do deslocamento de Stokes.

Quando observamos os dados dos corróis **2.33d** e **2.33h**, concluímos que estes vão ao encontro com o concluído anteriormente: a adição de um grupo hidroxilo nos grupos *meso*-arílicos diminui o efeito da polaridade no deslocamento de Stokes, em relação ao corrole com o grupo fenil não substituído.

Curiosamente, no caso dos corróis **2.33c** e **2.33g**, o obtido não corresponde ao espectável de acordo com os dados discutidos anteriormente. Ainda que no caso do **2.33c** ocorra uma diminuição do deslocamento de Stokes em DMSO comparando com o espectro em THF, esta é cerca de 10 vezes inferior à diminuição observada nos corróis **2.33a** e **2.33d**, a qual seria espectável manter a mesma ordem de grandeza, uma vez que possuem os mesmos substituintes *meso*-arílicos. No caso do corrole **2.33g** observamos que contrariamente a todos os outros corróis, este apresenta uma proximidade no valor do deslocamento de Stokes em DMSO e THF.

Nos corróis que possuem grupos nitro quer nos substituintes *meso*-arílicos e quer no substituinte N-arílico da hidrazona, os efeitos observados foram bastantes distintos de todos os outros corróis. No estudo destes corróis com THF e DMSO não foi possível observar uma resolução das bandas quer no espectro de absorção como no espectro de fluorescência. Assim, na tentativa de arranjar um solvente “ideal” para estes corróis, utilizou-se o tolueno como solvente (Figura 3.6).

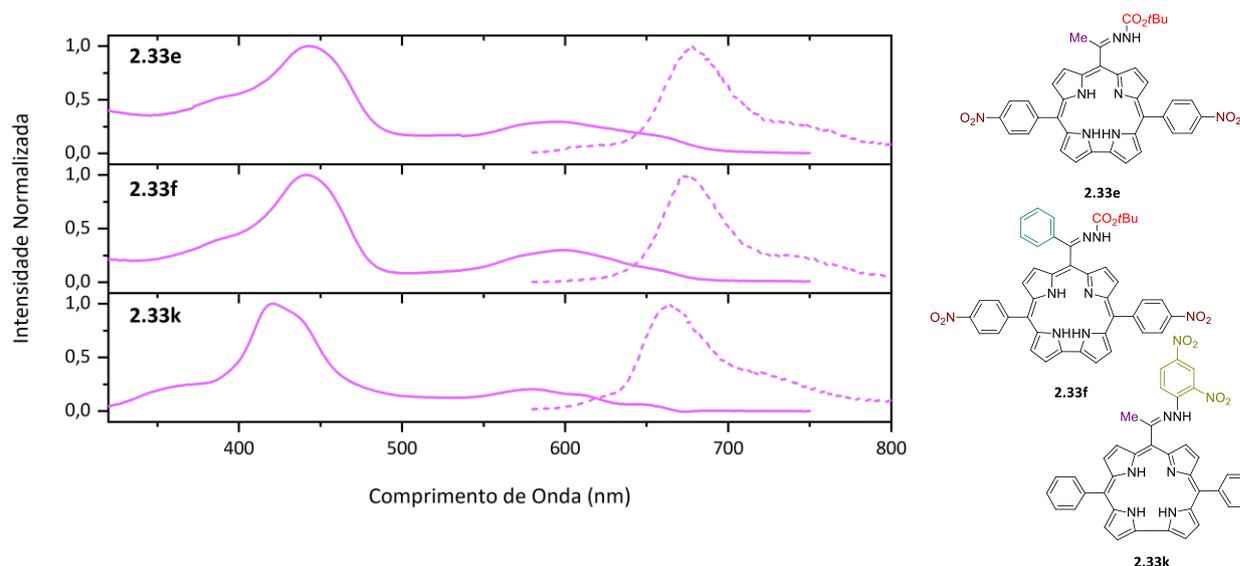


Figura 3.6. Espectros normalizados de absorção de UV-Vis e de fluorescência dos corróis **2.33e**, **2.33f** e **2.33k** em Tolueno.

Tabela 3.3. Resumo das propriedades fotofísicas dos corróis: **2.33e**, **2.33f** e **2.33k** em Tolueno. Comprimento de onda de Absorção (λ^{abs}) e emissão (λ^{em}), e deslocamento de Stokes (Δ_{ss}) dos corróis.

Corrole	λ^{abs} (nm)	λ^{em} (nm)	Δ_{ss} (cm ⁻¹)
2.33e	443/596/658 (sh)	678/752	2029
2.33f	442/599/659 (sh)	675/745	1880
2.33k	421/579/611/652	665/728	300

Nos corróis contendo grupos *p*-nitrofenilo (**2.33e** e **2.33f**) observamos um espectro de absorção distinto dos outros corróis. Nestes, as bandas Q não apresentam uma boa resolução, fazendo com que apenas sejam identificadas duas bandas, sendo que uma delas se apresenta como um ombro (sh). Para além deste efeito nas bandas Q, a banda Soret aparece mais desviada para a região do vermelho como uma banda larga e não afunilada como nos corróis observados anteriormente. O deslocamento de Stokes destes compostos também é muito superior aos observados para os derivados anteriormente estudados. No entanto, não é possível fazer uma comparação exata entre estes e os corróis anteriores, uma vez que o solvente utilizado é diferente, e sabemos *à priori* que o solvente tem influência no comportamento dos corróis.

O corrole **2.33k**, foi estudado em tolueno uma vez que este não apresentava fluorescência quer em DMSO como em THF. No entanto, ao analisar os dados deste corrole concluímos que este apresenta um espectro de absorção e de fluorescência distinto dos demais.

3.2.3. Rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ_F)

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados com recurso ao método da esfera integradora (método absoluto), nos mesmos solventes estudados no capítulo 3.1.2. Os valores absolutos dos rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) são apresentados na tabela 3.4. Foram realizados três réplicas dos ensaios, sendo os valores apresentados resultantes da média dessas medidas.

Através da análise da tabela 3.6, observa-se que em DMSO, se obtém valores de ϕ_F mais elevados, em todos os compostos estudados. À excepção dos coróis **2.33c** e **2.33g**, todos os outros apresentam um valor superior para cerca do dobro do rendimento quântico de fluorescência em DMSO, comparativamente com os valores observados em THF. No caso dos coróis **2.33c** e **2.33g** o aumento verificado é de 2.5 e 3 vezes superior, respetivamente. Posto isto, podemos concluir que a presença dum substituinte *N*-tosilo na hidrazona tem um impacto superior relativamente a outro tipo de substituição na mesma posição na diferença de rendimento quântico de fluorescência em função do solvente.

No caso do corrole modelo, este apresenta igualmente um aumento do rendimento quântico de fluorescência em DMSO comparativamente aos valores observados em THF.

Tabela 3.4. Rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) e tempos de vida (τ_1) à temperatura ambiente com $\lambda_{exc}=460$ nm, em diferentes solventes $\lambda_{em}=650$ nm. Valores da constante radiativa (k_F) e não radiativa (k_{NR}) para os diferentes solventes.

Corrole	Solvente	ϕ_F	τ_1 (ns)	C_1 (%)	τ_2 (ns)	C_2 (%)	$^a)k_F$ $\times 10^{-7} (s^{-1})$	$^b)k_{NR}$ $\times 10^{-8} (s^{-1})$
Modelo	THF	0.120	0.71	4	4.04	96	2.97	2.18
	DMSO	0.220	-	-	4.14	100	5.31	1.88
2.33a	THF	0.140	-	-	4.38	100	3.20	1.96
	DMSO	0.267	-	-	4.40	100	6.08	1.67
2.33b	THF	0.111	0.89	4	3.71	96	3.00	2.40
	DMSO	0.211	0.18	3	4.11	97	5.13	1.92
2.33c	THF	0.114	1.43	4	4.46	96	2.56	1.99
	DMSO	0.282	-	-	4.40	100	6.42	1.63
2.33d	THF	0.159	-	-	4.86	100	3.28	1.73
	DMSO	0.298	-	-	4.56	100	6.54	1.54
2.33e	Tolueno	0.195	-	-	4.65	100	4.19	1.73
2.33f	Tolueno	0.197	-	-	4.89	100	4.03	1.64
2.33g	THF	0.073	1.05	19	2.93	81	2.49	3.16
	DMSO	0.212	0.82	6	4.06	94	5.21	1.94
2.33h	THF	0.118	-	-	3.72	100	3.17	2.37
	DMSO	0.234	-	-	4.08	100	5.74	1.88
2.33i	THF	0.133	0.39	5	3.90	95	3.40	2.22
	DMSO	0.283	-	-	4.33	100	6.54	1.66
2.33j	THF	0.114	0.22	5	3.02	95	3.76	2.94
	DMSO	0.249	0.38	3	4.05	97	6.14	1.86
2.33k	Tolueno	0.002	-	-	4.79	100	0.04	2.08

*O χ^2 para todos os decaimentos foi inferior a 1.09.

Com o intuito de conhecer melhor a dinâmica do estado excitado dos corróis apresentados, estudou-se o comportamento do decaimento de fluorescência nos diferentes solventes. Os tempos de vida de fluorescência do primeiro estado singuleto excitado (τ_F) foram obtidos através da técnica TCSPC, à temperatura ambiente. Os estudos de fluorescência resolvida temporalmente, foram adquiridos obtendo-se os decaimentos na região de emissão a 650 nm. A resolução temporal alcançada com o *setup* utilizado foi na ordem dos nanossegundos (ns). De modo a demonstrar o perfil dos decaimentos obtidos, na figura 3.6, encontram-se representados os tempos de vida e os

fatores pré-exponenciais obtidos dos decaimentos de fluorescência determinados para o corrole **2.33i** em THF e DMSO.

Através da análise das curvas de decaimento do corrole **2.33i**, podemos concluir que em THF estas são ajustadas com leis bi-exponenciais enquanto que em DMSO são ajustadas a leis mono-exponenciais. Os tempos de decaimento, assim como os fatores pré-exponenciais, apresentados como porcentagem de contribuição, de acordo com o respectivo solvente encontram-se na tabela 3.4.

Em THF observamos que existe uma maior prevalência de decaimentos bi-exponenciais. O tempo de decaimento mais longo (entre 2.93-4.46 ns) é predominante, como podemos observar a partir dos valores elevados dos fatores pré-exponenciais (81-96%), o que indica que este apresenta uma maior contribuição. Um tempo de vida mais curto (entre 0.22-1.4 ns) apresenta uma contribuição inferior (4-19%), o que permite identificar a presença de uma segunda espécie. No caso do corrole **2.33g**, observamos um comportamento distinto comparativamente com os outros compostos, uma vez que este apresenta uma predominância muito mais elevada da espécie com menor contribuição. Este resultado pode ser justificado pela formação em maior quantidade de outra espécie.

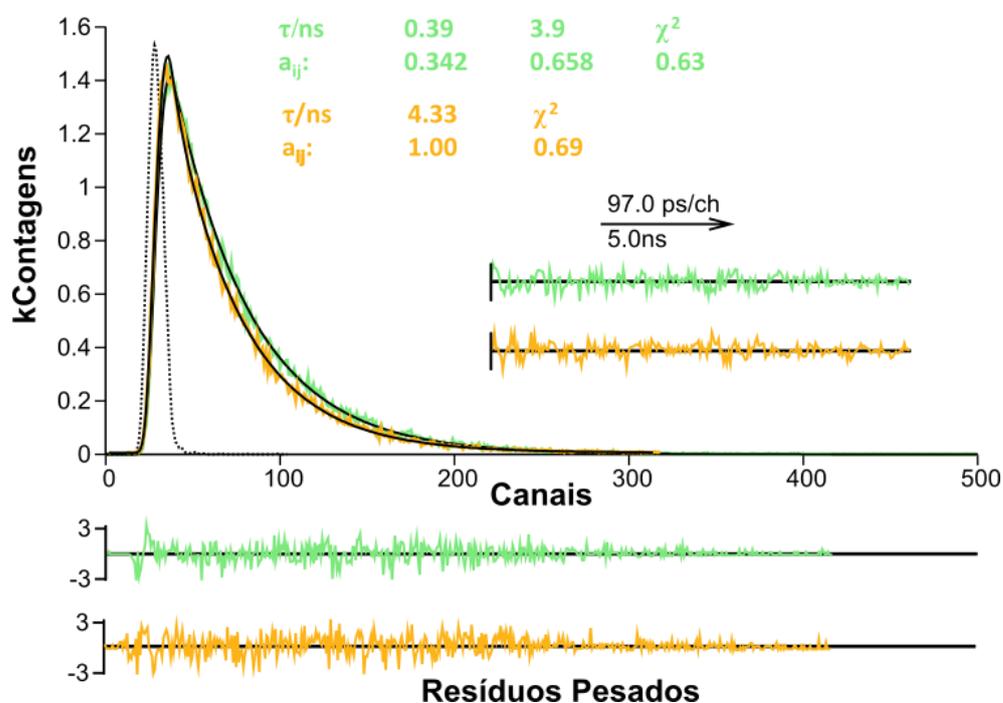


Figura 3.7. Curvas de decaimento de emissão de fluorescência do composto **2.33i** em THF (laranja) e DMSO (verde), juntamente com a dependência dos valores dos tempos de decaimento e dos fatores pré-exponenciais, obtidos da análise individual dos decaimentos. A função de autocorrelação (A.C.), os resíduos pesados e o valor de χ^2 permitem uma avaliação da qualidade do ajuste.

Ao contrário do que foi observado em THF, existe uma maior prevalência de decaimentos mono-exponenciais em DMSO. Isto demonstra que na maioria dos casos, em DMSO apenas uma espécie é responsável pelo tempo de vida de fluorescência. Nos casos em que se observa um decaimento bi-exponencial, a contribuição da segunda espécie é bastante inferior (entre 3-6%), representando uma contribuição residual para a emissão de fluorescência no comprimento de onda onde foi colhido o decaimento.

Analisando ao detalhe os resultados nos diferentes solventes, podemos observar que nos corróis **2.33g** e **2.33j**, existe uma grande diferença relativamente ao tempo de vida em THF e DMSO. Com isto, podemos concluir que em ambos os casos, a espécie com maior contribuição não é a mesma para os solventes apresentados.

Através da determinação dos valores de ϕ_F e τ_F de todos os corróis, foi possível calcular as constantes cinéticas, radiativas e não radiativas, para a desativação do estado eletronicamente excitado singuleto, nos diferentes solventes. Nos casos em que se obtiveram decaimentos bi-exponenciais, foi utilizado para a determinação das constantes radiativas e não radiativas, o tempo de vida mais longo, dado ser a espécie predominante, ou seja, com maior contribuição.

Na tabela 3.4 os valores obtidos para as constantes de velocidade radiativas (k_F) e não radiativas (k_{NR}), permitem concluir que o solvente influencia o valor da constante radiativa, no entanto, na maioria dos casos não apresenta influência significativa na constante não radiativa. A alteração do solvente de THF para DMSO faz aumentar a constante de velocidade radiativa para cerca do dobro em todos os casos. Por outro lado, a constante de velocidade não radiativa parece ser influenciada pelo substituinte no dipirrometano. Nos corróis com o grupos *meso*-fenilo não é observado influência do solvente na constante de velocidade não radiativa. Porém, nos corróis funcionalizados com grupos *meso*-hidroxifenilo, com o hidroxilo quer em posição *meta* quer em *para*, apresentam uma maior influência do solvente na constante de velocidade não radiativa, fazendo com que haja uma diminuição desta. Salienta-se ainda que, a conjugação de grupos *meso*-(*p*-hidroxifenilo) com hidrazonas que possuem o grupo metilo na posição R¹ (corróis **2.33g** e **2.33j**), são os que apresentam maior influência do solvente na constante de velocidade não radiativa.

A constante não radiativa, k_{NR} , é para todos os compostos superior (cerca de 5 a 12 vezes mais) do que a constante radiativa, k_F , em THF. Em DMSO observa-se também que a constante não radiativa é superior à constante radiativa (cerca de 2 a 4 vezes mais), ainda que inferior à diferença observada em THF. Com esta informação, podemos observar que em THF existe uma maior perda

de energia proveniente do processo de excitação em processos não emissivos, do que em DMSO. Estes dados vão de encontro com o que foi verificado nos rendimentos quânticos de fluorescência, que eram superiores em DMSO do que em THF.

3.2.4. Caracterização do estado excitado tripleto: Formação de Oxigénio Singuleto (ϕ_{Δ})

A capacidade que os macrociclos possuem de converter o oxigénio no estado fundamental em oxigénio no estado excitado singuleto, através da energia fornecida pelo feixe luminoso, é expressa quantitativamente pelo rendimento quântico de geração de oxigénio singuleto (ϕ_{Δ}). Tal como referenciado no Capítulo 1.2.2, o oxigénio é um dos componentes principais para a atividade em PDT. Assim, pretende-se que este parâmetro seja o mais elevado possível, para uma melhor eficácia do fotossensibilizador. No entanto, é necessário ter em conta que a determinação destes valores é efetuada em solventes orgânicos e não em solventes aquosos ou até mesmo em sistemas biológicos.

Com o intuito de medir o rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto em THF, utilizou-se como referência a *meso*-tetrafenilporfirina ($\phi_{\Delta} = 0.60$).

Na figura 3.8, podemos observar o perfil da curva da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) e do corrole **2.33d**, a título de exemplo, assim como a área utilizada para o cálculo do rendimento de formação de oxigénio singuleto.

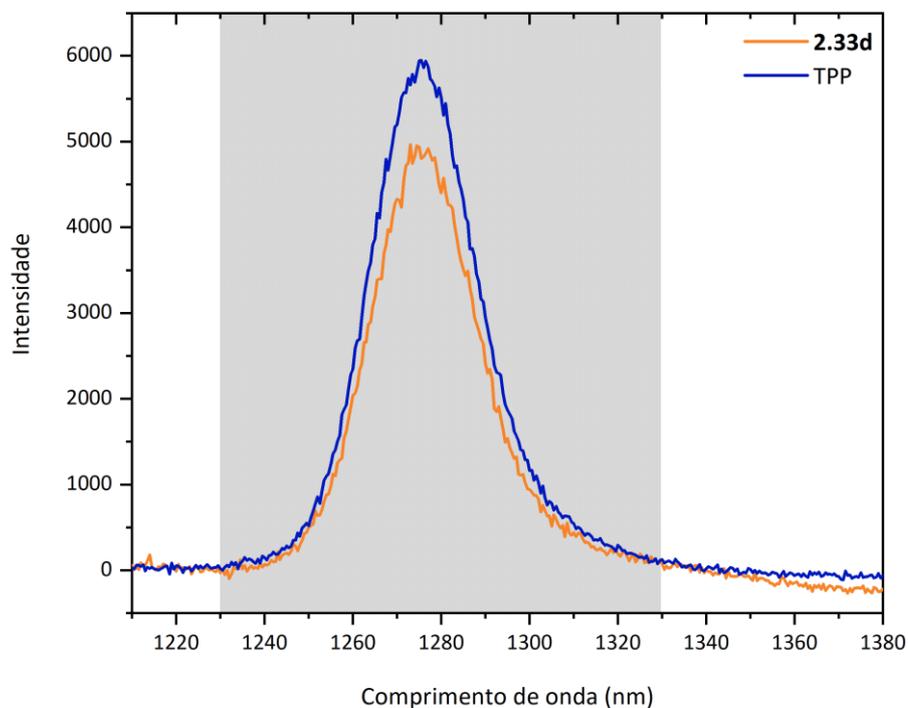


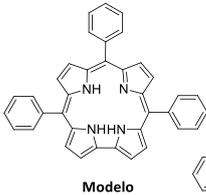
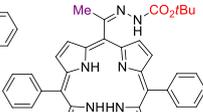
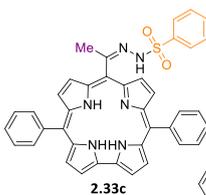
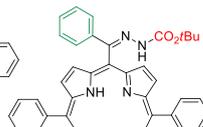
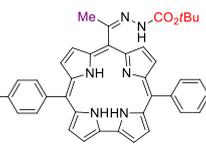
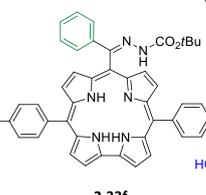
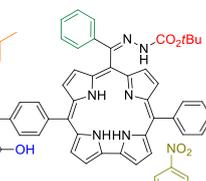
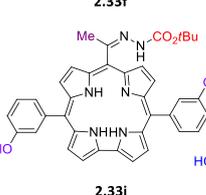
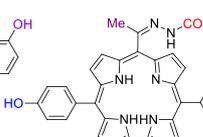
Figura 3.8. Perfil do espectro de emissão do oxigénio singuleto formado pela tetrafenilporfirina, TPP, usada como referência e do corrole **2.33d**.

Na tabela 3.5 estão representados os rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto \pm o desvio padrão, obtidos em triplicado.

Através da análise destes dados, podemos observar que o corrole **2.33d** é o que apresenta um maior rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto. Ao contrário dos dados obtidos nos estudos apresentados anteriormente, o rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto não é influenciado de forma direta quer aos substituintes da hidrazona, quer ao substituinte do dipirrometano. Ainda assim, podemos observar que todos os corróis à exceção do **2.33a**, **2.33d** e **2.33k** apresentam rendimentos de formação de oxigénio singuleto semelhantes ao corrole modelo.

Os corróis **2.33e** e **2.33f**, não apresentaram formação de oxigénio singuleto quando estudados em THF. Dado que, estes corróis estão num solvente distinto dos demais, não é correto fazer uma comparação direta com estes. No entanto, comparando-os entre eles, podemos observar que há um rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto mais elevado em corróis tendo um grupo fenilo na posição R² da hidrazona. Tal efeito é também observado quando comparamos os corróis **2.33a** e **2.33d**, os quais também diferem entre eles pela posição R² da hidrazona.

Tabela 3.5. Rendimentos quânticos de formação de oxigénio molecular de todos os corróis sintetizados no respetivo solvente.

Corrole	Solvente	ϕ_{Δ}	
Modelo	THF	0.22 ± 0.07	
2.33a	THF	0.39 ± 0.02	
2.33b	THF	0.11 ± 0.01	
2.33c	THF	0.26 ± 0.03	
2.33d	THF	0.46 ± 0.03	
2.33e	Tolueno	0.22 ± 0.01	
2.33f	Tolueno	0.31 ± 0.01	
2.33g	THF	0.19 ± 0.02	
2.33h	THF	0.21 ± 0.02	
2.33i	THF	0.26 ± 0.01	
2.33j	THF	0.18 ± 0.01	
2.33k	Tolueno	-	

3.3. Conclusão

Neste capítulo pretendia-se avaliar as características fotofísicas dos corróis sintetizados no capítulo 2.

Começou por se avaliar a sua capacidade de absorver energia a partir da determinação do coeficiente de absorvidade molar e posteriormente o estudo da fluorescência dos corróis. Dos resultados obtidos podemos concluir que existe uma forte influência da polaridade do solvente utilizado.

Na determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência, observou-se que em DMSO, se obtém valores de ϕ_F mais elevados do que os valores obtidos em THF, para todos os compostos estudados, sendo possível concluir que a estrutura da hidrazona tem impacto na diferença de rendimento quântico de fluorescência em função do solvente.

Nos tempos de vida de fluorescência, observamos que existe uma maior prevalência de decaimentos bi-exponenciais em THF, sendo que uma das espécies tem uma contribuição maioritária comparativamente com a outra. As constantes de velocidade radiativas e não radiativas, permitiram concluir que o solvente influencia o valor da constante radiativa, no entanto, na maioria dos casos não apresenta influência significativa na constante não radiativa.

Os corróis apresentaram uma boa capacidade de formação de oxigénio singuleto. Os resultados obtidos demonstraram que a formação de oxigénio singuleto não está diretamente ligado com os substituintes *meso*-arílicos mas sim com o grupo substituinte da posição R² da hidrazona, observando-se que a presença do grupo fenilo nesta posição leva a um rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto mais elevado.

Assim, podemos concluir que os corróis estudados têm propriedades que os possibilitam ser bons fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica.

Capítulo 4

Estudios biológicos
in Vitro

Capítulo 4.

4. Estudos biológicos in Vitro

4.1. Fotocitotoxicidade e citotoxicidade no escuro

Após a síntese e caracterização fotofísica dos corróis, pretendeu-se avaliar a sua fotocitotoxicidade e citotoxicidade no escuro nas linhas celulares A549 e H1299, de modo a comprovar o seu potencial efeito terapêutico. Para esta avaliação realizaram-se ensaios de MTT. Esta técnica fornece uma indicação do estado metabólico, com contribuição principal de enzimas mitocondriais.¹⁰⁹

Todas as estruturas dos corróis referenciados neste capítulo podem ser consultadas no capítulo 6.1.2.

4.1.1. Fotocitotoxicidade

Os resultados experimentais obtidos pelo ensaio de MTT, foram ajustados ao modelo sigmóide de dose-resposta. Em todos os casos apresentados a avaliação metabólica foi realizada 24 h após o tratamento. O IC_{50} foi calculado a partir da equação da curva, calculando-se o ponto médio.

Na figura 4.1 podemos observar o efeito da conjugação de diferentes dipirrometanos com a hidrazona **2.15a** na atividade fotocitotóxica. Na linha celular A549 os corróis **2.33a**, **2.33e**, **2.33i** e **2.33j** apresentaram um IC_{50} de 94.88 nM, 747.7 nM, 139.5 nM e 412.6 nM, respetivamente. Na linha celular H1299 estes mesmo corróis apresentaram valores de IC_{50} de 24.98 nM, 310.2 nM, 67.50 nM e 144.7 nM, respetivamente. Os valores de IC_{50} e respetivos intervalos de confiança a 95% ($CI_{95\%}$) estão representados na Tabela 4.1.

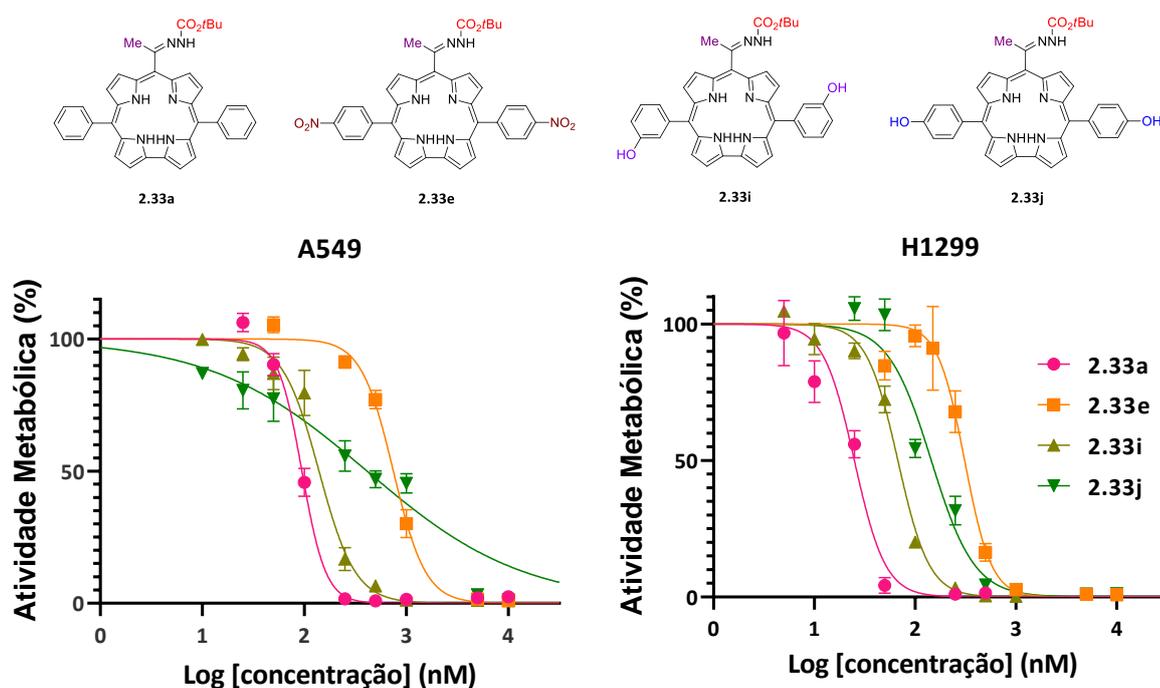


Figura 4.1. Curvas de dose-resposta dos corróis **2.33a**, **2.33e**, **2.33i** e **2.33j**, nas linhas celulares A549 e H1299, 24 h após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Em todos os casos observamos que o valor de IC_{50} na linha celular H1299 é inferior ao correspondente valor observado na linha celular A549. Para além disso, podemos também observar que o IC_{50} é menor quando se conjuga a hidrazona **2.15a** com o DP **2.3** (corrole **2.33a**). A posição do grupo hidroxilo nos substituintes *meso*-arílicos também conduz a mudanças significativas no IC_{50} . Na linha celular A549 a alteração do grupo hidroxilo da posição *meta* para a posição *para* faz com que o IC_{50} seja cerca de três vezes superior, enquanto que na linha celular H1299 é cerca duas vezes superior.

Na figura 4.2 está representado o efeito da conjugação de diferentes dipirrometanos com a hidrazona **2.24**. Na linha celular A549 os corróis **2.33d**, **2.33f** e **2.33h** apresentaram um IC_{50} de 948.0 nM, 2114 nM e 89.31 nM, respetivamente. Enquanto que, na linha celular H1299 estes mesmo corróis apresentaram valores de IC_{50} de 538.1 nM, 2359 nM e 56.12 nM, respetivamente. Os valores de IC_{50} e respetivos intervalos de confiança a 95% ($CI_{95\%}$) estão representados na Tabela 4.1.

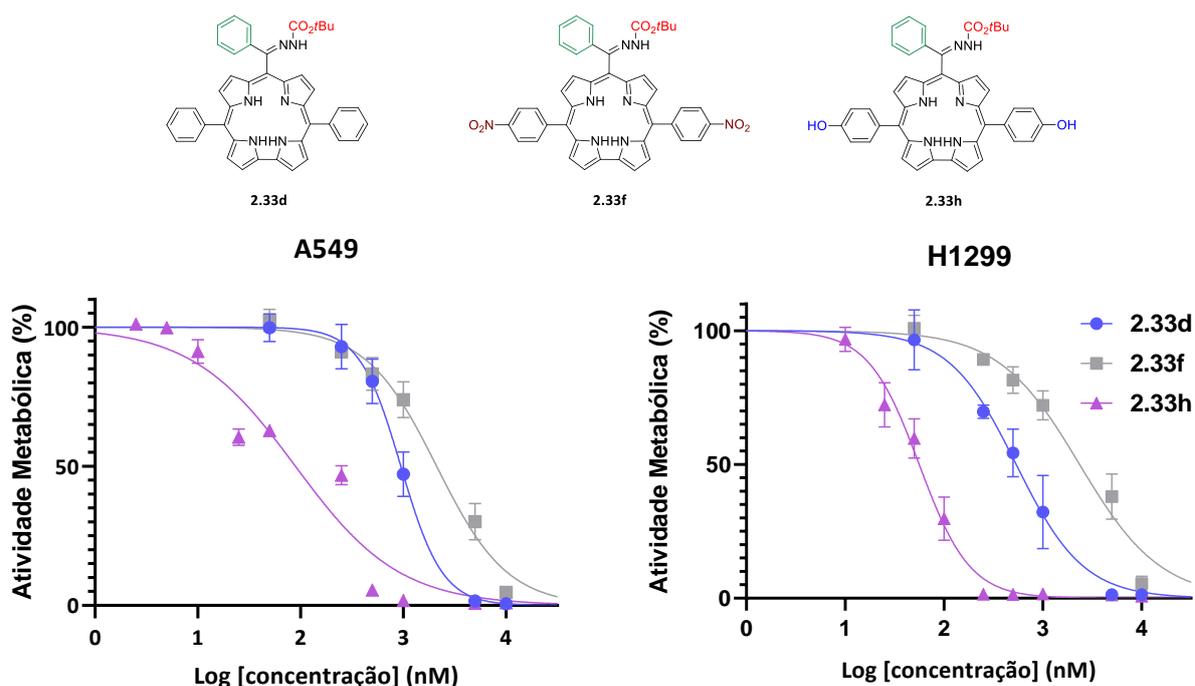


Figura 4.2. Curvas de dose-resposta dos corróis **2.33d**, **2.33f** e **2.33h**, nas linhas celulares A549 e H1299, 24 h após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Tal como observado nos compostos anteriores, os corróis **2.33d** e **2.33h** também apresentam um IC_{50} inferior na linha celular H1299. No caso do corrole **2.33f**, observa-se que o IC_{50} é superior na linha celular H1299, ainda que a diferença seja pouco significativa. Ao contrário do que foi observado nos compostos derivados da hidrazona **2.15a**, a conjugação da hidrazona **2.24** com o DP **2.3** não resultou num corrole com maior atividade fotodinâmica dentro desta gama de compostos. O corrole **2.33h** apresenta um IC_{50} de cerca de 10 vezes inferior em ambas as linhas, comparativamente com o corrole **2.33d**. Assim, no caso da hidrazona **2.24**, a conjugação mais eficaz para uma melhor atividade fotodinâmica é obtida aquando da sua conjugação com o DP **2.9**.

Na figura 4.3 é possível observar o efeito da conjugação de diferentes dipirrometanos com a hidrazona **2.15d**. Na linha celular A549 os corróis **2.33c** e **2.33g** apresentaram um IC_{50} de 101.1 nM e 891.5 nM, respetivamente. Na linha celular H1299 estes mesmo corróis apresentaram valores de IC_{50} de 52.27 nM e 276.8 nM, respetivamente. Os valores de IC_{50} e respetivos intervalos de confiança a 95% ($CI_{95\%}$) estão representados na Tabela 4.1.

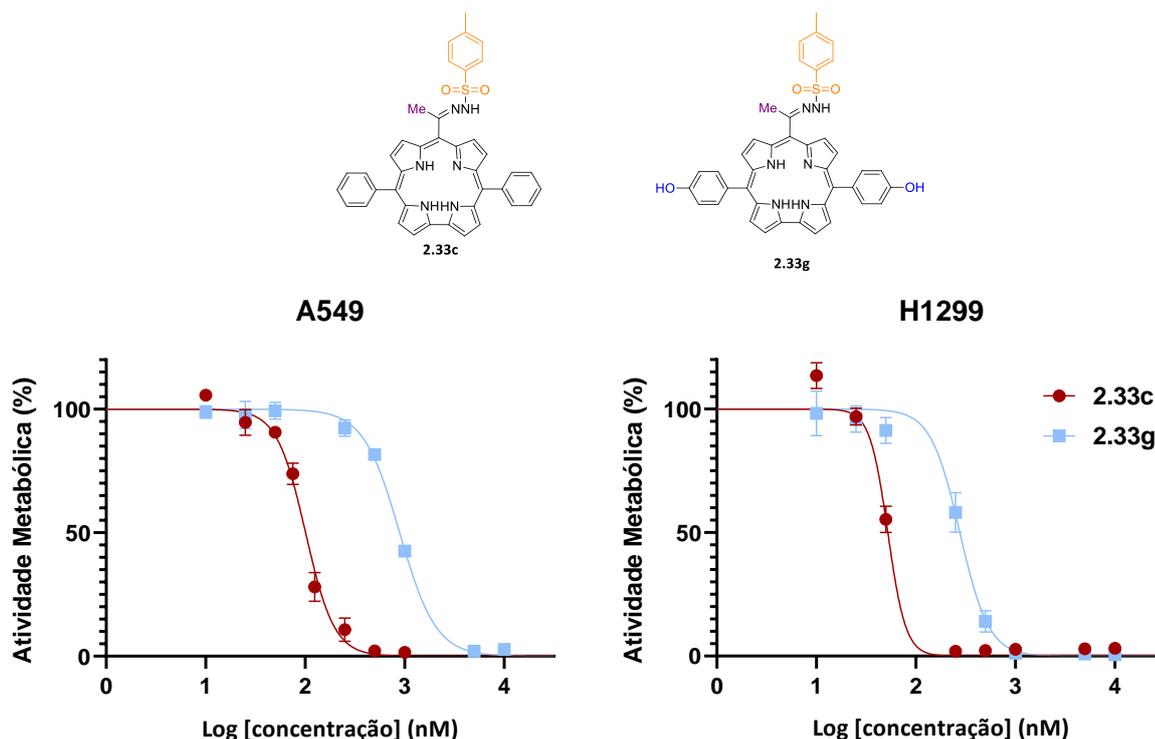


Figura 4.3. Curvas de dose-resposta dos corróis **2.33c** e **2.33g**, nas linhas celulares A549 e H1299, 24 h após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Novamente podemos observar que o IC₅₀ apresenta valores mais baixos na linha celular H1299, assim como uma melhor atividade fotodinâmica aquando da conjugação da hidrazona **2.15d** com o DP **2.3** (corrole **2.33c**).

Para os estudos apresentados, a hidrazona **2.15c** apenas foi conjugada com o dipirrometano **2.3**, onde os resultados são representados na figura 4.4. Na linha celular A549 o corrole **2.33b** apresentou um IC₅₀ de 803.0 nM. Enquanto que, na linha celular H1299 estes apresentou um valor de IC₅₀ de 164.0 nM. Os valores de IC₅₀ e respetivos intervalos de confiança a 95% (CI_{95%}) estão representados na Tabela 4.1. É de realçar que o corrole **2.33b** apresenta um valor de IC₅₀ na linha celular H1299 cerca de cinco vezes mais baixo quando comparado com o valor de IC₅₀ na linha celular A549.

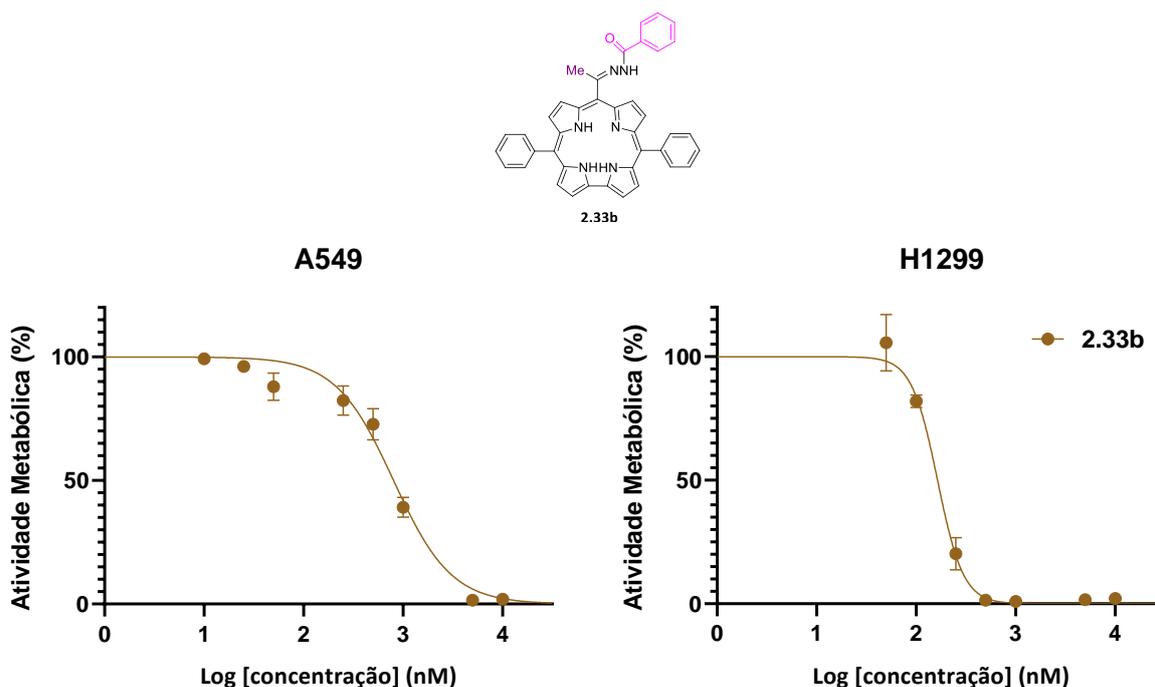


Figura 4.4. Curva de dose-resposta do corrole **2.33b**, nas linhas celulares A549 e H1299, 24 h após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Tabela 4.1. IC₅₀ e respectivos intervalos de confiança a 95% (CI_{95%}) dos diferentes coróis nas linhas celulares A549 e H1299, 24 h após o tratamento fotodinâmico.

Corrole	A549			H1299		
	IC ₅₀ (nM)	CI _{95%} (nM)	R ²	IC ₅₀ (nM)	CI _{95%} (nM)	R ²
2.33a	94.88	[87.96;102.7]	0.9877	24.98	[19.30;29.87]	0.9308
2.33b	803.0	[668.8;1003]	0.8701	164.0	[143.9;187.1]	0.9656
2.33c	101.1	[92.65;110.7]	0.9697	52.27	[49.44;57.66]	0.9670
2.33d	948.0	[791.7;1187]	0.9469	538.1	[386.6;750.0]	0.8479
2.33e	747.7	[684.9;817.6]	0.9836	310.2	[280.0;344.3]	0.9300
2.33f	2114	[1640;2731]	0.9486	2359	[1765;3174]	0.8433
2.33g	891.5	[827.3;969.9]	0.9737	276.8	[238.3;310.9]	0.9400
2.33h	89.31	[66.00;120.1]	0.8845	56.12	[47.37;66.80]	0.9212
2.33i	139.5	[122.2;158.9]	0.9633	67.50	[59.86;77.83]	0.9770
2.33j	412.6	[280.7;619.5]	0.8460	144.7	[119.2;175.5]	0.9413

O corrole com valores de IC₅₀ mais promissores é o corrole **2.33a**. Ainda assim, o corrole **2.33h** apresenta um valor de IC₅₀ mais baixo na linha celular A549 comparativamente com o corrole **2.33a**, embora que não significativo.

Após a análise dos resultados obtidos, podemos concluir que o grupo metil na posição R² da hidrazona beneficia a atividade fotodinâmica para corróis contendo grupos *meso*-fenilo. Por outro lado, a atividade fotodinâmica dos compostos com o grupo fenilo na posição R² é beneficiada com a presença de grupos *p*-hidroxifenilo nas posições *meso*.

Na figura 4.5 é apresentada a comparação entre o corrole **2.33a**, **2.33i** e o fotossensibilizador comercial Foscan[®]. É possível observar que os valores de IC₅₀ do Foscan[®] e dos corróis **2.33a** e **2.33i** são da mesma ordem de grandeza. Os resultados apresentados referente ao Foscan[®] foram realizados no instituto de biofísica da Faculdade de Medicina, com o mesmo procedimento dos demais.

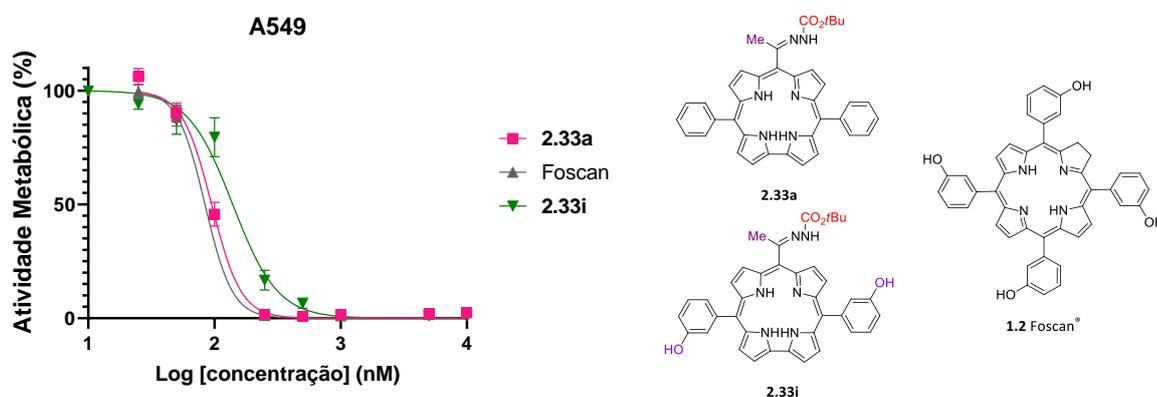


Figura 4.5. Curva de dose-resposta dos corróis **2.33a**, **2.33i** e do fotossensibilizador comercial Foscan[®], na linha celular A549, 24 h após o tratamento fotodinâmico. Os pontos experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos três ensaios.

Tabela 4.2. IC₅₀ e respetivos intervalos de confiança a 95% (CI_{95%}) dos diferentes corróis **2.33a**, **2.33i** e do fotossensibilizador comercial Foscan[®] na linha celular A549, 24 h após o tratamento fotodinâmico.

	A549		
	IC ₅₀ (nM)	CI _{95%} (nM)	R ²
2.33a	94.88	[87.96;102.7]	0.9877
2.33i	139.5	[122.2;158.9]	0.9633
Foscan	84.09	< 102.2	0.9915

Para além destes compostos, o corrole **2.33k** foi também estudado, sendo que este não apresentou qualquer fotocitotoxicidade.

4.1.2. Citotoxicidade no escuro

Foram também realizados ensaios de atividade metabólica de culturas celulares não submetidas a tratamento fotodinâmico, isto é, ensaios de citotoxicidade no escuro. Até 1 μM nenhum dos compostos apresentou um comportamento citotóxico significativo, pelo que apenas serão apresentados os resultados obtidos para as concentrações de 1, 5 e 10 μM .

O corrole **2.33a** não apresenta citotoxicidade significativa mesmo na concentração de 10 μM . Contudo, coróis contendo grupos fenilo substituídos nas posições *meso* apresentam alguma citotoxicidade nesta gama de concentrações. A 10 μM , o corrole **2.33e**, contendo grupos *meso*-(*p*-nitrofenilo), foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 49.14% e 53.41% nas linhas celulares A549 e H1299, respetivamente.

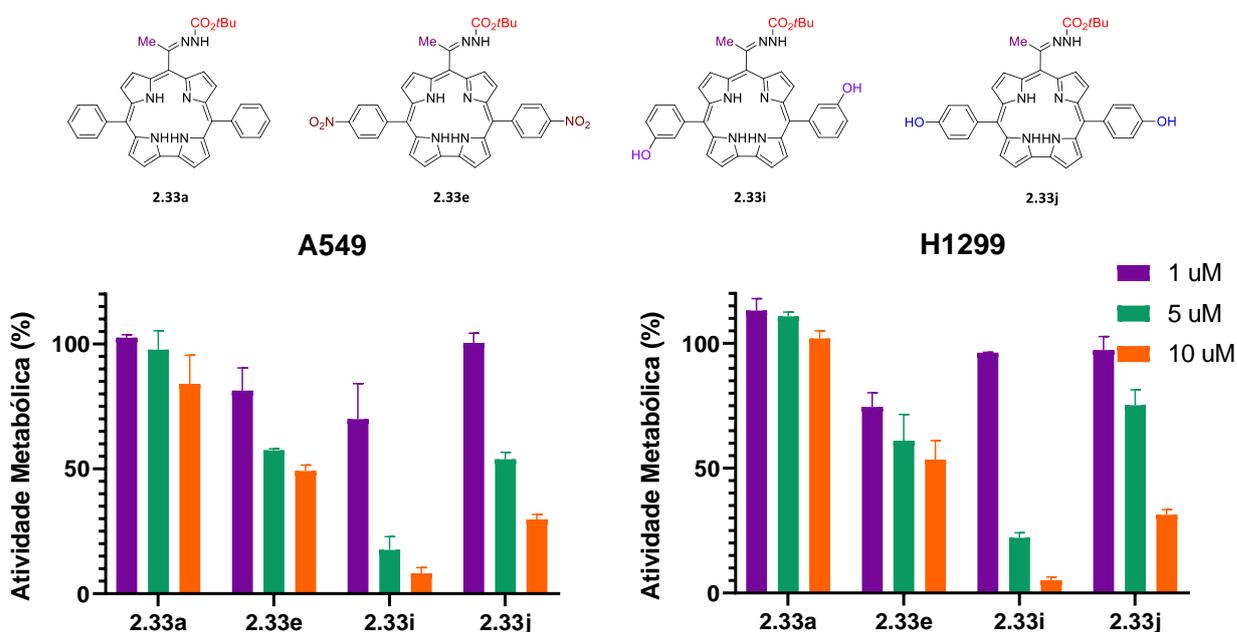


Figura 4.5. Atividade metabólica dos coróis **2.33a**, **2.33e**, **2.33i** e **2.33j** não submetidos a irradiação, nas linhas celulares A549 e H1299. Os resultados experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos dois ensaios.

No corrole **2.33i**, é observada uma elevada diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas celulares, nas concentrações de 5 e 10 μM . Na linha celular A549, este foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 17.52% e 8.11%, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respetivamente. Na linha celular H1299, este provoca uma redução da viabilidade celular em 22.17% e 5.19%, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respetivamente. Ainda que este composto apresente uma elevada citotoxicidade no escuro, esta não compromete a sua atividade como fotossensibilizador, uma vez

que as concentrações às quais apresenta esta citotoxicidade são muito elevadas comparativamente com o IC₅₀ deste composto.

A alteração da posição do grupo hidroxilo da posição *meta* para a posição *para*, determina uma redução da citotoxicidade no escuro. Na linha celular A549 o corrole **2.33j** leva a uma redução da viabilidade celular em 53.81% e 29.78%, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, respetivamente, e de 75.23% e 31.34%, respetivamente, na linha celular H1299.

O composto **2.33d**, não apresenta citotoxicidade significativa. Tal como observado no corrole **2.33e**, o corrole **2.33f** também apresenta uma redução de viabilidade celular de 48.37% e 51.15%, nas linhas celulares A549 e H1299, respetivamente, a uma concentração de 10 μ M. O corrole **2.33h** apresenta uma citotoxicidade inferior à observada para o corrole **2.33j**, para uma concentração de 10 μ M, estes apresentam uma redução da viabilidade celular de 64.69% e 52.71%, nas linhas celulares A549 e H1299, respetivamente.

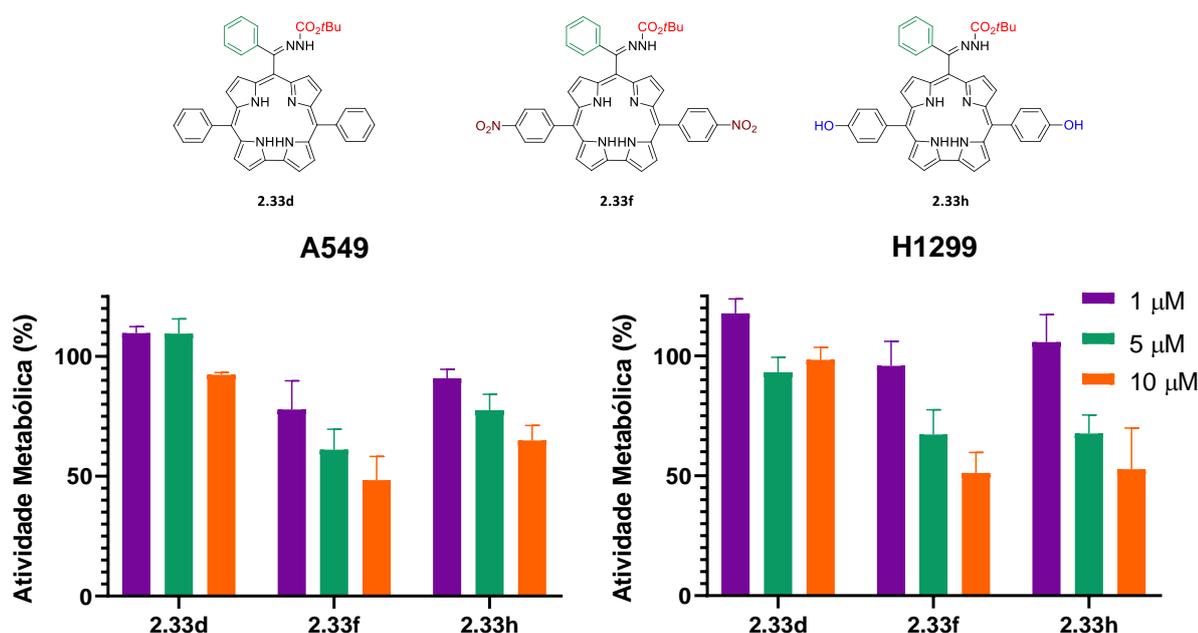


Figura 4.6. Atividade metabólica dos coróis **2.33d**, **2.33f** e **2.33h** não submetidos a irradiação, nas linhas celulares A549 e H1299. Os resultados experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos dois ensaios.

O corrole **2.33c** não apresenta citotoxicidade no escuro na linha celular H1299, e na linha celular A549 leva a uma pequena redução da viabilidade celular na concentração de 10 μ M, 73.8%. O corrole **2.33g** apresenta uma elevada citotoxicidade no escuro nas concentrações de 5 e 10 μ M, em

ambas as linhas celulares. Na linha celular A549, este foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 17.95% e 13.93%, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respectivamente. Na linha celular H1299, este provoca uma redução da viabilidade celular em 2.32% e 2.21%, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , respectivamente. Para além da citotoxicidade nestas duas concentrações, o corrole **2.33g** induz uma redução da viabilidade celular em 73.80% na linha celular A549, na concentração de 1 μM . Concentração esta relativamente próxima do IC_{50} para este composto nesta linha celular (891.5 nM), o que pode comprometer a sua eficiência como fotossensibilizador.

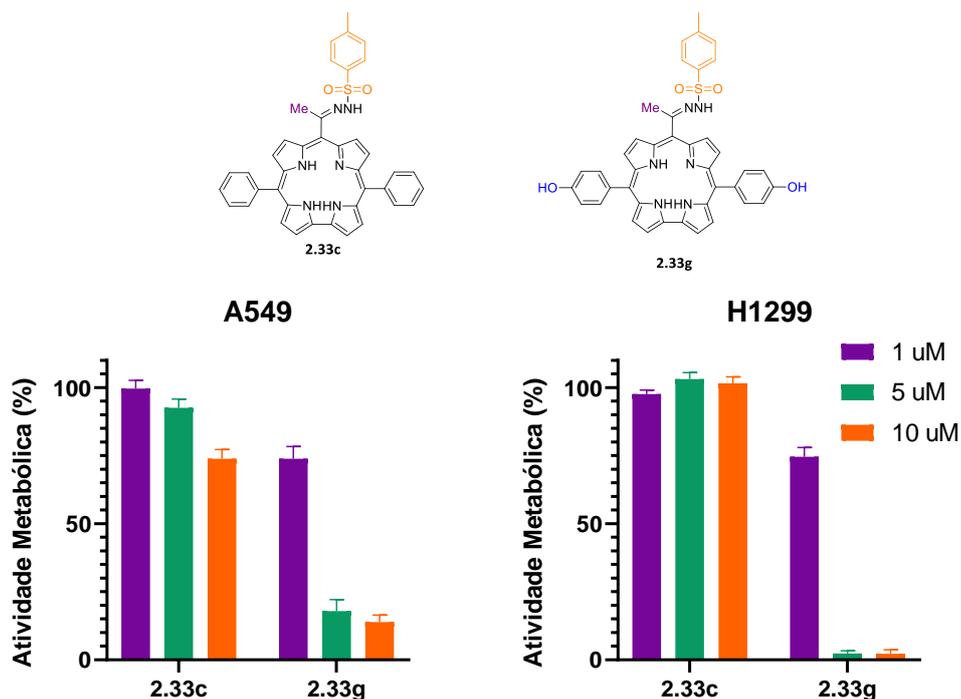


Figura 4.7. Atividade metabólica dos coróis **2.33c** e **2.33g** não submetidos a irradiação, nas linhas celulares A549 e H1299. Os resultados experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos dois ensaios.

O corrole **2.33b** não apresentou citotoxicidade no escuro em nenhuma das concentrações, em ambas as linhas celulares.

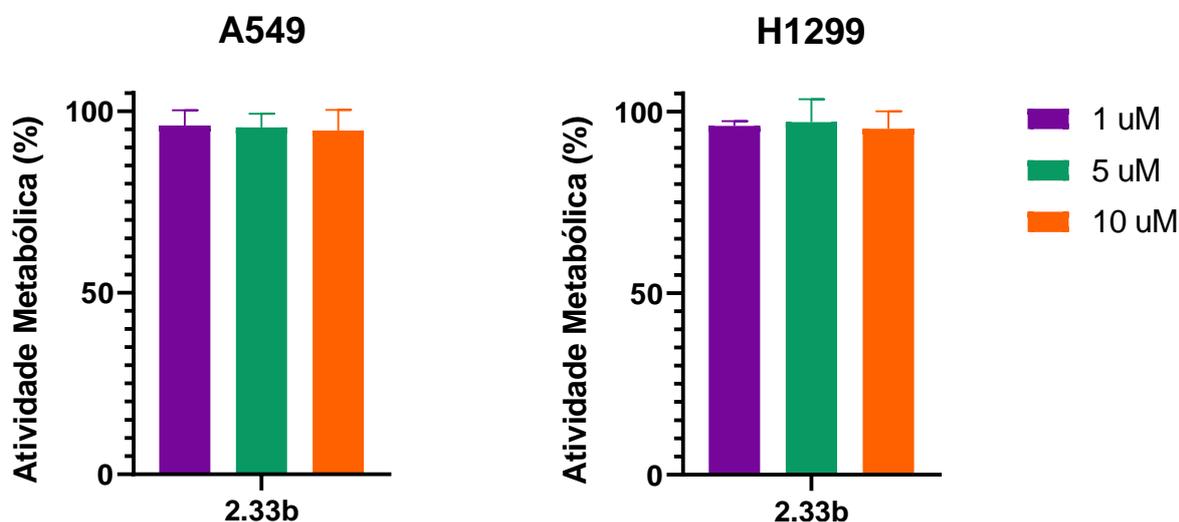
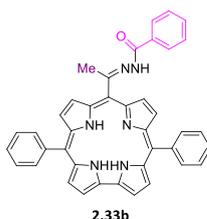


Figura 4.8. Atividade metabólica do corrole **2.33b** não submetido a irradiação, nas linhas celulares A549 e H1299. Os resultados experimentais representam a média e o desvio padrão de pelo menos dois ensaios.

Com os dados analisados anteriormente, podemos observar que a citotoxicidade no escuro dos corróis estudados está altamente relacionada com a presença de substituintes nos grupos *meso*-arílicos. Os corróis contendo grupos *meso*-fenílicos não apresentam citotoxicidade no escuro.

4.2. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que todos os corróis apresentam uma elevada fotocitotoxicidade e uma baixa- ou nenhuma-citotóxicidade. Podemos concluir que o grupo metil na posição R² da hidrazona beneficia a atividade fotodinâmica quando combinada com a presença de grupos fenilo nas posições *meso*. A atividade fotodinâmica dos compostos com o grupo fenilo na posição R² é beneficiada com a presença de grupos (*p*-hidroxifenilo) nas posições *meso*. No que diz respeito à citotoxicidade no escuro, esta está altamente relacionada com a presença de substituintes nos grupos *meso*-arílicos, sendo que os 5,15-difenilcorróis não apresentam citotoxicidade no escuro.

Capítulo 5

Conclusão e
Perspetivas Futuras

Capítulo 5

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com o intuito de cumprir o objetivo geral do projeto de mestrado foi utilizada uma nova reatividade para a síntese de novos corróis contendo um grupo hidrazona, onde foram sintetizados onze novos corróis trans-A₂B, fazendo variar tanto os substituintes das α,α-dihalohidrazonas como nos dipirrometanos. A caracterização fotofísica destes corróis permitiram identificar rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto motivadores para prosseguir para a sua avaliação como possíveis fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Os resultados obtidos nos estudos *in vitro*, mostraram que todos os corróis apresentam uma elevada fotocitotoxicidade e uma baixa ou nenhuma-citotóxicidade.

Entre todos os corróis estudados, os corróis **2.33a** e **2.33c**, são evidenciados devido às suas características promissoras, nomeadamente uma forte banda de absorção na janela terapêutica, valores de IC₅₀ na ordem dos nanomolar, rendimentos quânticos de formação de oxigénio singuleto elevados e não apresentam citotoxicidade no escuro.

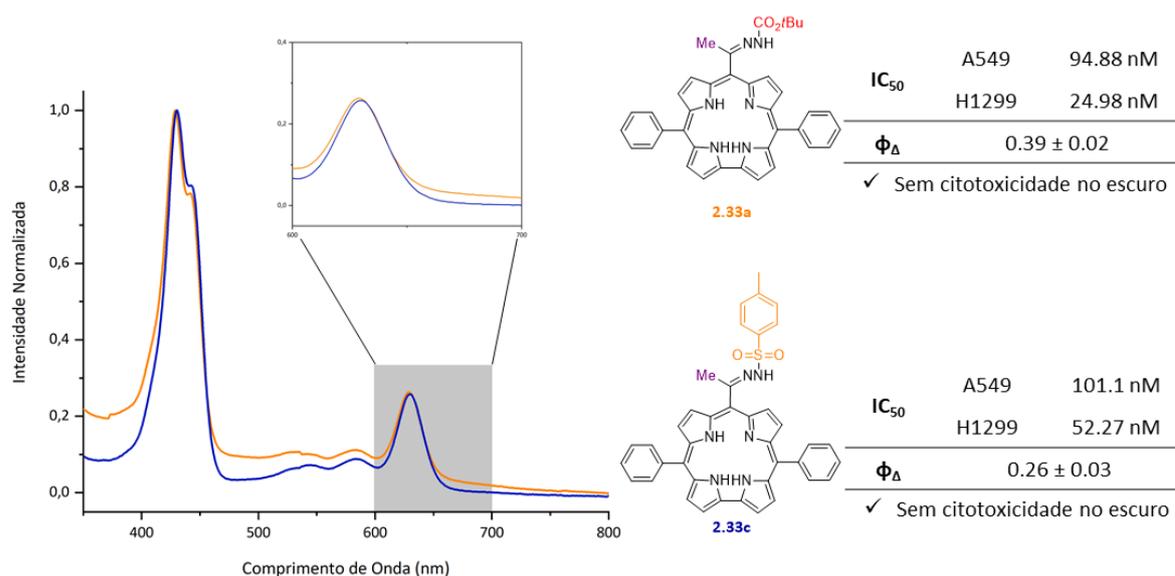


Figura 5.1. Representação das características dos corróis **2.33a** e **2.33c**.

Os resultados promissores obtidos *in vitro* para os corróis *trans-A₂B* bem como as propriedades fotofísicas dos corróis indicam que estes poderão ser aplicados como fotossensibilizadores em PDT de cancro do pulmão.

As perspetivas futuras deste trabalho passam pela ampliação da biblioteca de compostos sintetizados de modo a estudar de forma mais aprofundada a contribuição de todos os substituintes do corrole, assim como aumentar o carácter lipofílico dos corróis. A nível do estudo fotofísico, as perspetivas futuras passam pela utilização de solventes com polaridade intermédia entre o THF e o DMSO, de modo a estudar a influência do solvente nas características dos corróis, assim como uma forma de relacionar melhor os resultados obtidos nos estudos biológicos com os ensaios fotofísicos, seria também avançar com ensaios de microscopia de fluorescência resolvida no tempo. Nos estudos *in vitro*, foram iniciados os estudos de captação celular e o estudo da espécie reativa de oxigénio mais importante na atividade fotodinâmica dos corróis estudados, nomeadamente, o oxigénio singuleto. Os quais não apresentaram resultados conclusivos até à data, deixando como perspetiva futura a conclusão destes estudos. Adicionalmente será relevante também estudar a localização intracelular bem como o tipo de morte associada.

Capítulo 6

Secção Experimental

Capítulo 6

6. Secção Experimental

6.1. Síntese química

Neste capítulo vão ser descritos os procedimentos experimentais efetuados ao longo deste trabalho bem como a caracterização dos compostos. A caracterização dos compostos foi efetuada através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) e pela medição do ponto de fusão.

6.1.1. Aparelhagem utilizada

Cromatografia

A evolução das reações foi controlada por cromatografia em camada fina (TLC), para este efeito utilizaram-se placas de sílica 60 F₂₅₄, com suporte de alumínio, fornecidas pela Merck.

A maioria dos compostos foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando gel de sílica 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionária, fornecida pela Acros Organics.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espetros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) foram obtidos nos espectrómetros Bruker Avance III, operando a 400 MHz (^1H) e a 100 MHz (^{13}C).

As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou tetra-hidrofurano deuterado ($\text{THF-}d_8$). Os valores dos desvios químicos (δ) são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento (J) são expressos em Hertz (Hz).

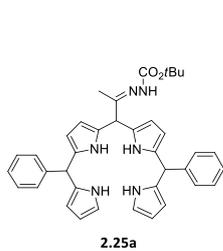
Espectrometria de Massa de Alta Resolução

Os espetros de massa de alta resolução (EMAR) foram obtidos num espectrómetro TOF VG Autospec M com ionização por *electrospray* (ESI).

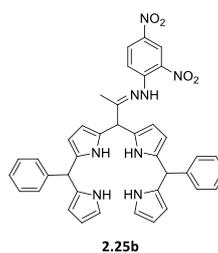
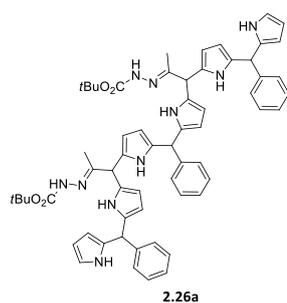
Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de fase aquecida Falc (pelo método de capilar de vidro aberto).

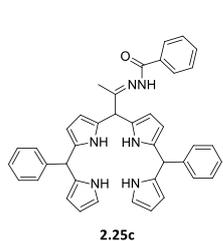
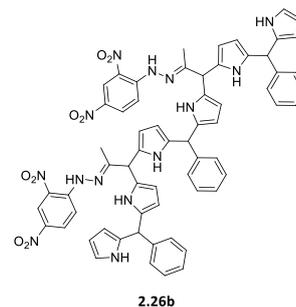
6.1.2. Índice de compostos



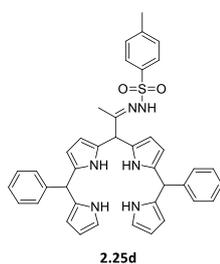
p. 32/94



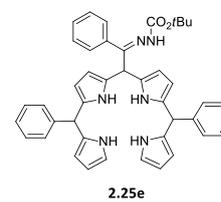
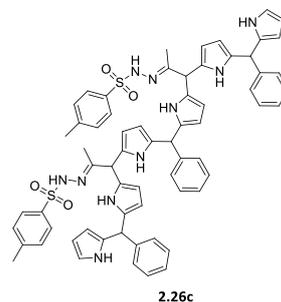
p. 32/95



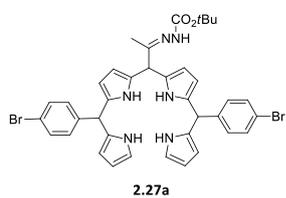
p. 32/97



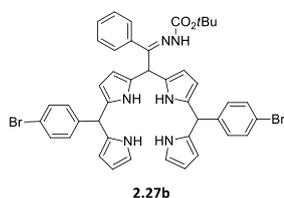
p. 32/96



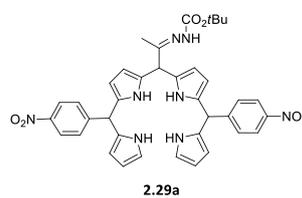
p. 32/97



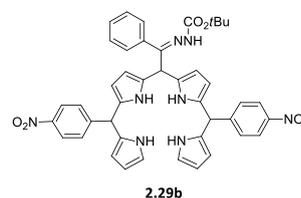
p. 34/98



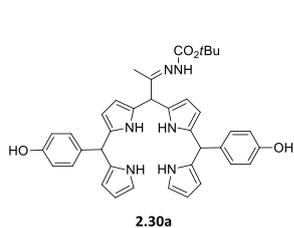
p. 34/98



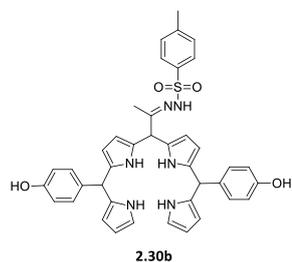
p. 34/99



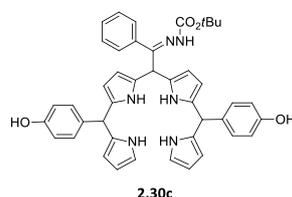
p. 34/99



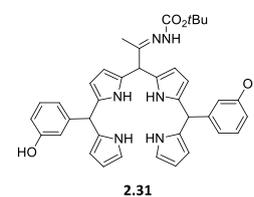
p. 35/100



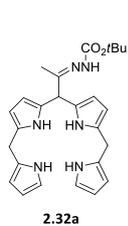
p. 35/100



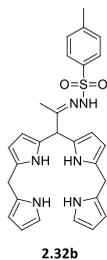
p. 35/101



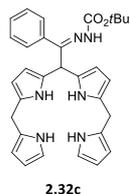
p. 36/101



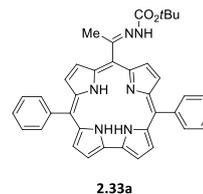
p. 36/102



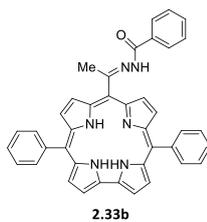
p. 36/102



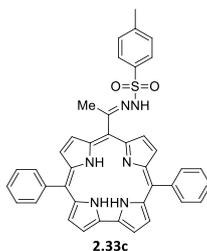
p. 36/103



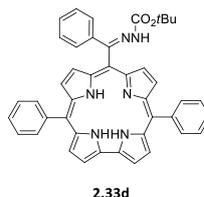
p. 38/104



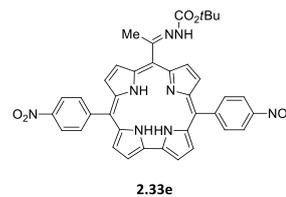
p. 38/104



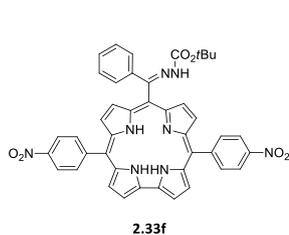
p. 38/105



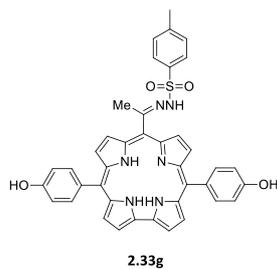
p. 38/105



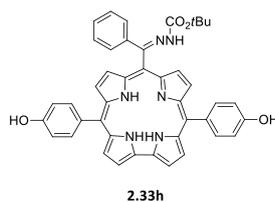
p. 38/106



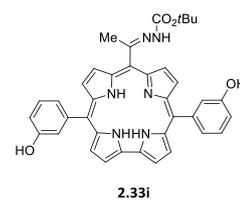
p. 38/106



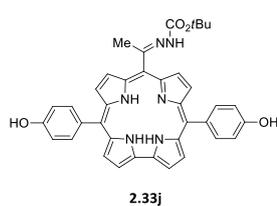
p. 38/107



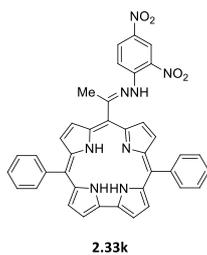
p. 38/107



p. 38/107



p. 40/108



p. 39/108

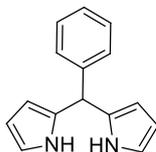
6.1.3. Síntese dos compostos

6.1.3.1. Síntese de dipirrometanos

Procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos

Borbulhou-se uma mistura de aldeído (0.05 mol) e pirrole (2 mol, 138.76 mL) com azoto durante 10 minutos. À mistura anterior adicionou-se TFA (0.005 mol) e deixou-se a mistura em agitação vigorosa, sob atmosfera inerte de N₂, durante 15 minutos. A reação foi parada com Et₃N e o excesso de pirrole foi removido por destilação a pressão reduzida. Os produtos são purificados por cromatografia em coluna e recristalizados com ciclo-hexano.

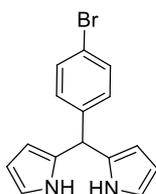
5-Fenildipirrometano **2.3**⁹⁵



O composto **2.3** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos usando pirrole com benzaldeído (0.05 mmol). O produto foi obtido como um sólido cinzento com um rendimento de 58%.

Dipirrometano **2.3**: p.f. 96-97 °C (de ciclo-hexano) (lit.⁹⁵ 100-101 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 5.47 (s, 1H), 5.98-5.99 (m, 2H), 6.14-6.18 (m, 2H), 6.64-6.65 (m, 2H), 7.21-7.37 (m, 5H), 7.82 (sl, 2H).

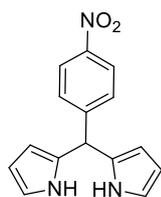
5-(*p*-Bromofenil)dipirrometano **2.5**¹¹⁰



O composto **2.5** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos, usando pirrole e *p*-Bromobenzaldeído (0.05 mmol). O produto foi obtido como um sólido cinzento com um rendimento de 61%.

Dipirrometano **2.5**: p.f. 125-126 °C (de ciclo-hexano) (lit.¹¹¹ 128 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 5.43 (s, 1H), 5.88 (dd, *J* = 1.9 e 1.2 Hz, 2H), 6.15 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 6.68-6.72 (m, 2H), 7.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.91 (sl, 2H).

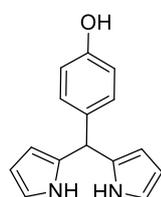
5-(*p*-Nitrofenil)dipirrometano **2.7**¹¹²



O composto **2.7** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos, usando pirrole e *p*-Nitrobenzaldeído (0.05 mmol). O produto foi obtido como um sólido alaranjado com um rendimento de 95%.

Dipirrometano **2.7**: p.f. 164-165 °C (de ciclo-hexano) (lit.¹¹¹ 166-167 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 5.58 (s, 1H), 5.89 (m, 2H), 6.76 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.90 (sl, 2H), 8.17 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

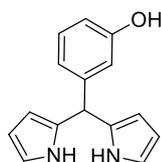
5-(*p*-Hidroxifenil)dipirrometano **2.9**¹¹³



O composto **2.9** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos, usando pirrole e *p*-Hidroxibenzaldeído (0.05 mmol). O produto foi obtido como um sólido rosa claro com um rendimento de 53%.

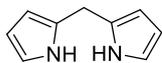
Dipirrometano **2.9**: p.f. 108-109 °C (de ciclo-hexano) (lit.¹¹³ 108-110 °C). RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ, ppm = 5.23 (s, 1H), 5.52-5.72 (m, 2H), 5.88 (q, *J* = 2.8 Hz, 2H), 6.58 (q, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.62-6.70 (m, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 9.18 (s, 1H), 10.46 (s, 2H).

5-(*m*-Hidroxifenil)dipirrometano **2.11**⁹⁶



O composto **2.11** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos, usando pirrole e *m*-Hidroxibenzaldeído (0.05 mmol) . O produto foi obtido como um sólido cinzento com um rendimento de 50%.

Dipirrometano **2.11**: p.f. 105-106 °C (de ciclo-hexano) (lit.⁹⁶ 105-107 °C). RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ, ppm = 5.25 (s, 1H), 5.64-5.70 (m, 2H), 5.89 (dd, *J* = 5.5 e 2.7 Hz, 2H), 6.56-6.60 (m, 5H), 7.00-7.08 (m, 1H), 9.21 (s, 1H), 10.51 (s, 2H).

Dipirrometano **2.12**⁹⁷

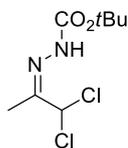
O composto **2.12** foi preparado seguindo um procedimento descrito na literatura. A uma solução de pirrole (438.0 mmol, 30.0 mL), ácido tricloroacético (18.0 mmol, 0.3 g), ácido acético (20.0 mL) e diclorometano (20.0 mL), em refluxo, foi adicionada uma suspensão de paraformaldeído (23.0 mmol, 0.7 g) em diclorometano. Deixou-se a mistura em refluxo durante 2 h. Após arrefecer, adicionou-se uma solução de NaOH (10%) à mistura. Extraíu-se a mistura e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o solvente e destilou-se o excesso de pirrole a pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica, usando como eluente [diclorometano/hexano (9:1)]. O produto foi obtido como um sólido branco com um rendimento de 33%.

Dipirrometano **2.12**: p.f. 75-76 °C (de ciclo-hexano) (lit.¹¹⁴ 76.8 °C). RMN ¹H (400 MHz, DMSO): δ , ppm = 3.97 (s, 2H), 5.90-6.10 (m, 2H), 6.16 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 6.64-6.61 (m, 2H), 7.82 (sl, 2H).

6.1.3.2. Síntese de hidrazonas

Procedimento geral para a síntese de dipirrometanos *meso*-substituídos

A uma solução de cetona (1 equiv.) no solvente apropriado, adiciona-se a hidrazina (1.1 equiv.), utilizando o catalisador específico para cada caso. A reação ficou em agitação à temperatura ambiente, durante o tempo de reação para cada caso.

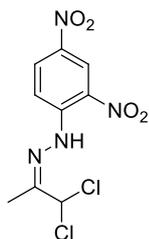
t-Butoxicarbonil-hidrazona da 1,1-dicloroacetona (**2.15a**)¹¹⁵

O composto **2.15a** foi preparado seguindo o procedimento geral descrito para a síntese de hidrazonas usando a 1,1-dicloroacetona (28.6 mmol) e *t*-butilcarbazato (33.0 mmol), utilizando éter dietílico como solvente e ácido acético glacial como catalisador (tempo de reação: 12 h).

A hidrazona **2.15a** foi obtida como um sólido branco com um rendimento de 58%.

Hidrazona **2.15a**: p.f. 126-127 °C (de éter dietílico) (lit.¹¹⁵ 130.1-132.3 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ , ppm = 1.52 (s, 9H), 2.04 (s, 3H), 6.39 (s, 1H), 7.53 (s, 1H).

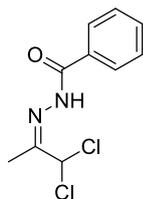
2,4-Dinitrofenil-hidrazona da 1,1-dicloroacetona (**2.15b**)⁹⁸



O composto **2.15b** foi preparado segundo o procedimento geral descrito para a síntese de hidrazonas, usando a 1,1-dicloroacetona (28.6 mmol) e 2,4-dinitrofenil-hidrazina (33.0 mmol), fosfito de dietilo como solvente (tempo de reação: 3 h). A hidrazona **2.15b** foi obtida como um sólido laranja com um rendimento de 95%.

Hidrazona **2.15b**: p.f. 107-108 °C (de éter dietílico) (lit.¹¹⁶ 108.3-108.8 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 2.31 (s, 3H), 6.43 (s, 1H), 7.95 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 8.36-8.40 (m, 1H), 9.15 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 11.04 (s, 1H).

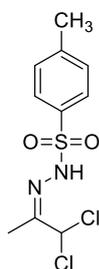
Benzoí-l-hidrazona da 1,1-dicloroacetona (**2.15c**)



O composto **2.15c** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de hidrazonas, usando a 1,1-dicloroacetona (28.6 mmol) e a benzoí-l-hidrazina (33.0 mmol), em metanol e ácido como catalisador (tempo de reação: 1 h). A hidrazona **2.15c** foi obtida como um sólido branco com um rendimento um rendimento de 56%.

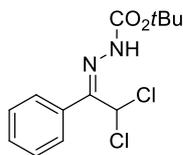
Hidrazona **2.15c**: p.f. 165-166 °C (de éter dietílico). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 2.19 (s, 3H), 6.47 (sl, 1H), 7.74 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.57 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.78-7.83 (m, 2H).

p-Toluenossulfonil-hidrazona da 1,1-dicloroacetona (**2.15d**)¹⁰⁰



O composto **2.15d** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de hidrazonas, usando a 1,1-dicloroacetona (28.6 mmol) e a *p*-toluenossulfonil hidrazina (33.0 mmol), em metanol e HCl como catalisador (tempo de reação: 1 h). A hidrazona **2.15d** foi obtida como um sólido branco com um rendimento de 67%.

Hidrazona **2.15d**: p.f. 130-131 °C (de éter dietílico) (lit.¹⁰⁰ 137-138 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 2.00 (s, 3H), 2.44 (s, 2H), 6.18 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.06 (sl, 1H).

t-Butoxicarbonil-hidrazona da 2,2-dicloroacetofenona (**2.24**)¹¹⁵

O composto **2.24** foi preparado seguindo o procedimento geral para a síntese de hidrazonas, usando a 2,2-dicloroacetona (28.6 mmol) e o *t*-butilcarbazato (33.0 mmol), em éter dietílico e ácido acético glacial como catalisador (tempo de reação: 6 dias). A hidrazona **2.24** foi obtida como um sólido branco com um rendimento de 71%.

Hidrazona **2.24**: p.f. 139-140 °C (de éter dietílico) (lit.¹¹⁵ 143-144 °C). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.47 (s, 12H), 6.65 (s, 1H), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.49 (sl, 1H), 7.56-7.58 (m, 3H).

6.1.3.3. Síntese de bilanos e hexapirróis

Procedimento geral

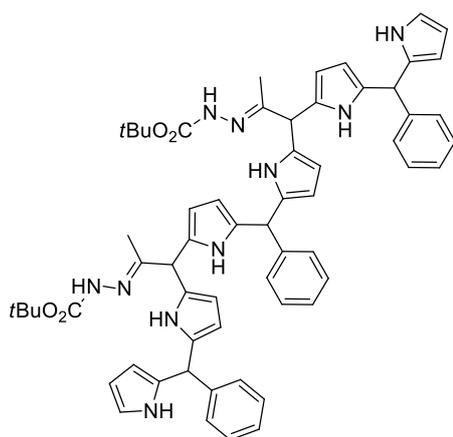
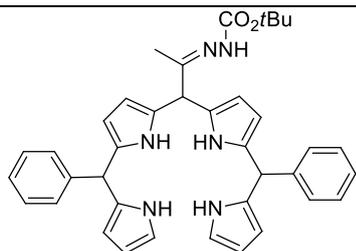
Método A: em água/co-solvente

A uma solução de Na₂CO₂ (10 mmol) em água (14.6 mL), adicionar o dipirrometano (4 mmol), o co-solvente (2.4 mL) indicado em cada caso e por fim a hidrazona (1 mmol). A mistura reacional é colocado sob agitação vigorosa durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, extrair com acetato de etilo (3 x 20 mL), secar a fase orgânica e evaporar o solvente. Os produtos são purificados por cromatografia em coluna e recristalizados com uma mistura de éter dietílico e éter petróleo.

Método B: em diclorometano

A uma solução de hidrazona (1 mmol) e dipirrometano (4 mmol) em diclorometano (30 mL), adicionar o carbonato de sódio (10 mmol). A mistura reacional é deixada em agitação à temperatura ambiente, durante 41 h. A reação foi controlada por TLC. Após a conclusão da reação, filtrar sobre celite, lavar com diclorometano e acetato de etilo e evaporar o solvente. Os produtos são purificados por cromatografia em coluna e recristalizados com uma mistura de éter dietílico e éter petróleo.

5,15-difenil-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.25a**) e 5,15,25-tri-fenil-10,20-di(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)hexapirrole (**2.26a**)



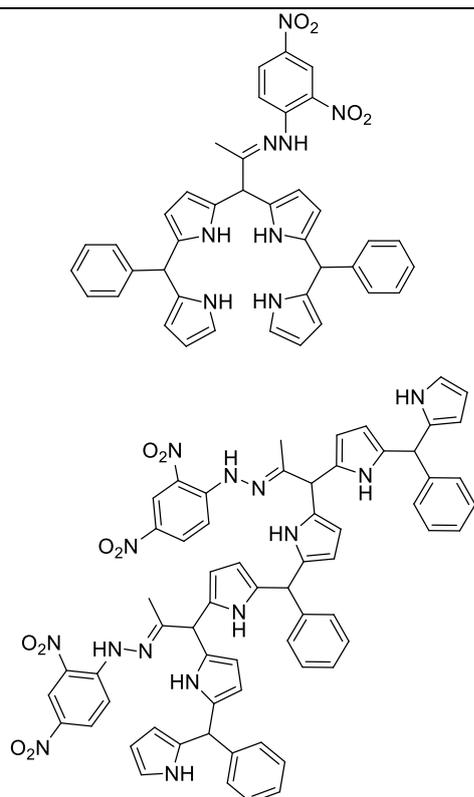
Os compostos foram preparados seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 241 mg), o dipirrometano **2.3** (4 mmol, 889.2 mg) e DCM como co-solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se por ordem de eluição o bilano **2.25a** como um sólido castanho escuro com rendimento de 43% (0.431 mmol, 264.0 mg) e o hexapirrole **2.26a** como um sólido castanho com um rendimento de 8% (0.154 mmol, 154.0 mg).

Bilano **2.25a**: p.f. 104-105 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.49 (sl, 9H), 1.77 (t, J = 3.0 Hz, 3H), 4.85 (s, 1H), 5.36 (s, 2H), 5.71-5.77 (m, 2H),

5.81-5.93 (m, 4H), 6.08-6.14 (m, 2H), 6.64 (sl, 2H), 7.13-7.32 (m, 15H), 7.46 (sl, 1H), 8.14 (sl, 2H), 8.45 (d, J = 13.94 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 14.0, 28.3, 44.0, 44.1, 46.9, 81.5, 107.0, 107.0, 107.2, 107.2, 107.6, 107.7, 108.1, 108.4, 117.3, 117.3, 126.8, 128.4, 128.4, 128.5, 125.5, 152.2, 153.1. EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₃₈H₄₀O₂N₆Na [M+Na⁺] 635.3105, encontrado 635.3100.

Hexapirrole **2.26a**: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.48 (s, 18H), 1.71-1.74 (m, 6H), 4.86 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 5.36 (s, 3H), 5.73 (s, 2H), 5.85 (d, J = 11.7 Hz, 8H), 6.09 (d, J = 2.7, 2H), 6.64 (s, 2H), 7.13-7.23 (m, 15 H), 8.30 (sl, 3H), 8.43 (sl, 3H). EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₆₁H₆₆O₄N₁₀Cl [M+Cl⁻] 1037.4963, encontrado 1037.4971.

5,15-difenil-10-[1'-(2,4-dinitrofenil-hidrazono-etil)]bilano (**2.25b**) e 5,15,25-tri-fenil-10,20-di[1'-(2,4-dinitrofenil-hidrazono-etil)]hexapirrole (**2.26b**)

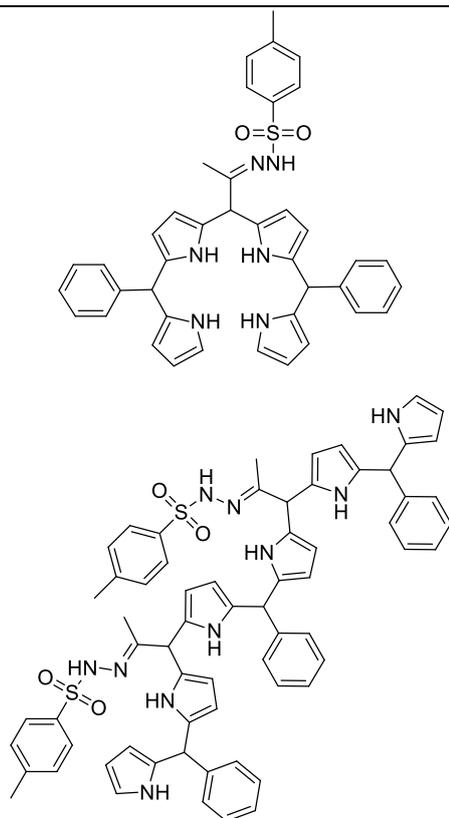


Os compostos foram preparados seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15b** (1 mmol, 307 mg), dipirrometano **2.3** (4 mmol, 889.2 mg) e acetato de etilo como co-solvente. Foram também preparados seguindo o método B descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15b** (1 mmol, 307 mg) e o dipirrometano **2.3** (4 mmol, 889.2 mg). Em ambos os casos, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)], obtendo-se por ordem de eluição o bilano **2.25b** um sólido verde escuro (método A: 421.0 mg, 62%; método B: 231.0 mg, 34%) e o hexapirrole **2.26b** como um sólido esverdeado (método A: 196.0 mg, 9%; método B: 83.2 mg, 4%).

Bilano 2.25b: p.f. 108-109 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 2.06 (s, 3H), 5.03 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.80 (t, *J* = 2.9 Hz, 2H), 5.85-5.94 (m, 4H), 6.12-6.17 (m, 2H), 6.69 (s, 2H), 7.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 5H), 7.27-7.33 (m, 5H), 7.63-7.70 (m, 1H), 7.92 (d, *J* = 14.8 Hz, 4H), 8.13-8.23 (m, 1H), 9.10 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 11.03 (s, 1H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 14.9, 44.1, 47.3, 107.3, 107.6, 107.8, 108.5, 116.5, 117.4, 123.4, 127.1, 127.6, 128.3, 128.4, 128.7, 129.4, 130.1, 132.3, 133.1, 138.0, 141.8, 145.0, 156.4. EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₃₉H₃₅O₄N₈ [M+H⁺] 679.2776, encontrado 679.2773.

Hexapirrole 2.26b: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 2.03 (s, 6H), 5.02 (s, 2H), 5.36 (d, *J* = 14.3 Hz, 3H), 5.78 (s, 4H), 5.87 (d, *J* = 18.6 Hz, 8 H), 6.11 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 6.66 (s, 2H), 7.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 8H), 7.26-7.30 (m, 7H), 7.57-7.65 (m, 2H), 7.89 (sl, 2H), 7.96 (sl, 4H), 8.07-8.15 (m, 2H), 10.99 (s, 2H). EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₆₃H₅₄O₈N₁₄Cl [M+Cl⁻] 1169.3943, encontrado 1169.3949.

5,15-difenil-10-(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)bilano (**2.25d**) e 5,15,25-tri-fenil-10,20-di(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)hexapirrole (**2.26c**)

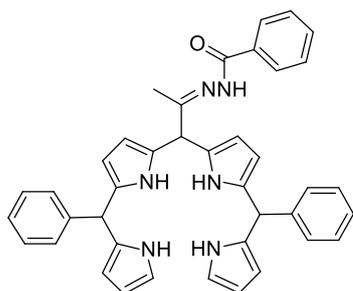


Os compostos foram preparados seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15d** (1 mmol, 295.2 mg), o dipirrometano **2.3** (4 mmol, 889.2 mg) e DCM como co-solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se por ordem de eluição o bilano **2.25d** como um sólido rosa com rendimento de 40% (0.402 mmol, 268.3 mg) e o hexapirrole **2.26c** como um sólido rosa com um rendimento de 5% (0.097 mmol, 107.6 mg).

Bilano **2.25d**: p.f. °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.72 (t, $J = 2.1$ Hz, 3H), 2.38 (s, 3H), 4.77 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H); 5.34 (s, 2H), 5.69-5.71 (m, 4H), 5.82-5.86 (m, 2H), 6.12-6.14 (m, 2H), 6.66-6.68 (m, 2H), 7.12-7.20 (m, 6H), 7.22-7.24 (m, 2H), 7.25-7.32 (m, 4H),

7.62 (dt, $J = 8.3$ e 2.6 Hz, 2H), 7.99 (s, 2H), 8.13 (t, $J = 15.5$ Hz, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 14.5, 21.6, 44.0, 44.1, 46.9, 107.2, 107.4, 107.4, 108.3, 117.4, 126.9, 126.9, 127.8, 127.9, 128.3, 128.6, 128.6, 129.6, 132.4, 132.9, 133.0, 135.1, 135.1, 142.1, 144.2, 157.2, 157.2. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 667.2850, encontrado 667.2847.

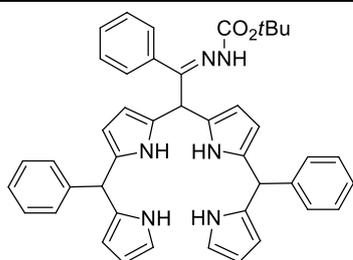
Hexapirrole **2.26c**: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.68 (d, $J = 1.2$, 6H), 2.36 (s, 6H), 4.81 (dd, $J = 16.2$ e 8.5 , 2H), 5.21-5.36 (m, 3H), 5.58-5.75 (m, 8H), 5.81 (s, 2H), 6.06-6.13 (m, 2H), 6.64 (s, 2H), 7.10-7.16 (m, 9H), 7.21-7.24 (m, 6H), 7.56-7.69 (m, 4H), 7.75-7.87 (m, 1H), 8.01 (d, $J = 13.2$, 3H), 8.15 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 8.21-8.31 (m, 1H), 8.36 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H). EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{65}\text{H}_{62}\text{O}_4\text{N}_{10}\text{NaS}_2$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 1133.4289, encontrado 1133.4277.

5,15-difenil-10-(1'-benzoil-hidrazono-etil)bilano (**2.25c**)

O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15c** (1 mmol, 245.1 mg), o dipirrometano (**2.3**) (4 mmol, 889.2 mg) e DCM como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.25c** como um sólido rosa com

rendimento de 26% (0.257 mmol, 158.7 mg)

Bilano **2.25c**: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.91 (d, J = 9.2 Hz, 3H), 4.95 (s, 1H), 5.30-5.39 (m, 2H), 5.70-5.76 (m, 2H), 5.81 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 5.87-5.94 (m, 2H), 6.05-6.12 (m, 2H), 6.56-6.64 (m, 2H), 7.11-7.25 (m, 9H), 7.35-7.44 (m, 3H), 7.48-7.55 (m, 1H), 7.60-7.69 (m, 4H), 8.13 (sl, 2H), 8.66-8.96 (m, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 44.0, 44.1, 47.1, 107.2, 107.3, 107.6, 107.7, 108.1, 108.3, 108.4, 117.2, 117.3, 126.7, 127.0, 127.2, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 128.7, 131.5, 131.9, 132.2, 132.4, 131.6, 132.9, 132.2, 142.0, 142.3.

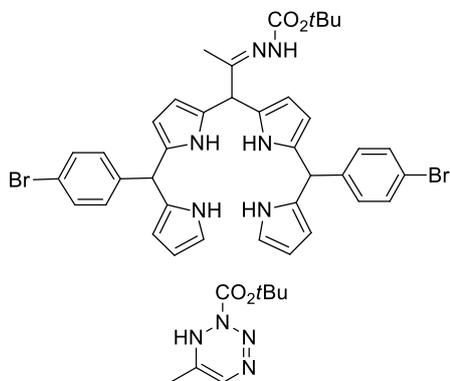
5,15-difenil-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)bilano (**2.25e**)

O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.3** (4 mmol, 889.2 g), e DCM como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)],

obtendo-se o bilano **2.25e** como um sólido castanho com rendimento de 40% (0.396 mmol, 267.3 mg).

Bilano **2.25e**: p.f. 105-106 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.45 (s, 9H), 5.18 (t, J = 3.1 Hz, 1H), 5.38 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 5.73-5.75 (m, 2H), 5.78-5.87 (m, 4H), 6.10-6.14 (m, 2H), 6.61-6.68 (m, 2H), 6.87-6.90 (m, 2H), 7.12-7.25 (m, 7H), 7.27-7.31 (m, 3H), 7.34-7.39 (m, 3H), 7.54 (sl, 1H), 8.17 (d, J = 19.3 Hz, 2H), 8.52 (s, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 28.3, 44.0, 44.0, 46.4, 81.5, 107.2, 107.3, 107.6, 108.1, 108.2, 117.3, 126.8, 127.4, 128.3, 128.4, 128.5, 129.3, 129.6, 132.5, 132.6, 132.8, 142.4, 142.4, 152.67. EMAR (ESI) m/z : $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{N}_6\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 697.3262, encontrado 697.3257.

5,15-di(*p*-bromofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.27a**) e 6-Metil-1,2-di-hidro-1,2,3,4-tetrazina-2-carboxilato de *t*-butilo (**2.28**)



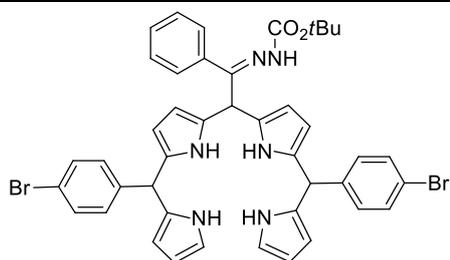
Os compostos foram preparados seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 240.0 mg), o dipirrometano **2.5** (4 mmol, 1.2048 g) e DCM como co-solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se por ordem de eluição o composto **2.28** como um sólido castanho avermelhado com um rendimento de 41% (0.824 mmol, 163.3 mg) e o

bilano **2.27a** como um sólido castanho avermelhado com rendimento de 7% (0,073 mmol, 56.0 mg).

Bilano **2.27a**: p.f. 106-107 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.48 (d, *J* = 2.7 Hz, 9H), 1.79 (t, *J* = 3.0 Hz, 3H), 4.82 (s, 1H), 5.30 (s, 2H), 5.70 (dd, *J* = 5.6 e 2.7 Hz, 2H), 5.78-5.87 (m, 4H), 6.09 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H), 6.62-6.66 (m, 2H), 6.69-7.06 (m, 5H), 7.36-7.39 (m, 4H), 7.53-7.62 (m, 1H), 8.20 (sl, 2H), 8.67 (d, *J* = 15.3 Hz, 2H).

Composto **2.28**: p.f. 98 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.57 (s, 9H), 1.92 (s, 3H), 8.19 (s, 1H), 9.52 (s, 1H).

5,15-di(*p*-bromofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)bilano (**2.27b**)



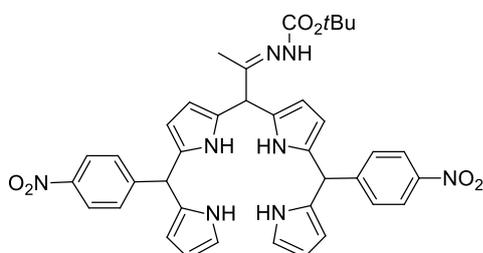
O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.5** (4 mmol, 1.2048 g) e DCM como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)],

obtendo-se o bilano **2.27b** como um sólido rosa com rendimento de 15% (0.152 mmol, 125.9 mg).

Bilano **2.27b**: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.53 (s, 9H), 5.32 (s, 1H), 5.61-5.75 (m, 2H), 5.81-5.93 (m, 2H), 5.95-6.02 (m, 1H), 6.05-6.09 (m, 1H), 6.10-6.18 (m, 2H), 6.22-6.29 (m, 1H), 6.41-

6.47 (m, 1H), 6.64-6.71 (m, 2H), 6.73-6.77 (m, 1H), 6.99-7.08 (m, 2H), 7.09-7.15 (m, 1H), 7.34-7.48 (m, 9H), 7.50-7.58 (m, 2H), 7.68-7.77 (m, 1H), 7.91 (sl, 2H).

5,15-di(*p*-nitrofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.29a**)

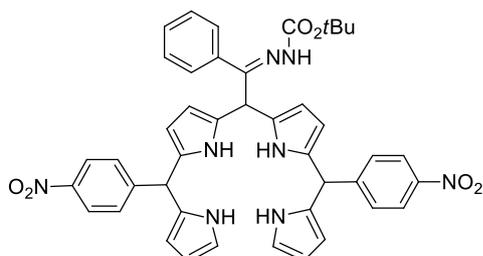


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 240.0 mg), o dipirrometano **2.7** (4 mmol, 1.0692 g) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se o bilano **2.29a** como

um sólido rosa com rendimento de 13% (0.128 mmol, 90.1 mg).

Bilano **2.29a**: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.48 (s, 9H), 1.82 (sl, 3H), 4.81 (s, 1H), 5.46 (sl, 2H), 5.68-5.73 (m, 3H), 5.88 (sl, 3H), 6.09-6.13 (m, 2H), 6.67-6.72 (m, 2H), 7.28-7.32 (m, 4H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.35 (sl, 2H), 8.95 (sl, 2H). EMAR (ESI): *m/z* = calculado para C₃₈H₃₈O₆N₈Na [M+Na⁺] 725.2807, encontrado 725.2802.

5,15-di(*p*-nitrofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)bilano (**2.29b**)



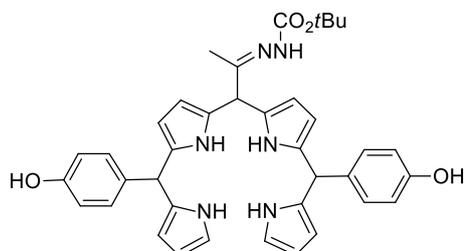
O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.7** (4 mmol, 1.0692 g), e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se o bilano **2.29b** como um

sólido esverdeado com rendimento de 22% (0.215 mmol, 164.2 mg).

Bilano **2.29b**: p.f. 103-104 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 1.44 (s, 9H), 5.13 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.69-5.74 (m, 2H), 5.81-5.84 (m, 4H), 6.11-6.18 (m, 2H), 6.66-6.72 (m, 2H), 6.97-7.02 (m, 2H), 7.28-7.37 (m, 6H), 7.39-7.45 (m, 3H), 7.65 (sl, 1H), 8.07-8.19 (m, 6H), 8.34 (sl, 2H), 9.01 (d, *J* = 17.0, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ, ppm = 28.2, 43.9, 82.0, 107.6, 107.7, 107.7, 107.8, 108.2, 108.4, 108.8, 118.1, 123.7, 123.8, 127.0, 129.2,

129.3, 129.5, 129.9, 130.6, 130.9, 131.1, 131.3, 131.4, 146.8, 147.0, 149.3, 150.0, 152.9. EMAR (ESI): m/z = calculado para $C_{43}H_{40}O_6N_8Na$ $[M+Na^+]$ 787.2963, encontrado 787.2958.

5,15-di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.30a**)

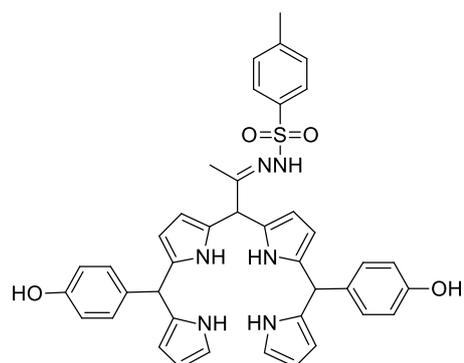


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.9** (4 mmol, 953.1 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.30a** como um

sólido rosa escuro com rendimento de 27% (0.364 mmol, 235.0 mg).

Bilano **2.30a**: p.f. 123-124 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN 1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 1.46 (s, 9H), 4.85 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 5.52 (sl, 2H), 5.62 (sl, 2H), 5.71-5.76 (m, 2H), 5.86-5.91 (m, 2H), 6.52-6.56 (m, 2H), 6.59 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.93 (dd, J = 8.5 e 2.8 Hz, 4H), 7.98 (sl, 1H), 8.58 (sl, 1H), 9.55 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 9.67 (sl, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 28.8, 44.6, 48.5, 80.0, 107.2, 107.2, 107.5, 107.8, 115.5, 117.4, 117.4, 130.3, 134.9, 135.4, 154.1, 157.1. EMAR (ESI) m/z : calculado para $C_{38}H_{40}O_4N_6Na$ $[M+Na^+]$ 667.3003, encontrado 667.3001.

5,15-di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)bilano (**2.30b**)

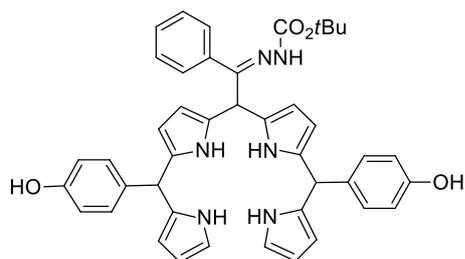


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15d** (1 mmol, 295.2 mg), o dipirrometano **2.9** (4 mmol, 953.1 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.30b** como um sólido castanho com rendimento de 16% (0.159 mmol, 112.3 mg).

Bilano **2.30b**: p.f. 127-128 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN 1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 2.35 (s, 3H), 4.78 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 5.50 (sl, 2H), 5.55-5.64 (m, 4H), 5.87-5.93 (m, 2H), 6.55 (s, 2H), 6.61 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 6.92 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 2H),

8.04 (sl, 2H), 8.97 (sl, 1H), 9.51 (sl, 4H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 11.5, 18.6, 41.6, 45.3, 76.1, 76.4, 76.8, 104.3, 104.5, 104.6, 104.9, 112.6, 114.5, 114.6, 125.9, 126.8, 127.0, 127.3, 131.7, 131.8, 131.8, 132.3, 135.5, 140.8, 154.2, 155.5. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 699.2748, encontrado 699.2747.

5,15-di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)bilano (**2.30c**)

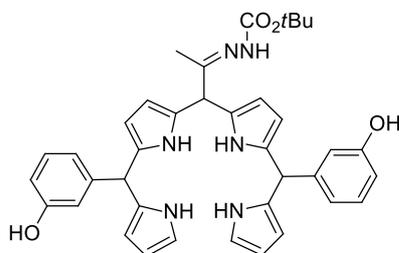


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.9** (4 mmol, 953.1 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.30c** como um

sólido castanho com rendimento de 47% (0.470 mmol, 332.2 mg).

Bilano **2.30c**: p.f. 130-131 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 1.40 (s, 9H), 5.15 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 5.46-5.51 (m, 2H), 5.58-5.66 (m, 4H), 5.88-5.92 (m, 2H), 6.55-6.58 (m, 2H), 6.59-6.65 (m, 4H), 6.79-6.84 (m, 2H), 6.95 (t, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.26-7.31 (m, 3H), 7.81 (sl, 1H), 8.03 (sl, 2H), 9.56 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 9.67 (sl, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 25.6, 41.6, 45.2, 77.6, 104.6, 104.9, 105.0, 112.6, 114.5, 114.6, 126.1, 126.5, 126.6, 126.6, 126.7, 127.3, 127.4, 131.1, 131.7, 131.7, 131.8, 131.8, 132.4, 132.4, 150.3, 154.2. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_6\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 729.3160, encontrado 729.3155.

5,15-di(*m*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.31**)

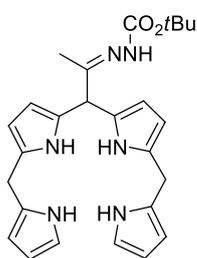


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.11** (4 mmol, 953.1 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.31** como um

sólido rosa com rendimento de 40% (0,359 mmol, 253.8 mg).

Bilano **2.31**: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.49 (sl, 9H), 1.74 (d, J = 10.9 Hz, 3H), 4.67 (t, J = 12.4 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 5.69-5.77 (m, 3H), 5.78-5.88 (m, 3H), 6.02-6.08 (m, 2H), 6.46-6.53 (m, 2H), 6.56 (sl, 2H), 6.60-6.71 (m, 5H), 7.01-7.10 (m, 2H), 7.48 (sl, 1H), 7.94 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 8.02 (sl, 1H), 8.52-8.70 (m, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 28.4, 43.8, 43.9, 46.7, 82.3, 82.4, 106.9, 107.1, 108.0, 114.0, 114.1, 115.3, 120.5, 120.6, 128.4, 128.6, 129.7, 132.7, 132.8, 132.8, 132., 132.9, 143.9, 156.1, 156.2.

10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)bilano (**2.32a**)

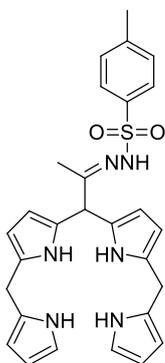


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.15a** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.11** (4 mmol, 953.1 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)], obtendo-se o bilano **2.32a** como um

sólido rosa com rendimento de 40% (0.359 mmol, 253.8 mg).

Bilano **2.32a**: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.42 (s, 9H), 2.45 (s, 3H), 3.90 (s, 4H), 4.68 (s, 1H), 5.73-5.87 (m, 2H), 5.95 (sl, 2H), 6.01-6.07 (m, 2H), 6.12 (sl, 2H), 6.58-6.66 (m, 2H), 8.57 (sl, 2H), 8.87 (sl, 2H).

10-(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)bilano (**2.32b**)

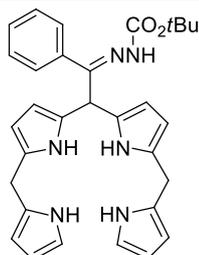


O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 295.2 mg), o dipirrometano **2.12** (4 mmol, 584.8 mg) e acetato de etilo como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se o bilano **2.32b** como um sólido castanho com rendimento de 23% (0.231 mmol, 120.5 mg).

Bilano **2.31**: p.f. 102-103 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.74 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.85 (s, 4H), 4.72 (s, 1H), 5.73 (t, J = 2.8 Hz, 2H), 5.82 (t, J = 2.9 Hz, 2H),

5.96 (sl, 2H), 6.12 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 6.63 (q, $J = 2.6$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.1$, 2H), 8.08 (sl, 2H), 8.17 (sl, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 14.8, 21.6, 26.5, 46.7, 106.1, 106.3, 107.2, 108.3, 117.2, 126.4, 127.8, 127.9, 129.2, 129.6, 129.7, 135.1, 144.4, 157.7. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 515.2224, encontrado 515.2224.

10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)bilano (**2.32c**)



O composto foi preparado seguindo o método A descrito no procedimento geral, usando a hidrazona **2.24** (1 mmol, 302.1 mg), o dipirrometano **2.12** (4 mmol, 584.8 mg) e DCM como co-solvente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)],

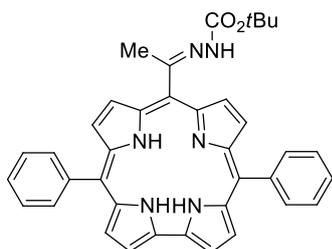
obtendo-se o bilano **2.32c** como um sólido castanho escuro com rendimento de 33% (0.325 mmol, 169.8 mg).

Bilano **2.32c**: p.f. 109-110 °C (de éter dietílico/éter petróleo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 1.47 (s, 9H), 3.90 (s, 4H), 5.10 (s, 1H), 5.79-5.84 (m, 4H), 5.97 (sl, 2H), 6.12 (q, $J = 2.8$ Hz, 2H), 6.60-6.66 (m, 2H), 6.99-7.04 (m, 2H), 7.38-7.43 (m, 3H), 8.37 (sl, 1H), 8.37 (sl, 2H), 9.00 (sl, 2H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm = 26.6, 28.2, 46.1, 81.8, 105.9, 106.0, 107.2, 108.1, 117.1, 127.2, 128.7, 129.3, 129.6, 132.7, 153.1, 153.3. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{N}_6\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 545.2636, encontrado 545.2631.

6.1.3.4. Síntese de corróis

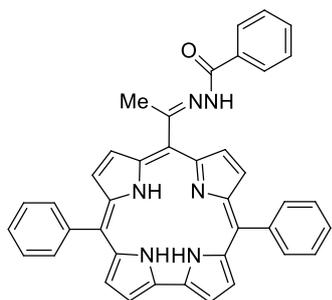
Procedimento geral

Adicionou-se 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, DDQ, (3 equiv.) a uma solução do bilano apropriado (1 equiv.) em diclorometano (20 mL). A mistura reacional permanece em agitação à temperatura ambiente durante 18 horas, excepto para o corrole **2.33j** que se forma instantaneamente. Após este tempo, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida até metade do volume e aplicada diretamente na sílica da cromatografia em coluna usada para purificação do produto.

5,15-Difenil-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33a**)

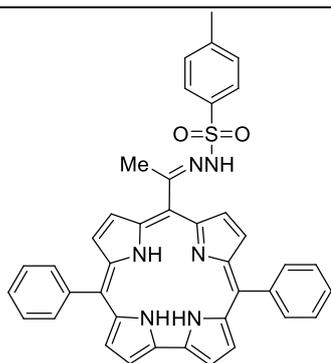
O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.25a** (0.0923 mmol, 56.5 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33a** como um sólido verde escuro com um rendimento de 43% (0.0399 mmol, 24.2 mg).

Corrole **2.33a**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 1.22 (s, 9H), 3.07 (sl, 3H), 7.81 (sl, 7H), 8.36 (sl, 5H), 8.91 (sl, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 25.5, 25.9, 77.0, 77.3, 125.5, 126.0, 126.5, 133.1, 148.2, 149.8. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{O}_2\text{N}_6$ [M+H $^+$] 607.2816, encontrado 607.2809.

5,15-Difenil-10-(1'-benzoil-hidrazono-etil)corrole (**2.33b**)

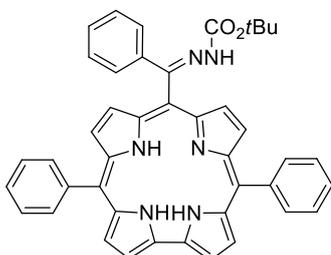
O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.25c** (0.257 mmol, 158.7 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:1)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33b** como um sólido verde escuro com um rendimento de 28% (0.0712 mmol, 43.5 mg).

Corrole **2.33b**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 3.15 (s, 3H), 6.75 (sl, 2H), 6.91 (sl, 2H), 7.71 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 7.77-7.90 (m, 5H), 8.35 (sl, 5H), 8.48 (sl, 2H), 8.81 (sl, 2H), 8.93 (sl, 5H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 26.8, 27.8, 125.3, 125.5, 125.7, 126.1, 126.3, 126.8, 128.7, 132.3, 133.1, 138.0.

5,15-Difenil-10-(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33c**)

O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.25d** (0.285 mmol, 190.3 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33c** como um sólido verde escuro com um rendimento de 42% (0.121 mmol, 79.8 mg).

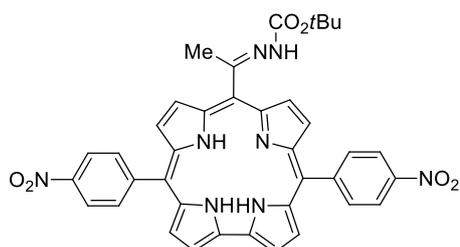
Corrole **2.33c**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 3.04 (sl, 3H), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 3H), 7.72 (sl, 2H), 7.83 (sl, 4H), 8.36 (sl, 6H), 8.80 (sl, 2H), 8.93 (sl, 2H). EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{N}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 661.2380, encontrado 661.2370.

5,15-Difenil-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)corrole (**2.33d**)

O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.25e** (0.0878 mmol, 59.2 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33d** como um sólido verde escuro com um rendimento de 74% (0.0646 mmol, 43.2 mg).

Corrole **2.33d**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 1.10-1.35 (m, 9H), 7.26 (s, 3H), 7.81 (s, 6H), 8.45 (sl, 5H), 8.87 (sl, 3H). RMN ^{13}C (100 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 25.5, 77.6, 125.9, 126.5, 133.0, 133.5, 133.1. EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{37}\text{O}_2\text{N}_6$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 669.2973, encontrado 669.2965].

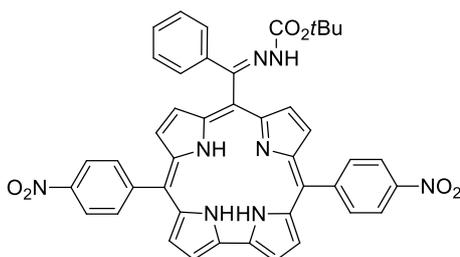
5,15-Di(*p*-nitrofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33e**)



O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.29a** (0.286 mmol, 218.4 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33e** como um sólido verde escuro com um rendimento de 46% (0.132 mmol, 91.9 mg).

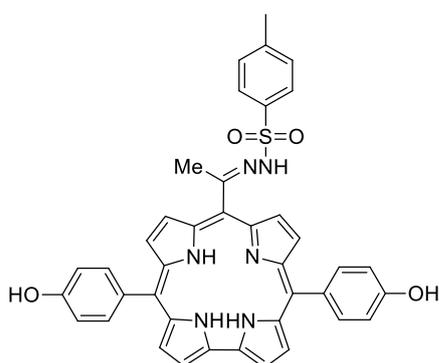
Corrole **2.33e**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 1.24 (sl, 9H), 3.09 (sl, 3H), 8.30-8.77 (m, 10H), 8.81 (sl, 1H), 8.86-9.14 (m, 5H). EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₃₈H₃₃O₆N₈ [M+H⁺] 697.2518, encontrado 697.2513.

5,15-Di(*p*-nitrofenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)corrole (**2.33f**)



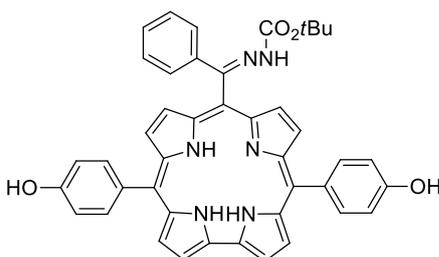
O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.29b** (0.1307 mmol, 100 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol, obtendo-se o corrole **2.33f** como um sólido verde escuro com um rendimento de 56% (0.0728 mmol, 55.2 mg).

Corrole **2.33f**: p.f. > 300 °C (de metanol). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 1.14-1.43 (m, 9H), 7.26 (sl, 2H), 7.81 (s, 2H), 8.69 (sl, 9H), 9.07 (s, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 27.3, 29.7, 79.6, 122.9, 127.4, 127.9, 128.5, 135.6, 135.8. EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₄₃H₃₅O₆N₈ [M+H⁺] 759.2674, encontrado 759.2667.

5,15-Di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*p*-toluenossulfonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33g**)

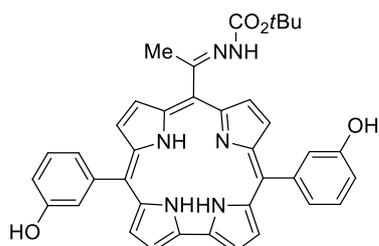
O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.30b** (0.451 mmol, 318.6 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol/éter petróleo, obtendo-se o corrole **2.33g** como um sólido verde escuro com um rendimento de 8% (0.0348 mmol, 24.1 mg).

Corrole **2.33g**: p.f. > 300 °C (de metanol/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 2.12-2.18 (m, 3H), 4.12-4.27 (m, 3H), 6.78-6.90 (m, 6H), 7.19-7.47 (m, 7H), 7.63-8.0 (m, 7H).

5,15-Di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-1'-fenil)corrole (**2.33h**)

O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.30c** (0.118 mmol, 83.7 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol/éter petróleo, obtendo-se o corrole **2.33h** como um sólido verde escuro com um rendimento de 37% (0.0437 mmol, 30.6 mg).

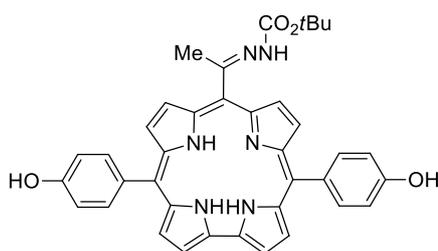
Corrole **2.33h**: p.f. > 300 °C (de metanol/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 1.22 (sl, 9H), 7.22 (sl, 7H), 7.80 (sl, 2H), 8.13 (sl, 4H), 8.45 (sl, 4H), 8.81 (sl, 3H).

5,15-Di(*m*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33i**)

O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.31** (0.310 mmol, 199.7 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol/éter petróleo, obtendo-se o corrole **2.33i** como um sólido verde escuro com um rendimento de 35% (0.109 mmol, 76.2 mg).

Corrole **2.33i**: p.f. > 300 °C (de metanol/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 1.20 (sl, 9H), 3.08 (s, 3H), 7.14 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.56-7.65 (m, 2H), 7.72-7.84 (m, 5H), 8.53 (sl, 2H), 8.72 (sl, 2H), 8.91 (sl, 2H), 8.97 (sl, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 25.5, 25.9, 26.6, 112.6, 113.1, 120.3, 120.3, 121.1, 124.3, 126.7, 139.2, 155.7.

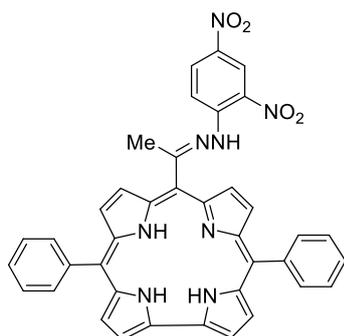
5,15-Di(*p*-hidroxifenil)-10-(1'-*t*-butoxicarbonil-hidrazono-etil)corrole (**2.33j**)



O produto foi preparado seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.30a** (0.123 mmol, 79.6 mg). O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)] e recristalizado em metanol/éter petróleo, obtendo-se o corrole **2.33j** como um sólido verde escuro com um rendimento de 26% (0.0324 mmol, 20.7 mg).

Corrole **2.33j**: p.f. > 300 °C (de metanol/éter petróleo). RMN ¹H (400 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 1.13-1.23 (m, 9H), 3.05 (s, 3H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 5H), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 5H), 8.42 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H), 8.65 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 8.83 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 8.87 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H). RMN ¹³C (100 MHz, THF-*d*₈): δ, ppm = 25.5, 25.7, 26.5, 112.8, 113.1, 120.8, 129.2, 134.1, 156.2.

(*E*)- e (*Z*)-5,15-Difenil-10-[1'-(2,4-dinitrofenil-hidrazono-etil)]corrole (**2.33k**)



Os produtos foram preparados seguindo o procedimento geral, usando o bilano **2.25b** (0.200 mmol, 135.7 mg). Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:2)], e recristalizados em metanol, obtendo-se os coróis **2.33k** como uma mistura de isómeros *E/Z* (57:43) com rendimento global de 58% (0.116 mmol, 78.0 mg).

EMAR (ESI) *m/z* : calculado para C₃₉H₂₉O₄N₈ [M+H⁺] 673.2306, encontrado 673.2299.

Corrole maioritário **2.33k**: RMN ^1H (400 MHz, THF- d_8): δ , ppm = 3.42 (s, 3H), 7.72 (d, J = 6.6 Hz, 5H), 7.81 (d, J = 3.5 Hz, 9H), 8.26-8.40 (m, 11H), 8.42-8.51 (m, 6H), 8.72 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 8.81-8.97 (m, 13H), 11.92 (sl, 1H).

6.2. Fotofísica dos compostos

6.2.1. Materiais e Solventes

Na análise espectroscópica bem como nas medidas fotofísicas realizadas, foram utilizados solventes de grau espectroscópico ou equivalente Uvasolv-Merck sem qualquer purificação adicional.

6.2.2. Espectrometria de absorção ultravioleta-visível

Os espectros de absorção de todos os compostos estudados foram adquiridos através de um espectrofotômetro de UV-Visível de duplo feixe *Shimadzu UV-2600*, usando células de quartzo de quatro faces (*Hellma*) com percurso ótico de 1 cm. Todos os espectros foram obtidos em solução temperatura ambiente, na faixa de comprimentos de onda compreendidos entre 200 e 800 nm, com concentração de 1×10^{-6} M.

Os coeficientes de absorvidade molar (ϵ) foram determinados utilizando o espectrómetro de UV-Visível PG Instruments T80, Shimadzu UV-Vis. Após a preparação de soluções entre 1×10^{-6} e 7.74×10^{-6} M em THF e DMSO. Representou-se graficamente a absorção para o máximo das bandas consideradas em função da concentração das diferentes soluções, obtendo-se uma reta da qual o valor do declive corresponde ao valor do coeficiente de absorvidade molar. Esta analogia é transmitida pela lei de Beer-Lambert, $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, onde A representa a absorvância, ϵ o coeficiente de absorvidade molar, l o percurso ótico percorrido pela luz e c a concentração da solução.

6.2.3. Espectros de emissão e de excitação de fluorescência

Os ensaios de fluorescência em estado estacionário foram realizados num espectrofluorímetro *Jobin Yvon-Spex-Fluorolog 3-2.2*: Possui uma lâmpada de Xénon (450 W) acoplada a um banho termostaticado *Quantum*, operando geralmente a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram utilizadas células de quatro faces (*Hellma*) com percurso ótico de 1 cm. Para a aquisição dos espectros de emissão e excitação de fluorescência foram considerados incrementos e tempos de 1 nm por 0.5 segundos de integração. Foram usadas fendas de excitação e de emissão de 2 nm de espessura. Para o espectro de emissão

de fluorescência a excitação foi realizada aos 410 e 560 nm de comprimentos de onda e para o espectro de excitação de luminescência a emissão foi monitorizada aos 660 e 730 nm de comprimento de onda. As soluções estudadas tinham uma concentração fixa de 1×10^{-6} M. Todos os espectros de emissão e de excitação de fluorescência foram corrigidos para a resposta instrumental do sistema utilizado. A análise dos dados experimentais foi realizada com o auxílio do software *OriginPro 2018*.

6.2.4. Rendimento quântico de fluorescência

As medições dos rendimentos quânticos de fluorescência foram feitas utilizando um fluorímetro *Absolut PL Quantum Yield* (modelo, C11347-01), da marca *Hamamatsu*, multicanal com uma esfera integradora. Este equipamento é composto por uma fonte de luz monocromática como fonte de excitação, uma esfera integradora e um analisador fotônico multicanal. O rendimento quântico obtido é definido pela razão entre o número de fótons emitidos por uma amostra (n_F^{Em}) e o número de fótons absorvidos por essa amostra (n_F^{Abs}). O rendimento quântico é dado pela seguinte equação:

$$\phi_F = \frac{n_F^{Em}}{n_F^{Abs}} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Na medida da referência, a luz de excitação é irradiada numa esfera integradora onde se encontra a célula de referência, obtendo-se um espectro de excitação. Posteriormente, substitui-se a célula de referência pela célula da amostra, a luz de excitação é irradiada para a esfera integradora (medição da amostra). A irradiação do feixe de excitação não só gera o espectro de excitação, mas também o espectro de emissão da amostra que surge a comprimentos de onda superiores aos do espectro de excitação. O número de fótons absorvidos pela amostra é proporcional à diferença das áreas dos espectros de excitação da referência e da amostra, enquanto o número de fótons emitidos é proporcional à área do espectro de emissão. As soluções usadas tinham uma concentração de 1×10^{-6} e as células usadas tinham 1 cm de percurso ótico produzidas pelo mesmo fabricante do *Quantaaurus*.

6.2.5. Tempo de vida de fluorescência

A instrumentação de espectroscopia de contagem de monofotão utilizada é de construção própria e encontra-se montada no Laboratório de Fotofísica do Departamento de Química da Universidade de Coimbra. Os tempos de vida de fluorescência foram determinados pela técnica de contagem de monofotão correlacionada temporalmente (TCSPC, do inglês *Time-correlated Single Photon Counting*), usando como fonte de excitação díodos emissores de luz pulsada IBH com $\lambda_{\text{exc}} = 460$ nm.

Foram realizadas medições alternadas do pulso da lâmpada e da amostra (um máximo de 1500 contagens) recolhidos usando 1024 canais com uma escala de 97 ns/canal para os respetivos compostos. A excitação foi realizada a 460 nm e a emissão foi monitorizada a 650 nm. A resolução temporal considerada foi na ordem dos nanossegundos. Os decaimentos de fluorescência foram analisados pelo método das funções de modelação implementado por Striker e colaboradores, com correção automática do desvio de comprimentos de onda do fotomultiplicador. As curvas de decaimento da intensidade de fluorescência em função do tempo foram ajustadas a uma função mono ou bi-exponencial. As células usadas tinham 1 cm de percurso ótico. Foram preparadas soluções frescas que então foram desarejadas durante 20 minutos antes da medição e possuíam absorvância máxima na ordem de 0.15 (u.a.).

6.2.6. Formação de oxigénio singuleto

Os espectros de emissão de fosforescência do oxigénio singuleto na região de 1210-1365 nm foram detetados com um fotomultiplicador *Hamamatsu R5509-42* refrigerada a 193 K numa câmara de nitrogénio líquido (*Products for Research model PC176TSCE-005*) acoplado ao espectrofluorímetro *Horiba-Jobin-Ivon Fluorolog 322*. De forma a evitar a influência das harmónicas do espectro de emissão de fluorescência dos compostos, foi utilizado um filtro do tipo *longpass Newport* com corte a 1000 nm, assim, apenas a emissão a comprimentos de onda superiores a 1000 nm podem ser detectadas.

A determinação do rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto (ϕ_{Δ}) dos corróis em THF foi realizada através do método comparativo, em relação ao padrão TPP ($\phi_{\Delta} = 0.60$). As soluções do respetivo corrole e do padrão foram excitadas no mesmo comprimento de onda da mesma absorção (com OD entre 0.2 e 0.3, no comprimento de onda de excitação); em seguida, a área relativa de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerada pelos dois compostos foi correlacionada através da seguinte equação:

$$\phi_{\Delta}^{corrole} = \phi_{\Delta}^{TPP} \times \frac{\text{Área de emissão } ^1O_2^{Corrole}}{\text{Área de emissão } ^1O_2^{TPP}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Em que $\phi_{\Delta}^{corrole}$ corresponde ao rendimento quântico de formação de oxigénio singuleto. A dissolução do corrole e do padrão, que apresentam semelhanças nos espectros de absorção e na composição química, no mesmo solvente evita que a concentração de oxigénio molecular dissolvido afete a determinação do ϕ_{Δ} .

6.3. Estudos biológicos *in vitro*

6.3.1. Cultura celular

Foram utilizadas linhas celulares de carcinoma pulmonar de não pequenas células: A549 (CCL-185[®] TM, adenocarcinoma, P53^{Null}) e H1299 (ATCC CRL-5803[®] TM, large cell carcinoma, P53^{Null}) que foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas de acordo com procedimentos padrão utilizando o meio de “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% (A549) ou 5% (H1299) de Soro Bovino Fetal (FBS, Sigma F7524), 100 mM de piruvato de sódio e solução antibiótica/antimicótica 1% composta por penicilina e estreptomicina. Para a preparação de suspensões de células, as culturas foram destacadas por lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com Triple.

6.3.2. Tratamento fotodinâmico

Prepararam-se suspensões das linhas celulares A549 e H1299 numa concentração de 1×10^5 células/mL, distribuíram-se por placas de 48 poços, contendo cada poço um volume final de 500 μ L, e mantiveram-se na incubadora durante 24 h. O fotossensibilizador foi administrado em várias concentrações, entre 2.5 nM e 10 μ M, e de seguida as células foram incubadas por mais 24 h. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.. Cada placa continha poços controlo, incluindo células não tratadas e células tratadas apenas com o veículo de administração, DMSO. As células foram lavadas com PBS. Cada placa foi irradiada com uma fluência de 7.5 mW / cm² até um total de 10 J utilizando uma fonte de luz equipada com um filtro vermelho (< 560 nm). A avaliação foi realizada 24 h após o tratamento fotodinâmico.

6.3.3. Avaliação da citotoxicidade

Nos estudos de citotoxicidade no escuro o procedimento utilizado foi o mesmo que para o tratamento fotodinâmico, à exceção do passo da irradiação, que foi omitido.

A sensibilidade das diferentes linhas celulares ao fotossensibilizador foi analisada utilizando o ensaio calorimétrico MTT (Sigma M2128; Sigma-Aldrich, Inc.) para medir a atividade metabólica. As células foram lavadas com PBS e incubadas durante pelo menos 4 h com a solução de MTT (0.5 mg/mL). Para solubilizar os cristais de formazan adicionou-se uma solução 0.04 M de ácido clorídrico (Merck Millipore 100317) em isopropanol (Sigma 278475). A absorvância foi medida usando um leitor de placa multimodal EnSpire da Perkin Elmer. A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de inibição de culturas submetidas a terapia fotodinâmica correlacionada com culturas tratadas apenas com o veículo de administração. Isto permitiu traçar curvas dose-resposta para cada linha celular, obtidas no GraphPad Prism 8 e calcular a concentração de fotossensibilizador que inibe a proliferação celular em 50% (IC_{50}).

Capítulo 7

Referências

Capítulo 7

7. Referências

- (1) Odes, E. J.; Randolph-Quinney, P. S.; Steyn, M.; Throckmorton, Z.; Smilg, J. S.; Zipfel, B.; Augustine, T. N.; Beer, F. De; Hoffman, J. W.; Franklin, R. D.; Berger, L. R. Earliest Hominin Cancer: 1.7-Million-Yearold Osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S. Afr. J. Sci.* **2016**, *112* (7–8), 7–11. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150471>.
- (2) Randolph-Quinney, P. S.; Williams, S. A.; Steyn, M.; Meyer, M. R.; Smilg, J. S.; Churchill, S. E.; Odes, E. J.; Augustine, T.; Tafforeau, P.; Berger, L. R. Osteogenic Tumour in Australopithecus Sediba: Earliest Hominin Evidence for Neoplastic Disease. *S. Afr. J. Sci.* **2016**, *112* (7–8), 1–7. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150470>.
- (3) Bray, F.; Laversanne, M.; Weiderpass, E.; Soerjomataram, I. The Ever-Increasing Importance of Cancer as a Leading Cause of Premature Death Worldwide. *Cancer* **2021**. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>.
- (4) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *0* (0), 1–41. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (5) Mustafa, M.; Azizi, A. J.; Illzam, E.; Nazirah, A.; Sharifa, S.; Abbas, S. Lung Cancer: Risk Factors, Management, And Prognosis. *IOSR J. Dent. Med. Sci.* **2016**, *15* (10), 94–101. <https://doi.org/10.9790/0853-15100494101>.
- (6) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **2016**, *66* (1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- (7) Eggert, J. *Cancer Basics*, Second edi.; Oncology Nursing Society: Pittsburgh, Pennsylvania, 2017.
- (8) Cranganu, A.; Camporeale, J. Nutrition Aspects of Lung Cancer. *Nutr. Clin. Pract.* **2009**, *24* (6), 688–700. <https://doi.org/10.1177/0884533609352249>.
- (9) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021. *Atlanta Am. Cancer Soc.* **2021**.

- (10) Lemjabbar-Alaoui, H.; Hassan, O. U. I.; Yang, Y. W.; Buchanan, P. Lung Cancer: Biology and Treatment Options. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2015**, *1856* (2), 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
- (11) Garber, M. E.; Troyanskaya, O. G.; Schluens, K.; Petersen, S.; Thaessler, Z.; Pacyna-Gengelbach, M.; Van De Rijn, M.; Rosen, G. D.; Perou, C. M.; Whyte, R. I.; Altman, R. B.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Petersen, I. Diversity of Gene Expression in Adenocarcinoma of the Lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (24), 13784–13789. <https://doi.org/10.1073/pnas.241500798>.
- (12) Perez-Moreno, P.; Brambilla, E.; Thomas, R.; Soria, J. C. Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Molecular Subtypes and Therapeutic Opportunities. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (9), 2443–2451. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2370>.
- (13) Alberg, A. J.; Samet, J. M. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* **2003**, *123* (1 Suppl), 21S–49S. https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.21s.
- (14) Brawley, O. W.; Glynn, T. J.; Khuri, F. R.; Wender, R. C.; Seffrin, J. R. The First Surgeon General's Report on Smoking and Health: The 50th Anniversary. *CA. Cancer J. Clin.* **2014**, *64* (1), 5–8. <https://doi.org/10.3322/caac.21210>.
- (15) U.S. Department of Health and Human Services. *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease*; 2010.
- (16) Hecht, S. S. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. **1999**, *91* (14).
- (17) Peto, R.; Doll, R.; Buckley, J. D.; Sporn, M. B. Can Dietary Beta-Carotene Materially Reduce Human Cancer Rates? *Nature* **1981**, *290* (5803), 201–208. <https://doi.org/10.1038/290201a0>.
- (18) de Groot, P.; Munden, R. F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol. Clin. North Am.* **2012**, *50* (5), 863–876. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.006>.
- (19) Alberg, A. J.; Brock, M. V.; Ford, J. G.; Samet, J. M.; Spivack, S. D. Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* **2013**, *143* (5 SUPPL), e1S–e29S. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2345>.
- (20) Dela Cruz, C. S.; Tanoue, L. T.; Matthay, R. A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and

- Prevention. *Clin. Chest Med.* **2011**, 32 (4), 605–644.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>.
- (21) Desouky, O.; Ding, N.; Zhou, G. Targeted and Non-Targeted Effects of Ionizing Radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2015**, 8 (2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>.
- (22) Kanwal, M.; Ding, X. J.; Cao, Y. Familial Risk for Lung Cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, 13 (2), 535–542. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5518>.
- (23) Basu, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19 (4).
<https://doi.org/10.3390/ijms19040970>.
- (24) Cao, X.; Hou, J.; An, Q.; Assaraf, Y. G.; Wang, X. Towards the Overcoming of Anticancer Drug Resistance Mediated by P53 Mutations. *Drug Resist. Updat.* **2020**, 49, 100671.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100671>.
- (25) Tsiouda, T.; Sardeli, C.; Porpodis, K.; Pilikidou, M.; Apostolidis, G.; Kyrka, K.; Miziou, A.; Kyrka, K.; Tsingerlioti, Z.; Papadopoulou, S.; Heva, A.; Koulouris, C.; Giannakidis, D.; Boniou, K.; Kesisoglou, I.; Vagionas, A.; Kosmidis, C.; Sevva, C.; Papazisis, G.; Goganau, A. M.; Sapalidis, K.; Tsakiridis, K.; Tryfon, S.; Platanas, M.; Baka, S.; Zaric, B.; Perin, B.; Petanidis, S.; Zarogoulidis, P. Sex Differences and Adverse Effects between Chemotherapy and Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Cancer* **2020**, 11 (11), 3407–3415.
<https://doi.org/10.7150/jca.40196>.
- (26) Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J. Cancer Sci. Ther.* **2009**, 1 (2), 1–4. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>.
- (27) Allison, R. R.; Mota, H. C.; Sibata, C. H. Clinical PD/PDT in North America: An Historical Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, 1 (4), 263–277.
[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00084-5).
- (28) Dos Santos, A. F.; De Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L. Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2019**, 2019.
<https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.
- (29) Møller, K. I.; Kongshoj, B.; Philipsen, P. A.; Thomsen, V. O.; Wulf, H. C. How Finsen's Light Cured Lupus Vulgaris. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2005**, 21 (3), 118–124.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2005.00159.x>.

- (30) Kessel, D. Photodynamic Therapy: A Brief History. *J. Clin. Med.* **2019**, *8* (10), 1581. <https://doi.org/10.3390/jcm8101581>.
- (31) Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. New Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473* (4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
- (32) Luo, D.; Carter, K. A.; Miranda, D.; Lovell, J. F. Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. *Adv. Sci.* **2017**, *4* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1002/advs.201600106>.
- (33) Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106* (June), 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
- (34) Hamblin, M. R. Antimicrobial Photodynamic Inactivation: A Bright New Technique to Kill Resistant Microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>.
- (35) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA. Cancer J. Clin.* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (36) Saavedra, R.; Rocha, L. B.; Dabrowski, J. M.; Arnaut, L. G. Modulation of Biodistribution, Pharmacokinetics, and Photosensitivity with the Delivery Vehicle of a Bacteriochlorin Photosensitizer for Photodynamic Therapy. *ChemMedChem* **2014**, *9* (2), 390–398. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300449>.
- (37) Allison, R. R.; Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* **2013**, *46* (1), 24–29. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>.
- (38) Alemany Ribes, M.; Garcia-Diaz, M.; Acedo, P.; Agut, M.; Nonell, S.; Sagristá, M.; M, M.; Cañete, M.; A, V.; Stockert, J.; Semino, C. Why Not Introducing the Third Dimension in Photodynamic Therapy Research? *Anal. Bioanal. Tech.* **2013**. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.S1--004>.
- (39) Ion, R. M. Revisiting Tetra-p-Sulphonated Porphyrin as Antimicrobial Photodynamic Therapy

- Agent. *Coatings* **2021**, *11* (4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/coatings11040393>.
- (40) Fan, W.; Huang, P.; Chen, X. Overcoming the Achilles' Heel of Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (23), 6488–6519. <https://doi.org/10.1039/c6cs00616g>.
- (41) Liu, Y.; Qin, R.; Zaat, S. A. J.; Breukink, E.; Heger, M. Antibacterial Photodynamic Therapy: Overview of a Promising Approach to Fight Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *J. Clin. Transl. Res.* **2015**, No. December. <https://doi.org/10.18053/jctres.201503.002>.
- (42) Lan, M.; Zhao, S.; Liu, W.; Lee, C. S.; Zhang, W.; Wang, P. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (13), 1–37. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>.
- (43) Debele, T. A.; Peng, S.; Tsai, H. C. *Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy*; 2015; Vol. 16. <https://doi.org/10.3390/ijms160922094>.
- (44) Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. The Present and Future Role of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment. *Lancet Oncol.* **2004**, *5* (8), 497–508. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01529-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01529-3).
- (45) Warriar, A.; Mazumder, N.; Prabhu, S.; Satyamoorthy, K.; Murali, T. S. Photodynamic Therapy to Control Microbial Biofilms. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *33* (July 2020), 102090. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>.
- (46) Kim, M. M.; Darafsheh, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96* (2), 280–294. <https://doi.org/10.1111/php.13219>.
- (47) Zhu, T. C.; Finlay, J. C. The Role of Photodynamic Therapy (PDT) Physics. *Med. Phys.* **2008**, *35* (7), 3127–3136. <https://doi.org/10.1118/1.2937440>.
- (48) Morton, C. A.; McKenna, K. E.; Rhodes, L. E. Guidelines for Topical Photodynamic Therapy: Update. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159* (6), 1245–1266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08882.x>.
- (49) Mang, T. S. Lasers and Light Sources for PDT: Past, Present and Future. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2004**, *1* (1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00012-2).
- (50) Hempstead, J.; Jones, D. P.; Ziouche, A.; Cramer, G. M.; Rizvi, I.; Arnason, S.; Hasan, T.; Celli, J. P. Low-Cost Photodynamic Therapy Devices for Global Health Settings: Characterization of Battery-Powered LED Performance and Smartphone Imaging in 3D Tumor Models. *Sci. Rep.*

- 2015**, 5 (May), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep10093>.
- (51) Jiménez-Banzo, A.; Sagristà, M. L.; Mora, M.; Nonell, S. Kinetics of Singlet Oxygen Photosensitization in Human Skin Fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 44 (11), 1926–1934. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.011>.
- (52) Da Silva, E. F. F.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Toftegaard, R.; Kuimova, M. K.; Arnaut, L. G.; Ogilby, P. R. Erratum: Irradiation-and Sensitizer-Dependent Changes in the Lifetime of Intracellular Singlet Oxygen Produced in a Photosensitized Process (Journal of Physical Chemistry B (2012) 116 (445-461)). *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116 (50), 14734. <https://doi.org/10.1021/jp311629a>.
- (53) Hatz, S.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. Measuring the Lifetime of Singlet Oxygen in a Single Cell: Addressing the Issue of Cell Viability. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, 6 (10), 1106–1116. <https://doi.org/10.1039/b707313e>.
- (54) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, 24 (2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- (55) O’Connor, A. E.; Gallagher, W. M.; Byrne, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **2009**, 85 (5), 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.
- (56) Hockin, B. M.; Li, C.; Robertson, N.; Zysman-Colman, E. Photoredox Catalysts Based on Earth-Abundant Metal Complexes. *Catal. Sci. Technol.* **2019**, 9 (4), 889–915. <https://doi.org/10.1039/c8cy02336k>.
- (57) Kushibiki, T.; Hirasawa, T.; Okawa, S.; Ishihara, M. Responses of Cancer Cells Induced by Photodynamic Therapy. *J. Healthc. Eng.* **2013**, 4 (1), 87–108. <https://doi.org/10.1260/2040-2295.4.1.87>.
- (58) Mitton, D.; Ackroyd, R. A Brief Overview of Photodynamic Therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2008**, 5 (2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.04.004>.
- (59) Habermeyer, B.; Guilard, R. Some Activities of Porphyrinoids Illustrated by the Applications of Porphyrinoids in PDT, PIT and PDI. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, 17 (11), 1675–1690.

- <https://doi.org/10.1039/c8pp00222c>.
- (60) Park, W.; Cho, S.; Han, J.; Shin, H.; Na, K.; Lee, B.; Kim, D. H. Advanced Smart-Photosensitizers for More Effective Cancer Treatment. *Biomater. Sci.* **2018**, *6* (1), 79–90. <https://doi.org/10.1039/c7bm00872d>.
- (61) Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Appl. Sci.* **2021**, *11* (8). <https://doi.org/10.3390/app11083626>.
- (62) Sinclair, L. Recognizing, Treating and Understanding Pernicious Anaemia. *J. R. Soc. Med.* **2008**, *101* (5), 262–264. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2008.081006>.
- (63) Rickes, E. L.; Brink, N. G.; Koniuszy, F. R.; Wood, T. R.; Folkers, K. Crystalline Vitamin B12. *Science* **1948**, *107* (2781), 396–397. <https://doi.org/10.1126/science.107.2781.396>.
- (64) Zahid, S.; Qadeer, K.; Ahmad, I. Physicochemical Characteristics , Biological Functions and Deficiency of Cobalamins. **2011**, *14* (2).
- (65) Teo, R. D.; Hwang, J. Y.; Termini, J.; Gross, Z.; Gray, H. B. Fighting Cancer with Corroles. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (4), 2711–2729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00400>.
- (66) Zhan, H. Y.; Liu, H. Y.; Chen, H. J.; Jiang, H. F. Preparation of Meso-Substituted Trans-A2B-Corroles in Ionic Liquids. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (19), 2196–2199. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.02.140>.
- (67) Lopes, S. M. M.; Pineiro, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Corroles and Hexaphyrins: Synthesis and Application in Cancer Photodynamic Therapy. *Molecules* **2020**, *25* (15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153450>.
- (68) Pomarico, G.; Nardis, S.; Stefanelli, M.; Cicero, D. O.; Vicente, M. G. H.; Fang, Y.; Chen, P.; Kadish, K. M.; Paolesse, R. Synthesis and Characterization of Functionalized Meso - Triaryltetrabenzocorroles. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (15), 8834–8844. <https://doi.org/10.1021/ic4010467>.
- (69) Santos, C. I. M. Corroles: Synthesis, Functionalization and Application as Chemosensors. *ChemistryOpen* **2014**, *3* (3), 88–92. <https://doi.org/10.1002/open.201402001>.
- (70) Ivanova, Y. B.; Savva, V. A.; Mamardashvili, N. Z.; Starukhin, A. S.; Ngo, T. H.; Dehaen, W.; Maes, W.; Kruk, M. M. Corrole NH Tautomers: Spectral Features and Individual Protonation. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (44), 10683–10694. <https://doi.org/10.1021/jp305325e>.

- (71) Orowski, R.; Gryko, D.; Gryko, D. T. Synthesis of Corroles and Their Heteroanalogs. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (4), 3102–3137. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00434>.
- (72) Acunha, T. V.; Victória, H. F. V.; Krambrock, K.; Marques, A. C.; Costa, L. A. S.; Iglesias, B. A. Photophysical and Electrochemical Properties of Two: Trans-A2B-Corroles: Differences between Phenyl or Pyrenyl Groups at the Meso-10 Position. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (29), 16965–16977. <https://doi.org/10.1039/d0cp02364g>.
- (73) Lemon, C. M. Corrole Photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92* (12), 1901–1919. <https://doi.org/10.1515/pac-2020-0703>.
- (74) Lemon, C. M.; Halbach, R. L.; Huynh, M.; Nocera, D. G. Photophysical Properties of β -Substituted Free-Base Corroles. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (6), 2713–2725. <https://doi.org/10.1021/ic502860g>.
- (75) Lee, C. H.; S. Lindsey, J. One-Flask Synthesis of Meso-Substituted Dipyrromethanes and Their Application in the Synthesis of Trans-Substituted Porphyrin Building Blocks. *Tetrahedron* **1994**, *50* (39), 11427–11440. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)89282-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89282-6).
- (76) Gryko, D. T. A Simple, Rational Synthesis of Meso-Substituted A2B-Corroles. *Chem. Commun.* **2000**, No. 22, 2243–2244. <https://doi.org/10.1039/b006734m>.
- (77) Briñas, R. P.; Brückner, C. Triarylcorroles by Oxidative Coupling of Triaryltetrapyrans. *Synlett* **2001**, No. 3, 442–444. <https://doi.org/10.1055/s-2001-11409>.
- (78) Asokan, C. V.; Smeets, S.; Dehaen, W. Sterically Encumbered Triarylcorroles from Aryldipyrromethanes and Aromatic Aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (27), 4483–4485. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00762-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00762-6).
- (79) Decréau, R. A.; Collman, J. P. Corrole Synthesis by Dipyrromethane-Dicarbonyl and 2,2'-Bipyrrole Condensation. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (16), 3323–3327. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00617-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00617-8).
- (80) Rao, P. D.; Dhanalekshmi, S.; Littler, B. J.; Lindsey, J. S. Rational Syntheses of Porphyrins Bearing up to Four Different Meso Substituents. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (22), 7323–7344. <https://doi.org/10.1021/jo000882k>.
- (81) Guillard, R.; Gryko, D. T.; Canard, G.; Barbe, J. M.; Koszarna, B.; Brandès, S.; Tasiar, M. Synthesis of Corroles Bearing up to Three Different Meso Substituents. *Org. Lett.* **2002**, *4*

- (25), 4491–4494. <https://doi.org/10.1021/ol027003w>.
- (82) Diels, O.; Alder, K. Synthesen in Der Hydroaromatischen Reihe. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 460 (1), 98–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlac.19284600106>.
- (83) Woodward, R. B.; Katz, T. J. The Mechanism of the Diels-Alder Reaction. *Tetrahedron* **1959**, 5 (1), 70–89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020\(59\)80072-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020(59)80072-7).
- (84) Houk, K. N.; Gonzalez, J.; Li, Y. Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios, 1935-1995. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28 (2), 81–90. <https://doi.org/10.1021/ar00050a004>.
- (85) Eibler, E.; Höcht, P.; Prantl, B.; Roßmaier, H.; Schuhbauer, H. M.; Wiest, H.; Sauer, J. Transitions of Electron Demand in Pericyclic Reactions: Normal, Neutral, and Inverse Diels–Alder Reactions of Polyhalogenated Cyclopentadienes. *Liebigs Ann.* **1997**, 1997 (12), 2471–2484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlac.199719971209>.
- (86) Fringuelli, F.; Aldo, T. *The Diels–Alder Reaction: Selected Practical Methods*; John Wiley & Sons, Ltd, 2001. <https://doi.org/10.1002/0470845813>.
- (87) Attanasi, O. A.; Filippone, P. Working Twenty Years on Conjugated Azo-Alkenes (and Environs) to Find New Entries in Organic Synthesis. *Synlett* **1997**, 1997 (10), 1128–1140.
- (88) Grosso, C.; Liber, M.; Brigas, A. F.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Lemos, A. Regioselectivity in Hetero Diels–Alder Reactions. *J. Chem. Educ.* **2019**, 96 (1), 148–152. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00933>.
- (89) Clarke, S. J.; Gilchrist, T. L.; Lemos, A.; Roberts, T. G. Reactions of Azoalkenes Derived from Hydrazones of Ethyl Bromopyruvate with Electron Rich Alkenes and Heterocycles. *Tetrahedron* **1991**, 47 (29), 5615–5624. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80992-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80992-3).
- (90) Gilchrist, T. L.; Lemos, A. Reaction of Pyrroles with Ethyl 2-Nitroso- and 2-Azo-Propenoates, and with Ethyl Cyanoformate N-Oxide: A Comparison of the Reaction Pathways. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, No. 13, 1391–1396. <https://doi.org/10.1039/p19930001391>.
- (91) Lopes, S. M. M.; Brigas, A. F.; Palacios, F.; Lemos, A.; e Melo, T. M. V. D. [4+2] Cycloadditions of 3-Tetrazolyl-1,2-Diaza-1,3-Butadienes: Synthesis of 3-Tetrazolyl-1,4,5,6-Tetrahydropyridazines. *European J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (11), 2152–2160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejoc.201101826>.
- (92) Pereira, N. A. M.; Lopes, S. M. M.; Lemos, A.; Pinho E Melo, T. M. V. D. On-Water Synthesis

- of Dipyrromethanes via Bis-Hetero-Diels-Alder Reaction of Azo- and Nitrosoalkenes with Pyrrole. *Synlett* **2014**, 25 (3), 423–427. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340300>.
- (93) Lopes, S. M. M.; Lemos, A.; Pinhoe Melo, T. M. V. D. Reactivity of Dipyrromethanes towards Azoalkenes: Synthesis of Functionalized Dipyrromethanes, Calix[4]Pyrroles, and Bilanes. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (31), 7039–7048. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201402944>.
- (94) Lopes, S. M. M.; Pinho E Melo, T. M. V. D. Meso-Substituted Corroles from Nitrosoalkenes and Dipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **2020**, 85 (5), 3328–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03151>.
- (95) Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C. H.; Wagner, R. W.; O’Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S. Refined Synthesis of 5-Substituted Dipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **1999**, 64 (4), 1391–1396. <https://doi.org/10.1021/jo982015+>.
- (96) Senapak, W.; Saeeng, R.; Jaratjaronphong, J.; Kasemsuk, T.; Sirion, U. Green Synthesis of Dipyrromethanes in Aqueous Media Catalyzed by SO₃H-Functionalized Ionic Liquid. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (4), 1302–1310. <https://doi.org/10.1039/C5OB01953B>.
- (97) Serra, A.; Pineiro, M.; Santos, C. I.; Rocha Gonsalves, A. M. d’A.; Abrantes, M.; Laranjo, M.; Botelho, M. F. In Vitro Photodynamic Activity of 5,15-Bis(3-Hydroxyphenyl)Porphyrin and Its Halogenated Derivatives Against Cancer Cells. *Photochem. Photobiol.* **2010**, 86 (1), 206–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00622.x>.
- (98) Maynard, J. A. The Use of Diethyl Phosphonate as a Solvent and Catalyst for the Preparation of Arylhydrazones. *Aust. J. Chem.* **1962**, 15 (4), 867–868. <https://doi.org/10.1071/CH9620867>.
- (99) Verma, G.; Marella, A.; Shaquiquzaman, M.; Akhtar, M.; Ali, M. R.; Alam, M. M. A Review Exploring Biological Activities of Hydrazones. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2014**, 6 (2), 69–80. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>.
- (100) Sakai, K.; Hida, N.; Kondo, K. Reactions of α -Polyhalo Ketone Tosylhydrazones with Sulfide Ion and Primary Amines. Cyclization to 1,2,3-Thiadiazoles and 1,2,3-Triazoles. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1986, pp 179–183. <https://doi.org/10.1246/bcsj.59.179>.
- (101) South, M. S.; Jakuboski, T. L.; Westmeyer, M. D.; Dukeshere, D. R. Synthesis and Reactions

- of Haloazodienes. A New and General Synthesis of Substituted Pyridazines. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (25), 8921–8934. <https://doi.org/10.1021/jo960029e>.
- (102) Lopes, S. M. M.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Meso-Substituted Corroles from Nitrosoalkenes and Dipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (5), 3328–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03151>.
- (103) Attanasi, O. A.; De Crescentini, L.; Filippone, P.; Fringuelli, F.; Mantellini, F.; Matteucci, M.; Piermatti, O.; Pizzo, F. “Inverse-Electron-Demand” Diels-Alder Reactions of (E)-3-Diazenylbut-2-Enes in Water. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84* (2), 513–525. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(20010228\)84:2<513::AID-HLCA513>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1522-2675(20010228)84:2<513::AID-HLCA513>3.0.CO;2-S).
- (104) Cardoso, A. L.; Lopes, S. M. M.; Grosso, C.; Pineiro, M.; Lemos, A.; Pinho E Melo, T. M. V. D. One-Pot Synthetic Approach to Dipyrromethanes and Bis(Indolyl)Methanes via Nitrosoalkene Chemistry. *J. Chem. Educ.* **2021**, *98* (8), 2661–2666. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00184>.
- (105) Mayerhöfer, T. G.; Pahlow, S.; Popp, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem* **2020**, 2029–2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>.
- (106) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; New York: Springer, 2006.
- (107) Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Relative and Absolute Determination of Fluorescence Quantum Yields of Transparent Samples. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (8), 1535–1550. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.087>.
- (108) Bursa, B.; Wróbel, D.; Barszcz, B.; Kotkowiak, M.; Vakuliuk, O.; Gryko, D. T.; Kolanowski, Ł.; Baraniak, M.; Lota, G. The Impact of Solvents on the Singlet and Triplet States of Selected Fluorine Corroles - Absorption, Fluorescence, and Optoacoustic Studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (10), 7216–7228. <https://doi.org/10.1039/c5cp06335c>.
- (109) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1), 55–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- (110) Yoshida, N.; Shimidzu, H.; Osuka, A. Meso-Meso Linked Diporphyrins from 5,10,15-Trisubstituted Porphyrins. *Chemistry Letters*. 1998, pp 55–56. <https://doi.org/10.1246/cl.1998.55>.

- (111) Zoli, L.; Cozzi, P. G. Electrophilic Activation of Aldehydes “on Water”: A Facile Route to Dipyrrromethanes. *ChemSusChem* **2009**, 2 (3), 218–220.
<https://doi.org/10.1002/cssc.200900023>.
- (112) Patra, G.; Diskin-Posner, Y.; Goldberg, I. Meso-(4-Nitro-phenyl)-dipyrro-methane. *Acta Crystallogr. Sect. E* **2002**, 58. <https://doi.org/10.1107/S160053680200613X>.
- (113) Yan, Z.; Jun, L.; Zhicai, S. Fast and Eco-Friendly Synthesis of Dipyrrromethanes by H₂SO₄ Center Dot SiO₂ Catalysis under Solvent-Free Conditions. *CHINESE J. Chem.* **2010**, 28 (2), 259–262. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201090063>.
- (114) Wang, Q. M.; Bruce, D. W. One-Step Synthesis of β , Meso-Unsubstituted Dipyrrromethane. *Synlett* **1995**, 1995 (12), 1267–1268.
- (115) Lemos, A.; Lourenço, J. P. Cycloaddition Reactions of Nitrosoalkenes, Azoalkenes and Nitrile Oxides Mediated by Hydrotalcite. *Arkivoc* **2010**, 2010 (5), 170–182.
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0011.515>.
- (116) Inês Catarina Ferreira Fonseca. QUÍMICA DOS AZO- E NITROSO-ALQUENOS NA SÍNTESE DE COMPOSTOS TETRAPIRRÓLICOS, 2017.

Capítulo 8

Apêndice

Capítulo 8

8. Apêndice

Apêndice A:

