

Síntese de novos (bio)conjugados porfirínicos

Rodrigo Pinto Monteiro

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

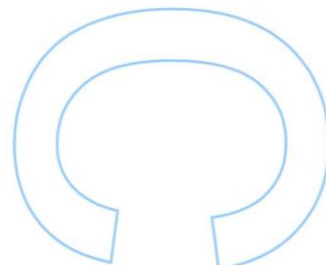
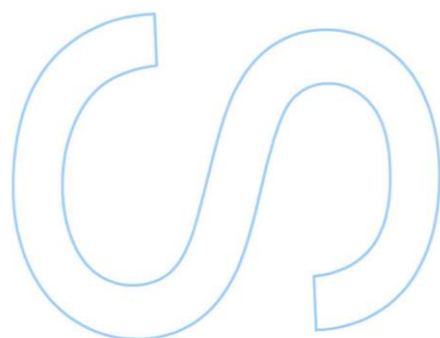
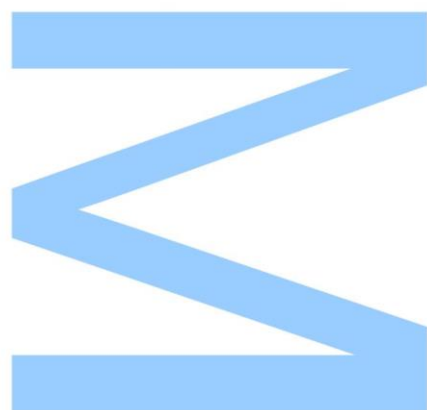
2019

Orientador

Professor Doutor Baltazar Manuel Romão de Castro, Professor
Catedrático da Faculdade de Ciências

Coorientador

Doutora Ana Margarida Gomes da Silva, Investigadora Auxiliar do
LAQV/REQUIMTE da Faculdade de Ciências

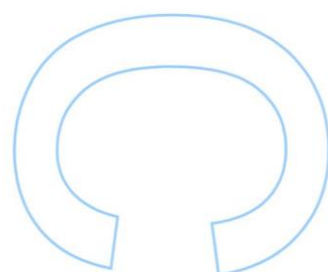
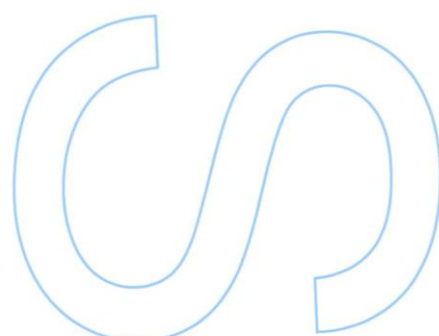
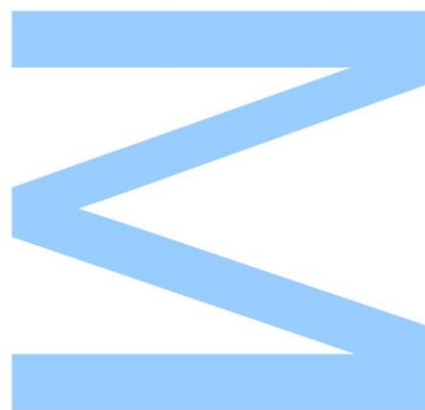




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Antes que me esqueça de alguém, quero deixar aqui o meu profundo agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte deste meu percurso até chegar aqui. A todos o meu “Muito obrigado!”.

Começo por agradecer às instituições nas quais este trabalho foi desenvolvido: ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, ao Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV/REQUIMTE) e ao Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pela oportunidade dada e pela formação científica.

Um agradecimento ao meu orientador, o Professor Doutor Baltazar de Castro, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, bem como pelo acolhimento na sua equipa de investigação.

Agradeço especialmente à Doutora Ana Margarida Silva, minha co-orientadora, por todo o conhecimento que me transmitiu durante a realização deste trabalho, pelo seu entusiasmo contagiante pelos macrociclos porfirínicos e por me ter cativado a trabalhar no grupo de investigação que integra o laboratório CHEL2LIFE - Chelators to Life Sciences. Estou-lhe igualmente grato por todo apoio, paciência e amizade prestados ao longo destes últimos tempos.

À Professora Doutora Maria da Conceição Rangel pelo bom acolhimento que tive da sua parte, pela simpatia e atenção dispensada naquilo que foi necessário.

À Professora Doutora Paula Gomes e à Doutora Cátia Teixeira, do LAQV/REQUIMTE, por terem aceitado a colaboração para a síntese do conjugado porfirina-péptido, bem como por todo o apoio prestado.

Ao José Almeida por todo o apoio prestado, por ter sido incansável para me ajudar em diversas situações a nível profissional e pessoal, de forma a que conseguisse alcançar os objetivos pretendidos. Agradeço também o apoio principalmente quando tudo corria mal. Além disso, estou grato pela amizade, hospitalidade, boa disposição e paciência, o que tornou agradável a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório 2.39: André Silva, Andreia Leite, Carla Queirós, Inês Moreira, Jéssica Fernanda e Sílvia Vinhas por me fazerem sentir em casa quando estou na sua presença, bem como por todo apoio a nível científico e de organização laboratorial, mas também pela amizade e boa disposição. Aproveito também para agradecer ao pessoal dos laboratórios vizinhos a simpatia e amizade que sempre tiveram para comigo.

Aos meus amigos de escrita (e não só): Alexandre Viana, Ana Sofia Silva, Carlos Miranda, Pedro Ferreira e Renata Matos, pela paciência, por todo o apoio e amizade, não só nesta fase, mas também durante todo o restante percurso académico.

Ao meu amigo Daniel Silva, com quem já trabalhei várias vezes, desde o início deste percurso académico, e pessoa em quem tenho bastante confiança, agradeço toda a amizade, companheirismo e solidariedade durante esta última fase.

Às minhas amigas Diana Correia e Inês Ramos, que lidaram de bastante perto com esta fase da minha vida e que nunca deixaram de me apoiar e sempre estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço toda a amizade e confiança que em mim depositaram.

Ao Ricardo Costa, que além de um grande amigo é como um irmão mais velho, fica aqui o agradecimento por tudo, mesmo até por me ter “desencaminhado” (no bom sentido da palavra) para que pudesse também ter um descanso na escrita desta tese. Estou-lhe grato pelas longas conversas pela madrugada fora, enquanto fazia pausas na escrita.

Fica também um agradecimento ao senhor Vítor Carvalho por toda a amizade e pela paciência, mas também por me “desencaminhar” de forma a poder descansar na escrita da tese.

Agradeço aos meus amigos da residência Novais Barbosa: António Santos, Ernesto Afonso, Fábio Gomes, Fátima Abreu, Francisco Pires, Guilherme Cristóvão, Jorge Santos, Margarida Figueira, Nicole Gouveia, Pedro Perdigão, Rute Pereira e Salomé Fonseca. A todos eles estou grato pelos bons momentos que me proporcionaram durante esta fase, assim como também por me “desencaminharem” para poder descansar da escrita.

Por fim, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais, Leonel Monteiro e Cândida Pinto e ao meu irmão David Monteiro, por serem a minha base de apoio, por me apoiarem desde sempre em todas as minhas decisões e por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Peço desculpa a alguém que me tenha esquecido, mais uma vez, fica aqui o meu agradecimento a todos os que direta ou indiretamente fizeram parte desta etapa da minha vida.

Muito obrigado a todos!

Resumo

O trabalho aqui apresentado tem como principal objetivo a obtenção de novos (bio)conjugados porfirínicos, com propriedades farmacocinéticas e fotofísicas melhoradas. Uma vez obtidos os conjugados, pretende-se que estes possam vir a ser utilizados no tratamento e/ou fotodiagnóstico do cancro.

No primeiro capítulo, é feita, primeiramente, uma abordagem geral e histórica dos macrociclos porfirínicos, assim como das suas propriedades físico-químicas, fotofísicas e reatividade. Em seguida, são abordadas algumas estratégias de síntese destes compostos, assim como a metodologia seguida no presente trabalho. Nos segundo e terceiro capítulos apresentam-se os (bio)conjugados obtidos, tal como as rotas de síntese seguidas para a sua obtenção.

O segundo capítulo apresenta os conjugados porfirínicos obtidos *via* reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre(I) (Cu(I)AAC), sendo esta um exemplo de reação de “click chemistry” que envolveu o uso de um derivado de *meso*-tetrafenilporfirina funcionalizado com o grupo terminal azida (espécie 1,3-dipolar) e um alcino (dipolarófilo). Aqui destaca-se o conjugado porfirina-péptido obtido a partir da reação com um péptido aniónico funcionalizado com o grupo alcino, assim como os conjugados obtidos a partir da reação com o fenilacetileno e propiolato de metilo, apresentando estes últimos rendimentos na ordem dos 70-80%.

O terceiro capítulo aborda a síntese de novos conjugados porfirínicos obtidos por reação de macrociclos porfirina/clorina funcionalizados com o grupo amina e o fluoróforo cloreto de dansilo *via* formação de sulfonamidas. Inicialmente foi obtida a clorina fundida ao anel pirrolidina *via* reação de cicloadição 1,3-dipolar da *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina com o ileto de azometino gerado a partir de glicina e paraformaldeído. Em seguida, esta clorina foi funcionalizada com *N*-(2-bromoetil)ftalimida, seguindo-se remoção do grupo ftalimida de modo a obter-se o grupo amina. A partir desta clorina, assim como da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (**3**), foram realizados os acoplamentos ao cloreto de dansilo com recurso ao aquecimento por micro-ondas, tendo-se obtido os conjugados esperados.

Os compostos obtidos foram analisados por espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC, por espetrometria de massa por ionização de eletrospray (ESI-MS) e por espetroscopia de UV/Vis e fluorescência. Sempre que possível, na síntese dos macrociclos porfirínicos, optou-se pelo uso de processos de síntese sustentável, que envolveram o uso do aquecimento por micro-ondas e de catalisadores, como por exemplo cobre(I).

Palavras-chave: (bio)conjugados porfirínicos, cicloadição azida-alcino catalisada por cobre(I), PDT, propriedades fotofísicas, fluoróforo dansilo, péptidos, porfirinas, clorinas, cicloadição 1,3-dipolar, aquecimento com radiação micro-ondas

Abstract

The work presented here aims the preparation of new porphyrinic (bio)conjugates, with enhanced pharmacokinetics and photophysical properties. Once obtained the conjugates, it is intended to explore their potential application in the treatment and/or photodiagnostic of cancer.

The first chapter focuses on a general and historical approach of porphyrinic macrocycles as well as of their physicochemical, photophysical and reactivity properties. Then, some synthetic strategies to obtain these compounds are addressed as well as a brief description of the methodology followed in this work. The second and third chapters describe the (bio)conjugates obtained, as well as, the more suitable synthetic approach used to reach them.

The second chapter presents the porphyrinic conjugates obtained *via* copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition (Cu(I)AAC), as an example of “click chemistry” reaction, that involves the use of a functionalized *meso*-tetraphenylporphyrin derivative with azide terminal group (1,3-dipolar species) and an alkyne (dipolarophile). Here stands out the porphyrin-peptide conjugate obtained by the reaction using an alkyne group functionalized anionic peptide, as well as the conjugates obtained by phenylacetylene and methyl propiolate, presenting the last ones yields in the order of 70-80%.

The third chapter addresses the synthesis of new porphyrinic conjugates obtained by amino-functionalized porphyrin/chlorin macrocycles reactions with dansyl chloride fluorophore *via* sulphonamide formation. Initially it was synthesized the pyrrolidine-fused chlorin *via* 1,3-dipolar cycloaddition reaction of *meso*-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin with azomethine ylide generated from glycine and paraformaldehyde. Then, this chlorin was functionalized with *N*-(2-bromoethyl)phthalimide, following up by phthalimide removing to obtain the amine group. Starting from this chlorin, as well as from 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (**3**), the coupling reactions were performed with the dansyl chloride using microwave heating, giving rise to the expected conjugates.

The obtained compounds were analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), including ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC and HSQC, by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. Whenever possible, in the synthesis of porphyrinic macrocycles, we opted for the use of sustainable synthesis processes, that involved the use of microwave heating and catalysts, such as copper(I).

Keywords: porphyrinic (bio)conjugates, copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition, PDT, photophysical properties, dansyl fluorophore, peptides, porphyrins, chlorins, 1,3-dipolar cycloaddition, microwave heating

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xiv
Lista de Esquemas	xvi
Lista de Tabelas	xvii
Lista de abreviaturas geral.....	xix
Lista de abreviaturas de compostos	xx
Lista de símbolos.....	xxi
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Macrociclos porfirínicos	3
1.1.1. Uma perspetiva geral e histórica.....	3
1.1.2. Estrutura, propriedades, reatividade e nomenclatura.....	4
1.1.3. Métodos de síntese	7
1.2. Terapia fotodinâmica – uma revisão	9
1.3. Fotossensibilizadores porfirínicos	11
1.4. Objetivo e metodologia geral do trabalho.....	15
1.5. Referências	17
Capítulo 2 - Síntese de (bio)conjugados porfirínicos <i>via</i> reação de cicloadição catalisada por cobre(I)	21
2.1. Motivação e objetivos.....	23
2.2. Síntese do precursor porfirínico contendo o grupo azida.....	24
2.3. Caracterização estrutural dos precursores porfirínicos	27
2.3.1. Caracterização por RMN de ¹ H.....	27
2.3.2. Caracterização por UV/Vis e fluorescência.....	29
2.4. Obtenção de conjugados porfirínicos <i>via</i> reação de Cu(I)AAC.....	30
2.4.1. Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e fenilacetileno	31

2.4.2.	Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e propiolato de metilo	31
2.5.	Caracterização estrutural dos conjugados obtidos	32
2.5.1.	Caracterização por RMN	32
2.5.2.	Caracterização por ESI-MS	35
2.5.3.	Caracterização por espectroscopia de UV/Vis e fluorescência.....	36
2.6.	Síntese do conjugado porfirina-péptido via reação de Cu(I)AAC	37
2.6.1.	Estratégia de síntese	37
2.6.2.	Caracterização estrutural do conjugado porfirina-péptido obtido	40
2.7.	Referências	43
Capítulo 3 - Novos derivados porfirínicos obtidos por reação com o fluoróforo dansilo		45
3.1.	Motivação e objetivos.....	47
3.2.	Síntese de precursores porfirínicos contendo o grupo amina.....	47
3.3.	Caracterização estrutural da clorina 12	56
3.3.1.	Caracterização por RMN de ¹ H.....	56
3.3.2.	Caracterização por ESI-MS	57
3.4.	Reação de macrociclos porfirínicos com cloreto de dansilo	58
3.4.1.	Reação de porfirina 3 com cloreto de dansilo	58
3.4.2.	Reação de clorina 12 com cloreto de dansilo.....	59
3.5.	Caracterização estrutural dos derivados obtidos	59
3.5.1.	Caracterização por RMN	59
3.5.2.	Caracterização por ESI-MS	60
3.5.3.	Caracterização por UV/Vis e fluorescência.....	61
3.6.	Referências	63
Capítulo 4 - Conclusão e Perspetivas de Futuro		65
Capítulo 5 - Parte Experimental		69
5.1.	Reagentes, solventes e equipamento	71
5.2.	Síntese de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (1)	72
5.3.	Síntese da 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (2)	72
5.4.	Síntese da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (3)	72

5.5. Síntese da porfirina (4)	73
5.6. Metalção de porfirina 4 com Zn(II) – Síntese da metaloporfirina (5).....	73
5.7. Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e fenilacetileno (6)	74
5.8. Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e propiolato de metilo (7).....	74
5.9. Síntese do péptido PepNeg	75
5.9.1. Preparação da montagem e da resina e construção da sequência peptídica SGTQEEY	75
5.9.2. Acoplamento de ácido 5-hexinóico em <i>N</i> -terminal.....	76
5.9.3. Clivagem da peptidil-resina para obtenção do produto desejado	76
5.10. Reação de click de porfirina 5 e péptido PepNeg (8)	77
5.11. Síntese de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (9)	77
5.12. Cicloadição 1,3-DC de porfirina 9 com ileto de azometino (10)	77
5.13. <i>N</i> -alquilação da clorina 10 com <i>N</i> -(2-bromoetil)ftalimida (11)	78
5.14. Hidrólise do grupo ftalimida da clorina 11 (12)	78
5.15. Acoplamento do cloreto de dansilo à clorina 12 (13)	79
5.16. Acoplamento do cloreto de dansilo à porfirina 3 (14).....	79
5.17. Referências.....	81
Anexos.....	83

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Estruturas das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	3
Figura 1.2 – Grupo heme	4
Figura 1.3 – Macrociclos tetrapirrólicos	4
Figura 1.4 – Espectros de absorção de alguns macrociclos tetrapirrólicos (Adaptado da ref [2])	5
Figura 1.5 – Janela fototerapêutica (Adaptado da ref [23])	11
Figura 1.6 – Estrutura do ácido 5-aminolevulínico	14
Figura 2.1 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da porfirina 4 , com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b)	28
Figura 2.2 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da porfirina 5 , com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b)	29
Figura 2.3 – Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) da porfirina 4 em DMF	30
Figura 2.4 – Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) da porfirina 5 em DMF	30
Figura 2.5 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) do conjugado 6 , com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b)	32
Figura 2.6 – Espectro de COSY do conjugado 6	33
Figura 2.7 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) do conjugado 7 , com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b)	34
Figura 2.8 – Espectro de COSY do conjugado 7	34
Figura 2.9 – Espectro de RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CD_3OD) do conjugado 7	35
Figura 2.10 – Espectros de HSQC (a) e HMBC (b) do conjugado 7	35
Figura 2.11 – Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) do conjugado 6 em DMF	37
Figura 2.12 – Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) do conjugado 7 em DMF	37
Figura 2.13 – Espectro de ESI-MS do péptido PepNeg	40
Figura 2.14 – Espectro de ESI-MS da mistura reacional obtida	41
Figura 2.15 – Espectro de ESI-MS do precipitado após centrifugação	41
Figura 3.1 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da clorina 10	51
Figura 3.2 – Espectros de UV/Vis (verde) e de fluorescência (vermelho) da clorina 10 , em CHCl_3	52
Figura 3.3 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) do intermediário 11.1	56
Figura 3.4 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da clorina 12	57
Figura 3.5 – Espectro de ESI-MS (positivo) do intermediário 11.1	57
Figura 3.6 – Espectro de ESI-MS (positivo) da clorina 12	58
Figura 3.7 – Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) do derivado 14 , com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b1 e b2)	60
Figura 3.8 – Espectros de UV/Vis (vermelho) e de fluorescência (azul) do derivado 14 , em DMF	62

Figura A.1 – Rota de síntese dos conjugados porfirínicos na presente tese	A
Figura A.2 – Rota de síntese dos macrociclos porfirínicos obtidos no Capítulo 3.....	B

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 – Exemplo de reação de halogenação da 5,10,15-trifenilporfirina (Adaptado da ref [10])	6
Esquema 1.2 – Reação de formilação de 5,10,15,20-tetraarilporfirinas (Adaptado da ref. [11])	6
Esquema 1.3 – Passos importantes na reação pirrole e aldeído para a síntese de porfirinas (Adaptado da ref [18])	7
Esquema 1.4 – Síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas a partir do método de Gonsalves <i>et al</i> (Adaptado da ref [19])	8
Esquema 1.5 – Síntese de <i>meso</i> -tetraarilporfirinas recorrendo ao aquecimento MW (Adaptado da ref [22])	9
Esquema 1.6 – Etapas gerais associadas ao processo de tratamento por PDT	10
Esquema 1.7 – Reação de cicloadição catalisada por cobre(I) (Cu(I)AAC) envolvendo a porfirina 5 contendo o substituinte azida e um alcino.....	15
Esquema 1.8 – Reação entre os macrociclos porfirínicos (3 ou 12) contendo o grupo amina e o fluoróforo cloreto de dansilo	15
Esquema 2.1 – Reação de cicloadição 1,3-dipolar: A) Híbridos de ressonância do grupo azida e B) Mecanismo concertado proposto	23
Esquema 2.2 – Síntese de quinolonas substituídas com o anel triazole por Cu(I)AAC com aquecimento por radiação de micro-ondas (MW).....	24
Esquema 2.3 – Síntese do complexo de Zn(II) da porfirina substituída com o grupo azida (5).....	27
Esquema 2.4 – Síntese do conjugado 6 a partir da reação de cicloadição de porfirina 5 com fenilacetileno.....	31
Esquema 2.5 – Síntese do conjugado 7 a partir da reação de cicloadição de porfirina 5 com propiolato de metilo.....	31
Esquema 2.6 – Síntese do conjugado porfirina-péptido 8 via Cu(I)AAC de porfirina 5 e o péptido PepNeg	39
Esquema 3.1 – A) Síntese da clorina 10 a partir da porfirina 9 via reação 1,3-DC com o ileto de azometino gerado a partir do par glicina/paraformaldeído. B) Mecanismo de formação do ileto de azometino e da reação de 1,3-DC	48
Esquema 3.2 – A) Estratégia de desproteção do grupo ftalimida. B) Mecanismo proposto.....	55
Esquema 3.3 – Estratégia de síntese da clorina 12 a partir da clorina 10	55
Esquema 3.4 – Síntese do derivado 14 a partir da porfirina 3 com o cloreto de dansilo	59
Esquema 3.5 – Síntese do derivado 13 a partir da clorina 12 com o cloreto de dansilo	59

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Exemplos de PSs porfirínicos utilizados em ensaios para PDT.....	12
Tabela 2.1 – Exemplos de conjugados porfirina-péptido existentes ^[12]	24
Tabela 2.2 – Comprimentos de onda máximos de absorção com respetivas absortividades molares e comprimentos de onda máximos de emissão e valores de rendimento quântico para as porfirinas 4 e 5	29
Tabela 2.3 – Comprimentos de onda máximos de absorção com respetivas absortividades molares e comprimentos de onda máximos de emissão e valores de rendimento quântico para os conjugados 6 e 7	36
Tabela 3.1 – Principais diferenças entre o equipamento multimodo e monomodo.....	49
Tabela 3.2 – Condições experimentais da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre a porfirina 9 e o par glicina/paraformaldeído, realizada no equipamento de aquecimento por radiação MW multimodo	49
Tabela 3.3 – Valores das absortividades molares das bandas Soret e Q da clorina 10 , em CHCl ₃	52
Tabela 3.4 – Condições experimentais para a síntese da clorina 11 por aquecimento convencional	53
Tabela 3.5 – Condições experimentais para a síntese da clorina 11 em aquecimento micro-ondas monomodo.....	53
Tabela 3.6 – Valores das absortividades molares das bandas Soret e Q do derivado 14 , em DMF	61

Lista de abreviaturas geral

Abs – absorvância

COSY – correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, em RMN (*Correlated Spectroscopy*)

Cu(I)AAC – cicloadição azida-alcino catalisada por cobre(I) (*Copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition*)

1,3-DC – reação de cicloadição 1,3-dipolar (*1,3-dipolar cycloaddition*)

ESI-MS – espectrometria de massa por ionização de eletrospray (*Electrospray ionization – mass spectrometry*)

HMBC – correlação de múltipla ligação heteronuclear (*Heteronuclear multiple bond correlation*)

HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detetor Diode Array (*High performance liquid chromatography – Diode Array Detector*)

HSQC – espectroscopia de coerência quântica única heteronuclear (*Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*)

LC-MS – cromatografia líquida com detetor de espectrometria de massa (*Liquid chromatography – mass spectrometry*)

MW – micro-ondas (*Microwave*)

PDT – terapia fotodinâmica (*Photodynamic therapy*)

ppm – partes por milhão

PS(s) – fotossensibilizador(es) (*Photosensitizer(s)*)

RMN – ressonância magnética nuclear

ROS – espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)

SPPS – síntese peptídica em fase sólida (*Solid phase peptidic synthesis*)

t.a. – temperatura ambiente

UV/Vis – ultravioleta/visível

Lista de abreviaturas de compostos

ALA – ácido 5-aminolevulínico

Ce6 – clorina e6

DDQ – 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona

DIPEA – *N,N*-diisopropiletilamina

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

EDC – hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida

EEDQ – 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina

HBTU – hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazole-1-il)urónio

HOBt – hidrato de 1-hidroxibenzotriazol

HpD – derivados da hematoporfirina

MeCN – acetonitrilo

MTBE – éter *terc*-butilmetílico

NaAsc – ascorbato de sódio

TFA – ácido trifluoroacético

THF – tetrahidrofurano

TiS – tri-isopropilsilano

TPP – 5,10,15,20-tetrafenilporfirina

Lista de símbolos

ε – absorvidade molar

J – constante de acoplamento

δ – desvio químico

$[M+H]^+$ – íão quasi-molecular

$M^{\cdot+}$ – íão molecular radicalar

m/z – razão massa/carga

ϕ_F – rendimento quântico de fluorescência

d – duplete

dd – duplo duplete

m – multiplete

s – singuleto

t – tripleto

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Macrociclos porfirínicos

1.1.1. Uma perspetiva geral e histórica

Os macrociclos porfirínicos têm um papel importante em funções vitais na Natureza, encontrando-se presentes em processos naturais, tais como a respiração e a fotossíntese.^[1]

Dentro das clorinas de origem natural mais abundantes, incluem-se as clorofilas (Figura 1.1) que estão presentes em plantas e cianobactérias.^[2]

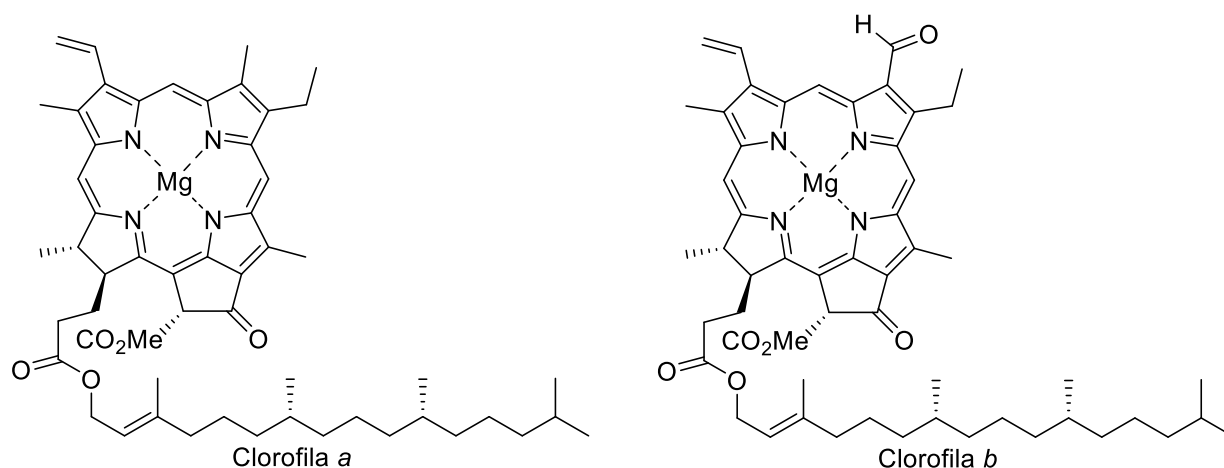


Figura 1.1 - Estruturas das clorofilas a e b

As clorofilas foram isoladas pela primeira vez em 1817 por Caventou e Pelletier, no entanto só uns anos mais tarde, em 1864, é que Stokes observou que o extrato de clorofila obtido continha dois componentes: a clorofila a e a clorofila b.^[2]

Além da cor verde das folhas, que é da responsabilidade das clorofilas, os derivados porfirínicos também são responsáveis pela cor vermelha do sangue. No segundo caso, houve alguns momentos importantes no passado que permitiram a descoberta da estrutura da porfirina. Em 1864, Hoppe-Seyler designou o pigmento isolado a partir do sangue por “hemoglobina” e, nos anos seguintes, este mesmo cientista mostrou que as porfirinas isoladas a partir do sangue são macrociclos tetrapirrólicos e que o grupo heme (Figura 1.2) e as clorofilas são estruturalmente semelhantes.^[1]

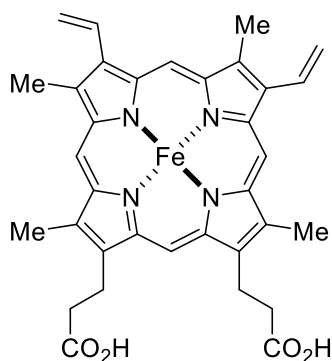


Figura 1.2 – Grupo heme

1.1.2. Estrutura, propriedades, reatividade e nomenclatura

Dentro dos macrociclos tetrapirrólicos encontram-se as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, entre outros (Figura 1.3). Neste trabalho a numeração utilizada foi a recomendada pela IUPAC, em que foram assinaladas as posições dos carbonos *meso* (5,10,15 e 20) e as posições β -pirrólicas (2,3,7,8,12,13,17 e 18) conforme indicado na Figura 1.3.

Estruturalmente, as porfirinas são caracterizadas como macrociclos tetrapirrólicos, contendo quatro anéis pirrólicos que se encontram ligados entre si por pontes metínicas. Estas são classificadas como compostos aromáticos apresentando, um centro de coordenação N4 com elevada afinidade para coordenar uma grande variedade de iões de metal.^[3, 4]

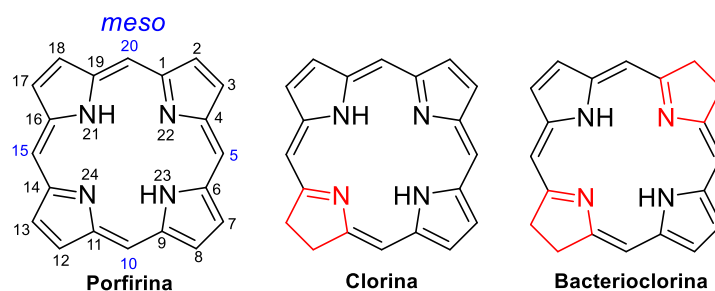


Figura 1.3 - Macrociclos tetrapirrólicos

Conforme se pode observar na figura anterior, a diferença entre cada macrociclo está nas ligações duplas exocíclicas. Quando comparada com a porfirina, a clorina apresenta menos uma ligação dupla, enquanto que a bacterioclorina tem menos duas ligações duplas em posições opostas.

Como seria expectável, o facto de haver um número diferente de ligações duplas nos macrociclos faz com que as suas propriedades físico-químicas e fotofísicas sejam bastante diferentes entre si. A nível de propriedades fotofísicas, os macrociclos tetrapirrólicos apresentam uma intensa banda

de absorção na região dos 400 nm, designada por banda Soret, tendo também bandas de absorção menos intensas próximas da região do vermelho (500-700 nm), designadas por bandas Q.^[3, 4]

No caso das porfirinas, estas geralmente apresentam quatro bandas Q, quando estão livres de metal, enquanto que as metaloporfirinas apresentam apenas duas bandas. Relativamente às clorinas, há uma banda Q de maior intensidade que surge na região de 650-690 nm, o que torna vantajoso para a sua aplicação em terapia fotodinâmica (PDT). Já as bacterioclorinas, apresentam uma banda de absorção mais intensa na região do vermelho do espectro do visível (700-750 nm) (Figura 1.4),^[3] sendo também considerados ótimos candidatos a fotossensibilizadores (PSs) em PDT.

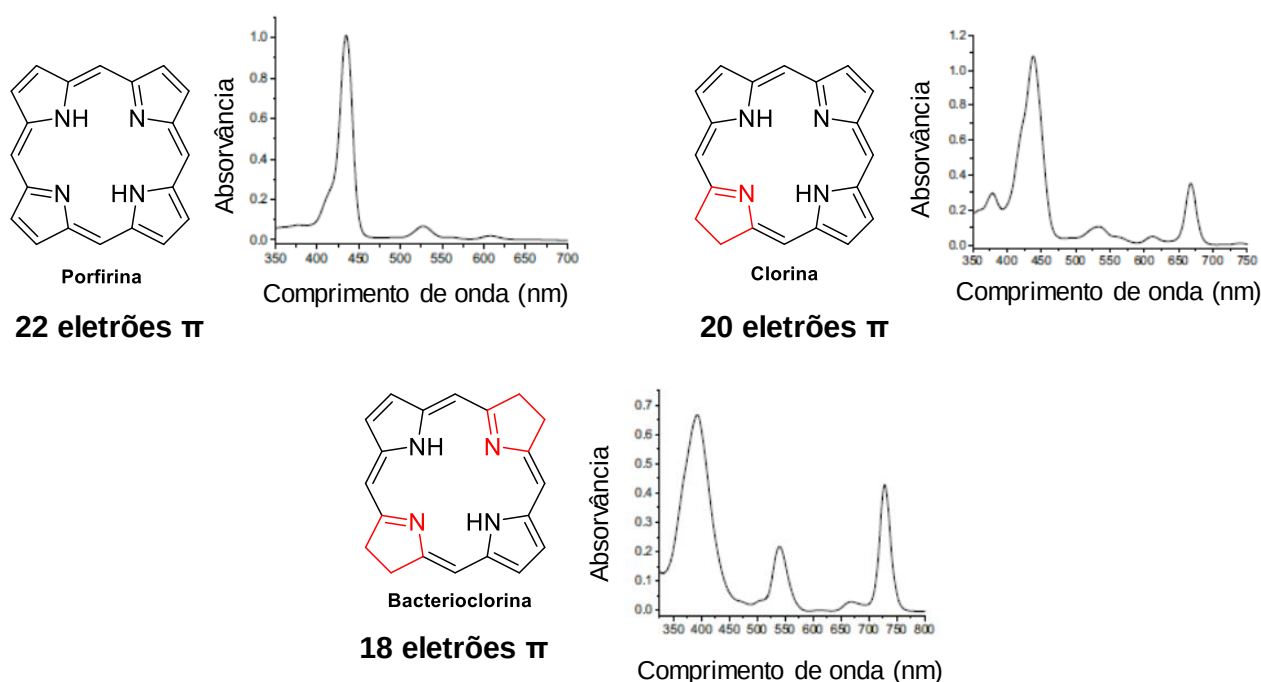
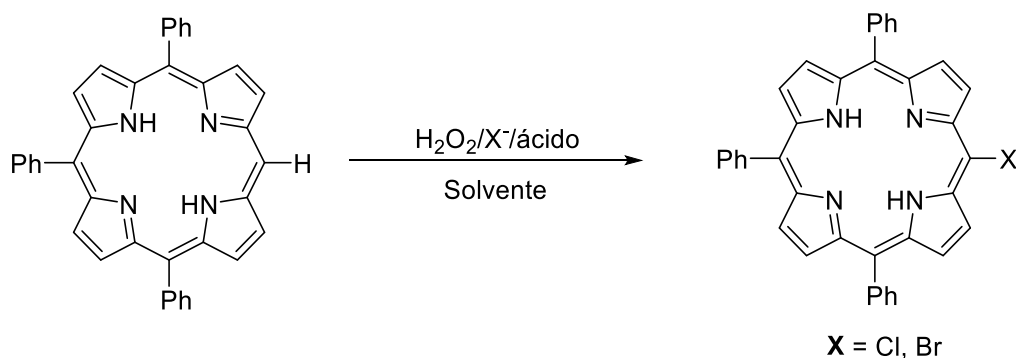


Figura 1.4 - Espectros de absorção de alguns macrociclos tetrapirrólicos (Adaptado da ref [2]).

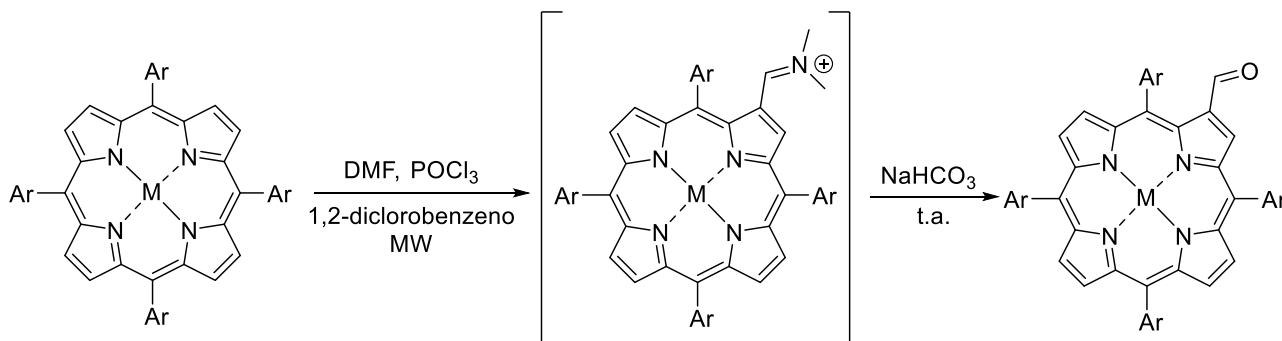
Quanto às propriedades físico-químicas, os macrociclos tetrapirrólicos, embora apresentem boas propriedades fotofísicas, têm baixa solubilidade em água. Este último fator é importante para a aplicação dos macrociclos porfirínicos em PDT.^[4] De forma a contornar o problema de fraca hidrossolubilidade, estes compostos podem ser incorporados em estruturas hidrofílicas, tais como lipossomas.^[3] Em alternativa, as porfirinas e seus derivados poderão ser acoplados a moléculas hidrossolúveis, tais como péptidos^[5-7] ou açúcares.^[8] Estas alterações, além de melhorarem as propriedades de solubilidade e farmacocinéticas, também melhoram a seletividade e especificidade dos macrociclos porfirínicos enquanto PSs.^[5]

Em termos de reatividade, tem que se ter em conta que as porfirinas são compostos aromáticos, e como tal participam em reações típicas de compostos aromáticos entre as quais, nitração, halogenação, formilação, sulfonação, entre outras ^[9] (Esquemas **1.1** e **1.2**).



Esquema 1.1 – Exemplo de reação de halogenação da 5,10,15-trifenilporfirina (Adaptado da ref [10]).

Relativamente à reação de halogenação apresentada no Esquema **1.1**, apresenta-se um exemplo de uma reação de halogenação oxidativa, na presença de peróxido de hidrogénio e em meio ácido. Verificando-se que, geralmente, estas reações ocorrem com rendimentos elevados. ^[10]



Esquema 1.2 - Reação de formilação de 5,10,15,20-tetraarilporfirinas (Adaptado da ref. [11]).

O exemplo apresentado no Esquema **1.2**, mostra, uma reação de formilação realizada em aquecimento por micro-ondas, tendo-se verificado que esta ocorre com sucesso quando o solvente utilizado é o 1,2-diclorobenzeno. ^[11]

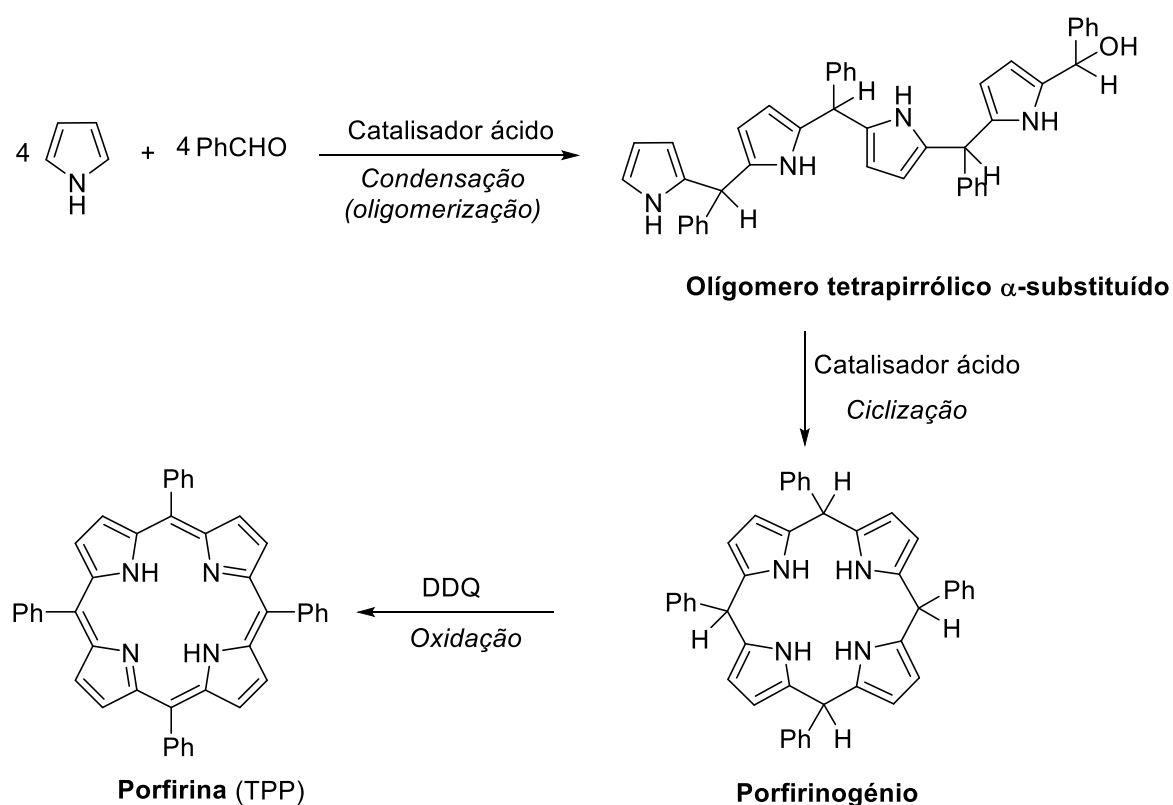
Os ligandos tetrapirrólicos apresentam elevada afinidade para coordenar iões de metal. No entanto apenas os complexos formados com metais diamagnéticos, isto é, iões de metal que não tenham eletrões desemparelhados, como é o caso do Zn²⁺, Pd²⁺, In³⁺ ou Sn²⁺, é que mantêm a sua capacidade fotossensibilizadora. Já os complexos formados por metais paramagnéticos, como o Mg²⁺, Fe³⁺ ou Cu²⁺, não apresentam a mesma capacidade. ^[3]

1.1.3. Métodos de síntese

1.1.3.1. Porfirinas

Em 1912, Küster foi o primeiro a sugerir que as porfirinas consistem num macrociclo tetrapirrólico. Ao mesmo tempo, Fischer e outros mostravam que o anel porfírico era demasiado grande para ser estável. Até que em 1929, Fischer e os seus colegas de investigação conseguiram descobrir a síntese total do grupo heme, o que comprovou a estrutura tetrapirrólica. Mais tarde, Fischer procurou dividir as diferentes rotas sintéticas das porfirinas, começando pelos compostos pirrólicos e dipirrólicos.^[9] Também é possível obter porfirinas com bons rendimentos a partir de dipirrometanos que apresentam estabilidade à oxidação.^[12]

Existem várias rotas de síntese de porfirinas, sendo que a escolha de uma delas depende das características de simetria do próprio macrociclo. Uma das formas de obter macrociclos porfíricos passa pela simples polimerização de pirroles. A 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) é um exemplo de obtenção de porfirina por esta via, sendo uma das porfirinas mais sintetizadas devido à sua fácil obtenção.^[13] Existem diferentes estratégias de síntese da TPP, tendo sido a primeira descrita por Rothmund, que envolve a reação entre pirrole e aldeídos.^[14, 15] Também Lindsey e Geier desenvolveram métodos de síntese de porfirinas *meso*-substituídas através da oligomerização pirrole e aldeídos (Esquema 1.3).^[16, 17] Estes dois últimos investigadores também avaliaram o efeito do uso de catalisadores ácidos nas estratégias de síntese por eles desenvolvidas.^[18]

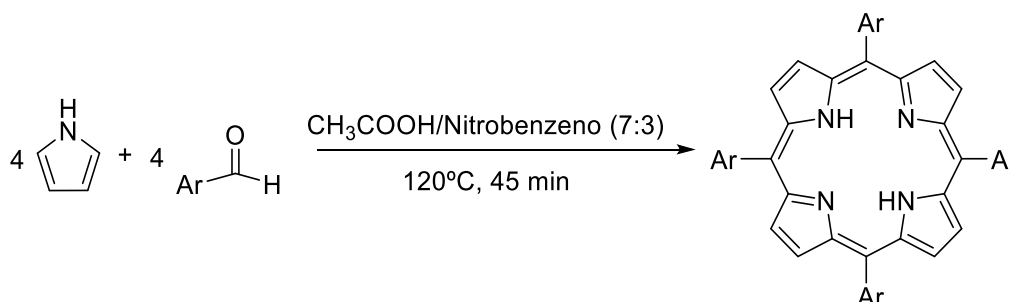


Esquema 1.3 - Passos importantes na reação pirrole e aldeído para a síntese de porfirinas (Adaptado da ref [18]).

Conforme se pode observar no Esquema 1.3, a estratégia de síntese desenvolvida por Lindsey consiste em dois passos: o primeiro consiste na condensação catalisada por ácido (TFA ou $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$), na qual se origina o oligómero e o porfirinogénio cíclico; o segundo passo envolve a oxidação com 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) do porfirinogénio à porfirimina. As reações apresentadas ocorrem à temperatura ambiente (t.a.).^[16]

Mais tarde, Lindsey e Geier, estudaram o efeito de vários catalisadores ácidos, em que o modelo de estudo seguido envolveu a reação pirrole e aldeído, conforme descrito anteriormente, em que o primeiro passo, a condensação, foi realizada com diferentes catalisadores ácidos. No segundo passo, a oxidação manteve-se nas mesmas condições descritas anteriormente. Neste estudo não foi possível a obtenção da TPP a partir de AlF_3 , CrF_3 , $\text{Dy}(\text{OTf})_3$, InCl_3 , ácido oxálico, ácido fosfotúngstico hidratado, $\text{SmCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ácido túngstico, ZnCl_2 e $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ como catalisadores, mesmo variando a concentração e tempos de reação. Em relação aos ácidos com os quais foi possível obter a TPP (ex.: $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$), procurou-se determinar qual seria a melhor concentração para obter melhores rendimentos de síntese.^[18]

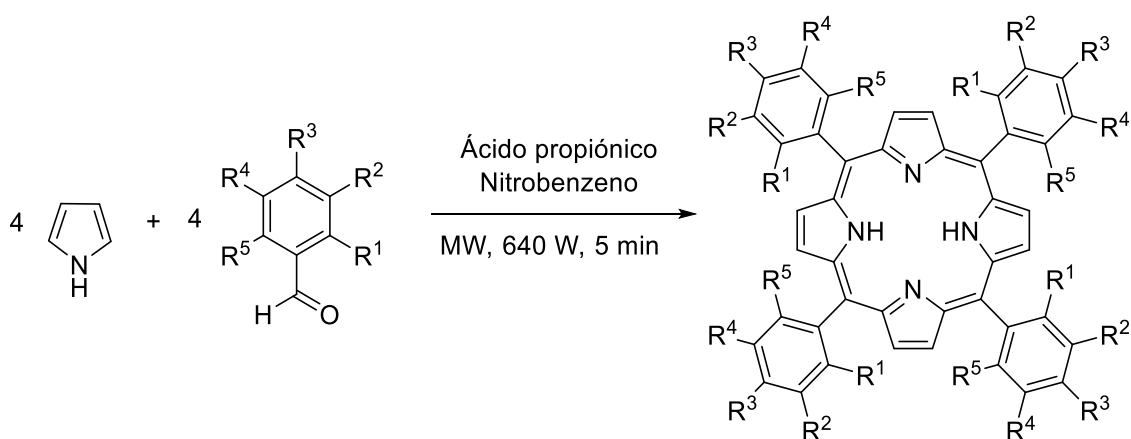
Também um grupo de investigadores portugueses, constituído por Gonsalves e seus colaboradores,^[19] estudou a síntese de porfirinas *meso*-substituídas (Esquema 1.4). O método aqui desenvolvido consiste no uso de uma mistura de ácido acético/nitrobenzeno, verificando-se que o uso dessa mistura se torna benéfico dado que a reação de condensação do pirrole com o aldeído, seguida por oxidação, se processa num só passo, obtendo-se a porfirimina desejada, após cristalização direta no meio reacional durante o arrefecimento ou por adição de metanol.^[19, 20] As condições reacionais utilizadas envolvendo o uso de nitrobenzeno em refluxo e oxigénio atmosférico demonstraram ser adequadas para promover a oxidação do porfirinogénio à respetiva porfirimina.^[20] Dado tratar-se de um método simples e eficiente, decidiu-se utilizar este método para sintetizar as porfirinas preparadas no decorrer deste trabalho.



Esquema 1.4 - Síntese de porfirinas *meso*-substituídas a partir do método de Gonsalves *et al* (Adaptado da ref [19]).

Recentemente, tem havido um grande interesse em desenvolver novas estratégias de síntese de porfirinas, que envolvam processos que tenham em conta os princípios de sustentabilidade química, em que, sempre que possível, permitam a substituição de solventes orgânicos nocivos por outros mais inócuos. Além disso, substituem-se as purificações cromatográficas por precipitações e opta-se por recorrer a energias alternativas como a radiação micro-ondas (MW) e ultrassónica.^[20]

Tendo em conta o disposto no parágrafo anterior, verifica-se que é possível obter macrociclos porfirínicos por aquecimento em MW, que torna possível a ocorrência das reações desejadas, recorrendo a quantidades baixas de solvente e a tempos de reação mais curtos.^[21] Além disso, trata-se de um método que apresenta melhorias em termos de seletividade e é, também, uma metodologia económica e ambientalmente viável.^[22] Neste contexto, Nascimento e colaboradores^[22] sintetizaram vários macrociclos porfirínicos *meso*-substituídos recorrendo ao aquecimento por MW (Esquema 1.5), em ácido propiónico e nitrobenzeno, à potência de 640 W, durante 5 minutos, com rendimentos de síntese entre 1,5% e 25%. Apesar do aumento de rendimento em MW não ser significativo em relação ao aquecimento convencional, verificou-se uma redução significativa no tempo de reação e simplificação no processo de tratamento da mistura reacional.^[22]



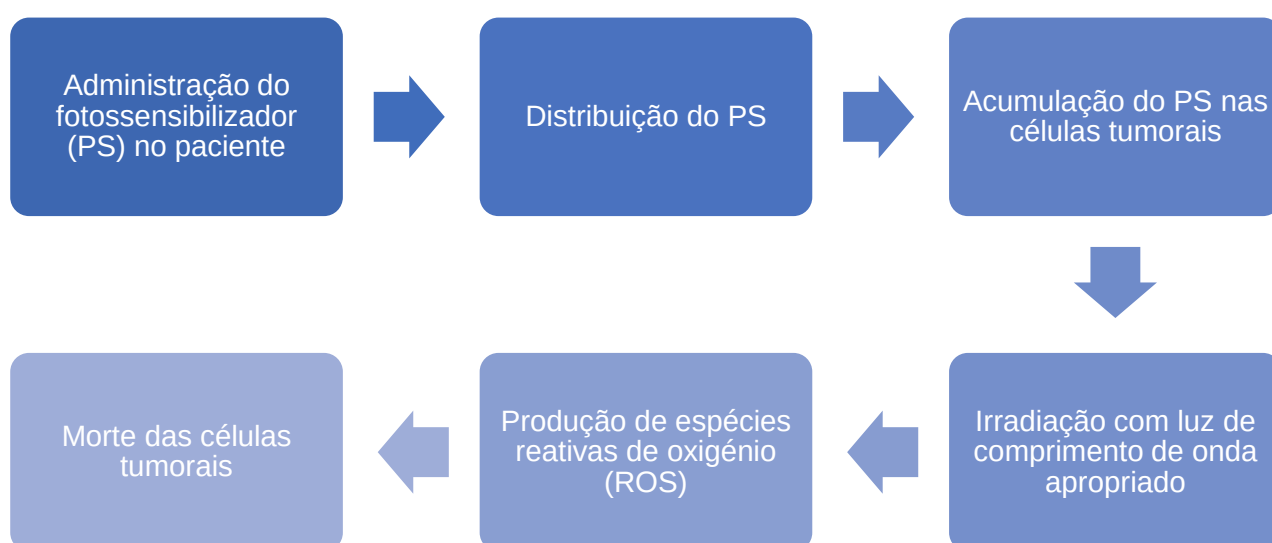
Esquema 1.5 - Síntese de *meso*-tetraarilporfirinas recorrendo ao aquecimento MW (Adaptado da ref [22]).

1.2. Terapia fotodinâmica – uma revisão

A PDT consiste numa modalidade terapêutica do cancro, sendo um procedimento o mínimo invasivo possível, no qual é administrado um fármaco não-tóxico designado por PS.^[23, 24] Este pode ser aplicado de formas diversas desde a aplicação tópica à intravenosa.^[24] Além do PS, a PDT envolve ainda a combinação de mais dois componentes: luz visível e oxigénio molecular.^[23, 25, 26] Nesta forma terapêutica, o PS é ativado (excitado) com radiação a um determinado comprimento de onda, de modo a gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) ou radicais livres que vão ser responsáveis pela destruição dos tecidos tumorais.^[27]

O processo de PDT consiste em duas fases, sendo a primeira a administração do PS. A segunda parte deste tratamento prende-se com a exposição à radiação. O facto da PDT ser realizada em duas fases permite reduzir os efeitos secundários, dado que o PS idealmente inofensivo é apenas ativado por irradiação direta do tecido tumoral.^[28] Além disso, o PS acumula-se preferencialmente no tumor permitindo atingir a concentração apropriada nas células alvo.^[29]

Após ativação do PS, este decai para estados de menor energia podendo interagir com o oxigénio molecular existente nas células, transformando-o em oxigénio no estado singuleto ($^1\text{O}_2$), que é um agente citotóxico, e que por interação com biomoléculas irá conduzir à destruição do tumor.^[26, 27] (Esquema 1.6).



Esquema 1.6 – Etapas gerais associadas ao processo de tratamento por PDT.

A eficiência da PDT mede-se pela interação entre a luz, o PS e o microambiente do tecido, sendo dependente de vários parâmetros tais como o intervalo de distribuição de radiação do PS, a dose total de radiação, a localização macroscópica e celular do PS, o estado de oxigenação do tumor, entre outros fatores. A destruição seletiva das células cancerígenas apenas é atingida quando a radiação e o PS existem em quantidades suficientes no local desejado.^[27]

A PDT, como terapia de cancro, é muito atrativa essencialmente devido à sua especificidade e seletividade. Além disso, esta forma terapêutica ainda apresenta outras vantagens, tais como o facto de se tratar de um tratamento não invasivo e com efeitos secundários residuais, comparativamente com tratamentos convencionais (ex: quimioterapia), ser mais cómodo para o paciente (menos doloroso), ser bastante seletiva para as células tumorais sem afetar os tecidos saudáveis, poder ser combinada com outros tratamentos (ex: pós-cirurgia), no caso de tumores resistentes à quimio- e

radioterapia pode ser usada como tratamento paliativo, entre outras vantagens. No entanto, esta forma terapêutica também apresenta algumas desvantagens, estando estas relacionadas fundamentalmente com a natureza do PS e a fonte de luz utilizada.^[25] Além disso, a aplicação da PDT ainda está muito limitada a lesões superficiais. Uma razão que explica esta limitação prende-se com o facto da PDT requerer oxigénio, mas existem determinados tumores que desenvolvem regiões de hipoxia grave, onde não é esperada a geração de ROS.^[30] O tratamento por radiação também apresenta efeitos secundários indesejados, tais como poder causar danos graves nas superfícies epiteliais, infertilidade, o inchaço de tecidos moles, entre outros efeitos.^[26]

1.3. Fotossensibilizadores porfirínicos

Conforme já referido em 1.1., um dos componentes mais importantes da PDT é o PS, sendo este o foco principal da presente dissertação. Este componente como elemento chave da PDT,^[26] deverá satisfazer alguns critérios, entre os quais apresentar baixos níveis de toxicidade (mesmo na ausência de luz ^[9]), reduzidos efeitos farmacológicos adversos em relação à sua administração e deverá absorver na região do vermelho no espectro do visível: a chamada janela fototerapêutica (Figura 1.5) (650-850 nm), região em que os danos causados nos tecidos são mínimos e a profundidade de penetração da radiação nos tecidos é máxima.^[3] Além disto, idealmente os PSS devem apresentar elevada pureza química, seletividade para as células tumorais, estabilidade química e física, curto intervalo de tempo entre a administração e acumulação nos tecidos do tumor e devem ter boa solubilidade em meio fisiológico.^[3, 9, 24]

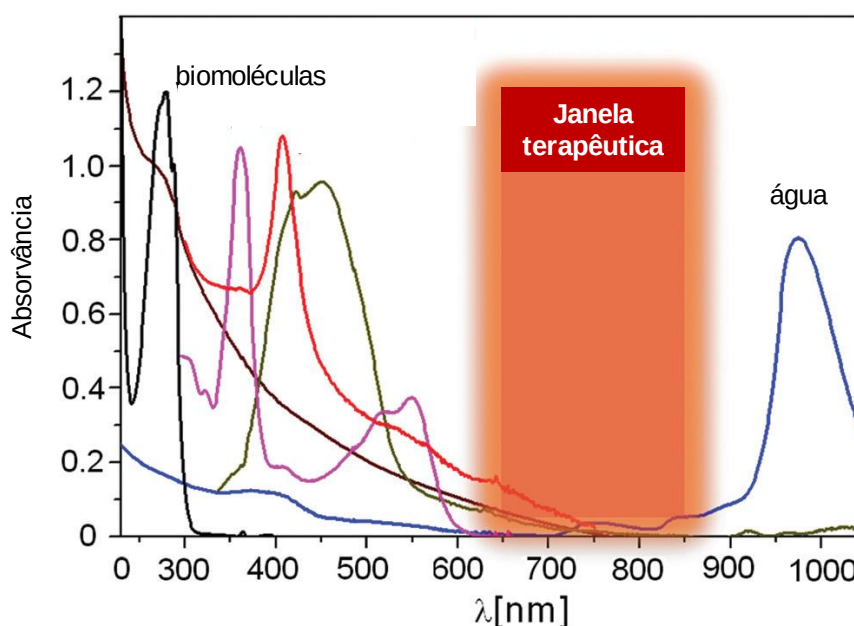


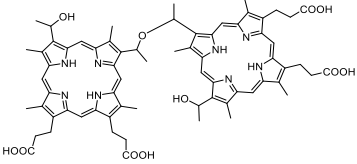
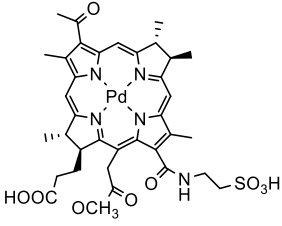
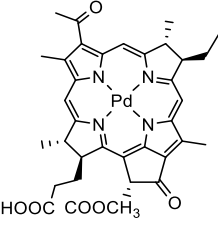
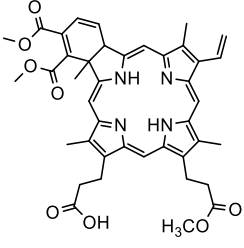
Figura 1.5 - Janela fototerapêutica (Adaptado da ref [23])

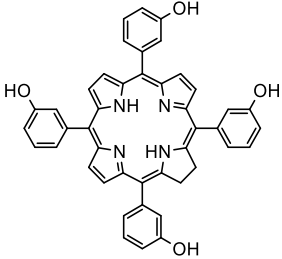
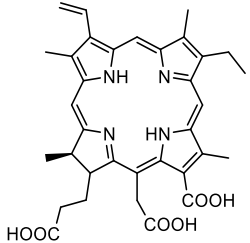
Também é desejável que a eliminação do PS do organismo seja rápida. Idealmente esta deverá demorar menos de um dia, no sentido de evitar um pós-tratamento de proteção à exposição à luz e uma prolongada fotossensibilidade da pele.^[3]

Geralmente os PSs porfirínicos apresentam baixa solubilidade em água, o que dificulta o seu uso e aplicação eficaz em contexto biológico.^[31] Neste sentido, começaram a ser desenvolvidas estratégias de síntese que possibilitem a obtenção de derivados porfirínicos hidrossolúveis e com propriedades farmacocinéticas melhoradas, como por exemplo, o desenvolvimento de porfirinas simétricas com substituintes piridilo e *p*-sulfonilfenilo nas posições *meso*.^[31]

Atualmente, já existem PSs porfirínicos disponíveis para uso em PDT, estando alguns no mercado e outros ainda em ensaios clínicos. Na Tabela 1.1, apresentam-se alguns exemplos desses PSs.

Tabela 1.1 - Exemplos de PSs porfirínicos utilizados em ensaios para PDT.

Entrada	Nome	Estrutura	Tipo de macrociclo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Estado clínico	Referência
1	Photofrin®		Porfirina	630	Aprovado	[3, 32]
2	WST11 (TOOKAD® soluble)		Bacterioclorina	753	Em ensaios	[33-35]
3	WST09		Bacterioclorina	762	Em ensaios	[35]
4	Verteporfin®		Clorina	690	Em ensaios	[26, 36]

5	Foscan®		Clorina	652	Aprovado	[32]
6	Radachlorin® (derivado da clorina e6 [3])		Clorina	662- 664	Em ensaios	[37]

Os PSs apresentados na Tabela 1.1 têm como alvo diferentes tipos de cancro, como é o caso do Verteporfin® (entrada 4), que foi testado no cancro do pâncreas, verificando-se que este PS é viável e seguro no tratamento desta doença oncológica.^[36] Já o Photofrin® (entrada 1) foi desenvolvido para o tratamento dos cancros oral, colorretal, ovários e mamário. Neste PS, o comprimento de onda de absorção varia conforme o tipo de cancro a tratar, sendo utilizado numa gama de 625 a 635 nm.^[32, 38] Relativamente ao Foscan® (entrada 5), verificou-se que pode ser utilizado no tratamento dos cancros cervical, gástrico, esófago e displasia.^[32] As bacterioclorinas WST11 e WST09 (entradas 2 e 3, respetivamente) são indicadas como PSs para o tratamento do cancro da próstata.^[32] Quanto ao WST11, foi realizado um estudo em 2014, em que se concluiu que a dose ótima a administrar é de 4 mg kg⁻¹, sendo este ativado com luz de comprimento de onda de 753 nm, 200 J cm⁻² de intensidade de luz aplicada e com um índice de densidade de luz (LDI) superior a 1. Nestas condições, observou-se que o tratamento apresentava uma eficiência de 95%.^[33] O Radachlorin® (entrada 6), que na Europa é conhecido por Bremachlorin, tem sido utilizado no tratamento do cancro da pele. Este fármaco, em comparação com a protoporfirina-IX, apresenta melhores propriedades farmacêuticas, farmacológicas, espectrais e toxicológicas.^[37]

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de PSs porfirínicos deu já origem a três gerações de PSs. Os PSs da primeira geração, nos quais se incluem os derivados da hematoporfirina (HpD) e o Photofrin®, foram aplicados nos primeiros ensaios de PDT. Este grupo de PSs mostrou grande eficiência no tratamento de carcinomas no cérebro, laringe, pulmão, pele, gástrico e no esófago até um certo grau da doença. No entanto, no caso de tumores cerebrais foi necessário combinar a PDT, na qual se utiliza a HpD, com a cirurgia para remover os tecidos afetados. Em relação ao Photofrin®, verificou-se que este apresentava algumas limitações, desde a sua estrutura complexa, à sua fraca absorção de luz no visível. Em jovens pacientes com cancro colorretal em estado mais avançado, os tratamentos de PDT mediados por Photofrin® levaram a melhorias nos sintomas e à redução

nas complicações. No entanto, essencialmente devido à fraca penetração de luz nos tecidos, apenas uma pequena parte desta atingiu as células tumorais, sendo a restante absorvida pela superfície da pele, o que resulta no aumento da toxicidade cutânea fotossensível.^[38]

Em virtude das desvantagens acima referidas, surgiu a segunda geração de PSs. Estes, comparativamente com os da primeira geração, não apresentam misturas de compostos e, por outro lado apresentam maior seletividade e fotossensibilidade, ao mesmo tempo que apresentam espectros de absorção melhorados. Muitos dos PSs desta geração baseiam-se em derivados de benzoporfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas e na protoporfirina-IX. Também aqui se encontra um PS não porfirínico, o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Figura 1.6), que é usado como precursor biológico da protoporfirina-IX. No caso do tratamento da leucoplasia oral, na fase I de ensaios da PDT mediada pelo ALA foi possível observar os benefícios desta terapia bem como a dose segura que deveria ser administrada com uma baixa dose de luz de 4 J cm^{-2} .^[37]

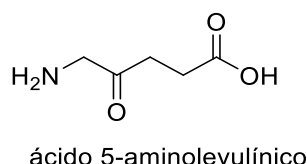


Figura 1.6 - Estrutura do ácido 5-aminolevulínico.

A dada altura, vários investigadores chegaram à conclusão de que um PS único não causava os efeitos desejados, o que levou a que fossem propostas combinações de dois ou mais PSs, podendo estes apresentarem maior eficácia na PDT.^[37] Além disso, tanto os PSs da primeira geração como os da segunda apresentam como principal limitação a fraca capacidade de penetração através das membranas biológicas, como é o caso da pele ou da barreira hemato-encefálica, o que mais uma vez pode ser estrategicamente melhorado pela combinação de dois ou mais PSs ou de um PS combinado com um agente transportador.^[1]

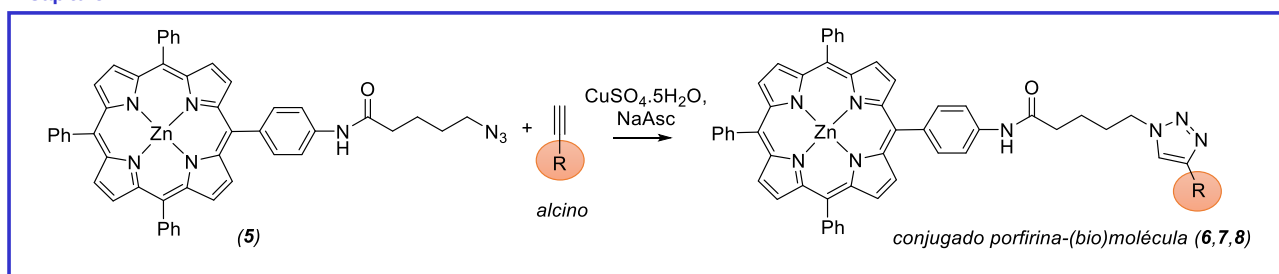
Atendendo a estes fatores, surgiu então, a terceira geração de PSs. Estes foram desenvolvidos através de modificações químicas de forma aumentar a seletividade dos PSs e, simultaneamente, evitar a fototoxicidade para os tecidos normais. Um exemplo de um PS de terceira geração envolveu a incorporação da clorina e6 (Ce6) em nanopartículas (por exemplo em nanopartículas de ouro), com o objetivo de melhorar a absorção por parte do tumor assim como aumentar os níveis de formação de ROS.^[38] Em suma, o desenvolvimento desta geração tem por objetivo aumentar a afinidade do PS às células tumorais, passando por estratégias que permitam aumentar a seletividade destes em relação ao alvo.^[1] De modo a alcançar este objetivo, os PSs podem ainda ser acoplados a outras biomoléculas, tais como péptidos, o que melhora a sua hidrossolubilidade. Neste sentido, também poderão ser acoplados a lipossomas. Geralmente os conjugados PS-

lipossomas apresentam elevada citotoxicidade para células cancerígenas (ex.: células HeLa), ao passo que esta é bastante reduzida para células não-tumorais (ex.: células HaCaT).^[1]

1.4. Objetivo e metodologia geral do trabalho

O principal objetivo da presente dissertação é sintetizar novos (bio)conjugados porfirínicos, incluindo conjugados péptido-porfirina, com potencial aplicação no tratamento e fotodiagnóstico do cancro. A rota de síntese aqui estabelecida pressupõe o recurso à reação de cicloadição catalisada por cobre(I) (Cu(I)AAC), como exemplo de uma reação de “click chemistry”, envolvendo a porfirina **5** contendo o substituinte azida e um alcino, com formação do anel 1,2,3-triazole (Esquema 1.7). Estas reações encontram-se descritas no **Capítulo 2** desta dissertação.

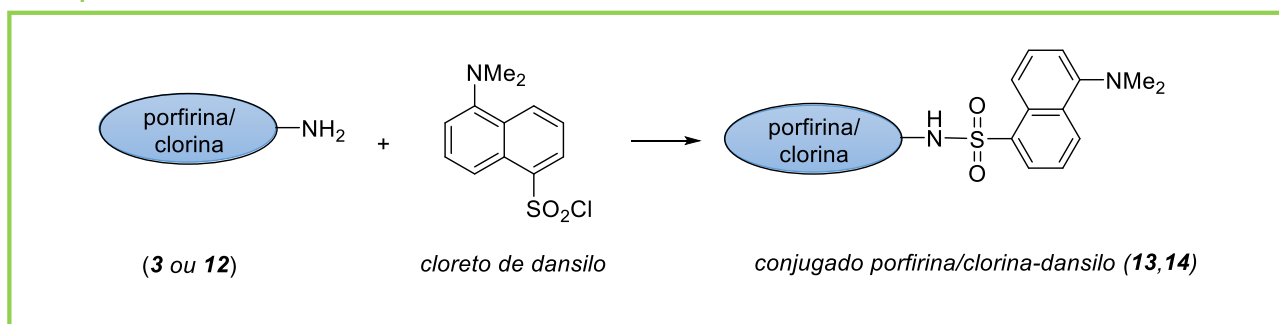
Capítulo 2



Esquema 1.7 - Reação de cicloadição catalisada por cobre(I) (Cu(I)AAC) envolvendo a porfirina **5** contendo o substituinte azida e um alcino.

Além disso, também se apontou como objetivo a síntese de novos conjugados recorrendo à reação entre os macrociclos porfirínicos contendo o grupo amina (**3** ou **12**) e o fluoróforo cloreto de dansilo *via* formação de sulfonamidas (Esquema 1.8). Tais reações encontram-se descritas no **Capítulo 3** e visam a obtenção de novos potenciais PSs com propriedades fotofísicas, farmacocinéticas, especificidade e solubilidade melhoradas.

Capítulo 3



Esquema 1.8 - Reação entre os macrociclos porfirínicos (**3** ou **12**) contendo o grupo amina e o fluoróforo cloreto de dansilo.

Nas sínteses dos compostos atrás referidos, sempre que possível, optou-se pelo uso de catalisadores, de forma a aumentar a seletividade das reações, e pela síntese assistida por micro-ondas, com o objetivo de aumentar o rendimento e reduzir o tempo das reações.^[20-22, 39-42] Os produtos obtidos foram purificados com recurso a técnicas cromatográficas, em coluna ou placa.

Relativamente ao péptido PepNeg (**Capítulo 2**), este foi preparado por síntese peptídica em fase sólida (SPPS)^[43], que consiste em ciclos alternados de acoplamento/desproteção de aminoácidos. O péptido foi sintetizado em colaboração com a Professora Paula Gomes e a Doutora Cátia Teixeira, do Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV/REQUIMTE), situado no Departamento de Química e Bioquímica da FCUP.

Os produtos obtidos foram caracterizados, a nível estrutural por espetrometria de massa (ESI-MS) e por espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC e HSQC). Estas análises foram obtidas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). As propriedades de absorção e emissão foram obtidas por análise espetroscópica de UV/Vis e fluorescência, respetivamente.

1.5. Referências

1. Gomes, A.T.P.C.; Neves, M.G.P.M.S. e Cavaleiro, J.A.S., *Cancer, Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2018. **90**(1 Suppl 2): p. 993-1026.
2. de Oliveira, K.T., *et al.*, *Chlorins: Natural sources, synthetic developments and main applications*. Current Organic Synthesis, 2014. **11**: p. 42-58.
3. Martinez De Pinillos Bayona, A., *et al.*, *Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers*. Chemical Biology Drug Design, 2017. **89**(2): p. 192-206.
4. Sandland, J.; Malatesti, N. e Boyle, R., *Porphyrins and related macrocycles: Combining photosensitization with radio- or optical-imaging for next generation theranostic agents*. Photodiagnosis Photodynamic Therapy, 2018. **23**: p. 281-294.
5. Dondi, R., *et al.*, *Flexible synthesis of cationic peptide-porphyrin derivatives for light-triggered drug delivery and photodynamic therapy*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2016. **14**(48): p. 11488-11501.
6. Biscaglia, F. e Gobbo, M., *Porphyrin-peptide conjugates in biomedical applications*. Peptide Science, 2018. **110**(5): p. 24-38.
7. Neves-Coelho, S.; *et al.*, *A new noncanonical anionic peptide that translocates a cellular blood-brain barrier model*. Molecules, 2017. **22**(10): p. 1753-1764.
8. Silva, A.M.G.; *et al.*, *Porphyrins in 1,3-dipolar cycloaddition reactions with sugar nitrones. Synthesis of glycoconjugated isoxazolidine-fused chlorins and bacteriochlorins*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**: p. 603-605.
9. Milgrom, L.R., *The colours of life: An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds*. 1997, Oxford, UK: Oxford University Press.
10. Tian, M.; *et al.*, *Selective Halogenation of C–H Bonds on Porphyrin Rings Using NaX/H₂O₂*. Chemistry Letters, 2015. **44**(10): p. 1383-1385.
11. Moura, N.M.M.; *et al.*, *Vilsmeier-Haack formylation of Cu(II) and Ni(II) porphyrin complexes under microwaves irradiation*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2011. **15**(7-8): p. 652-658.
12. Sobral, A.I.J.F.N.; *et al.*, *One-step synthesis of dipyrromethanes in water*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**(20): p. 3971-3973.
13. Vicente, M.G.H. e Smith, K.M., *Synthesis and functionalizations of porphyrin macrocycles*. Current Organic Synthesis, 2014. **11**(1): p. 3-28.
14. Rothmund, P., *Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes*. Journal of American Chemical Society, 1935. **57**: p. 2010-2011.

15. Rothemund, P. e Menotti, A.R., *The synthesis of a,b,g,d-tetraphenylporphine*. Journal of American Chemical Society, 1941. **63**: p. 267-270.
16. Geier III, G.R. e Lindsey, J.S., *Investigation of porphyrin-forming reactions. Part 1. Pyrrole + aldehyde oligomerization in two-step, one-flask syntheses of meso-substituted porphyrins†*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001(5): p. 677-686.
17. Geier III, G.R. e Lindsey, J.S., *Investigation of porphyrin-forming reactions. Part 2. Examination of the reaction course in two-step, one-flask synthesis of meso-substituted porphyrins*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001: p. 687-700.
18. Geier III, G.R. e Lindsey, J.S., *Effects of diverse acid catalysts on the reaction course in the two-step one-flask synthesis of meso-tetraphenylporphyrin*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2002. **6**: p. 159-185.
19. Gonsalves, A.M.d.A.R.; Varejão, J.M.T.B. e Pereira, M.M., *Some of new aspects related to the synthesis of meso-substituted porphyrins*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 1991. **28**: p. 635-640.
20. Pinto, S.M.A.; et al., *Synthesis of meso-substituted porphyrins using sustainable chemical processes*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2016. **20**(1-4): p. 1-16.
21. Chauhan, S.M.S.; Sahoo, B.B. e Srinivas, K.A., *Microwave-assisted synthesis of 5,10,15,20-tetraaryl porphyrins*. Synthetic Communications, 2001. **31**(1): p. 33-37.
22. Nascimento, B.F.O.; et al., *Microwave-assisted synthesis of porphyrins and metalloporphyrins: a rapid and efficient synthetic method*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2007. **11**(2): p. 77-84.
23. Dabrowski, J.M. e Arnaut, L.G., *Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment*. Photochemical and Photobiological Science, 2015. **14**(10): p. 1765-1780.
24. Robertson, C.A.; Evans, D.H. e Abrahamse, H., *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT*. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2009. **96**(1): p. 1-8.
25. Oniszczuk, A.; et al., *The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2016. **83**: p. 912-929.
26. Ethirajan, M.; et al., *The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(1): p. 340-362.
27. Mallidi, S.; et al., *Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy*. Theranostics, 2016. **6**(13): p. 2458-2487.
28. van Straten, D.; et al., *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions*. Cancers (Basel), 2017. **9**(2): p. 1-54.
29. Agostinis, P.; et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(4): p. 250-281.

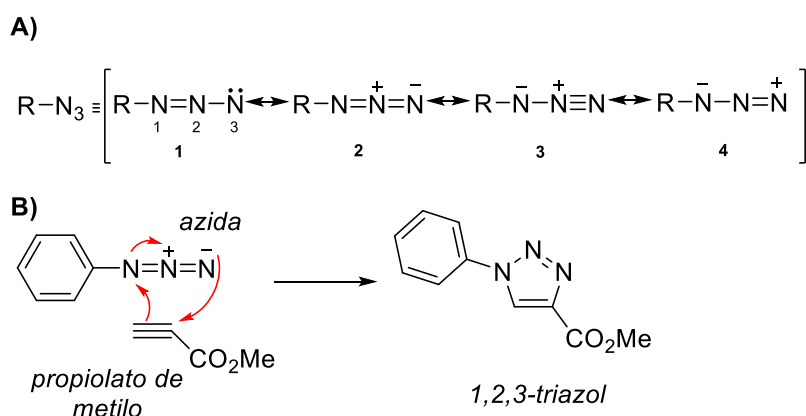
30. Turan, I.S.; et al., *A Bifunctional Photosensitizer for Enhanced Fractional Photodynamic Therapy: Singlet Oxygen Generation in the Presence and Absence of Light*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2016. **55**(8): p. 2875-2878.
31. Luciano, M. e Bruckner, C., *Modifications of Porphyrins and Hydroporphyrins for Their Solubilization in Aqueous Media*. *Molecules*, 2017. **22**(6): p. 980-1027.
32. Conte, C.; et al., *Photodynamic Therapy for Cancer: Principles, Clinical Applications, and Nanotechnological Approaches*, in *Nano-Oncologicals*, M.J. Alonso and M. Garcia-Fuentes, Editors. 2014, Springer International Publishing, Cham. p. 123-160.
33. Moore, C.M.; et al., *Determination of optimal drug dose and light dose index to achieve minimally invasive focal ablation of localised prostate cancer using WST11-vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy*. *BJU International*, 2015. **116**(6): p. 888-896.
34. Azzouzi, A.R.; et al., *Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure*. *World Journal of Urology*, 2015. **33**(7): p. 937-944.
35. Lepor, H., *Vascular targeted photodynamic therapy for localized prostate cancer*. *Reviews in Urology*, 2008. **10**(4): p. 254-261.
36. Huggett, M.T.; et al., *Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer*. *British Journal of Cancer*, 2014. **110**(7): p. 1698-1704.
37. Kochneva, E.V.; et al., *Photosensitizer Radachlorin(R): Skin cancer PDT phase II clinical trials*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2010. **7**(4): p. 258-267.
38. Kou, J.; Dou, D. e Yang, L., *Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications*. *Oncotarget*, 2017. **8**(46): p. 81591-81603.
39. Hayes, B.L., *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. 2002, USA: CEM Publishing.
40. Loupy, A., *Microwaves in Organic Synthesis*. 2002, Alemanha: Wiley-VCH.
41. Caddick, S., *Microwave assisted organic reactions*. *Tetrahedron*, 1995. **51**(38): p. 10403-10432.
42. Nascimento, B.F.O.; Gonsalves, A.M.d.A.R. e Pineiro, M., *MnO₂ instead of quinones as selective oxidant of tetrapyrrolic macrocycles*. *Inorganic Chemistry Communications*, 2010. **13**(3): p. 395-398.
43. Montalbetti, C.A.G.N. e Falque, V., *Amide bond formation and peptide coupling*. *Tetrahedron*, 2005. **61**(46): p. 10827-10852.

**Capítulo 2 - Síntese de (bio)conjugados
porfirínicos *via* reação de cicloadição catalisada
por cobre(I)**

2.1. Motivação e objetivos

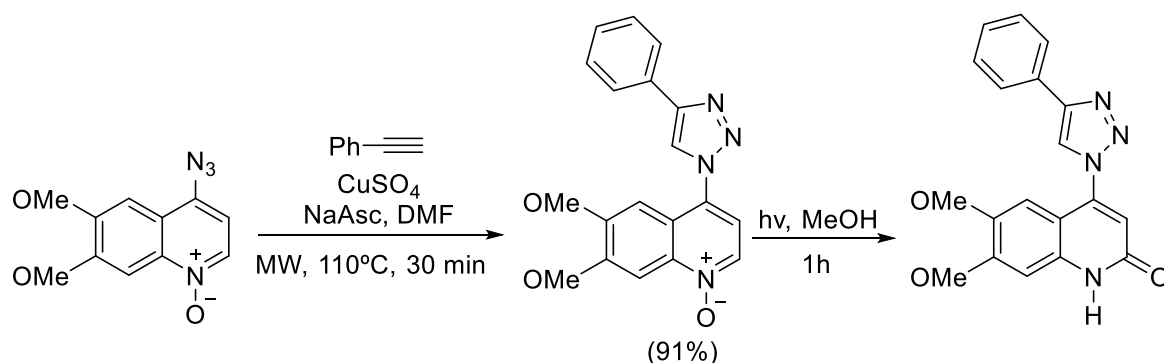
No sentido de obter candidatos a PSs com propriedades fotofísicas e farmacocinéticas melhoradas, bem como aperfeiçoar a sua seletividade e eficácia no tratamento em PDT,^[1, 2] o objetivo neste capítulo é sintetizar novos (bio)conjugados porfirínicos, através de reações de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre(I) (Cu(I)AAC), como exemplo de uma reação de “click chemistry”. Tal reação ocorre entre uma espécie 1,3-dipolar e um dipolarófilo, para dar origem a um anel heterocíclico de 5 lados, apresentando geralmente elevada seletividade, o que permite obter o produto desejado com bom rendimento de síntese. Além disso, trata-se de um tipo de reação que apresenta tempos de reação mais curtos e geralmente é de fácil purificação e execução.^[3-7]

Aqui, deu-se especial atenção à reação de cicloadição entre a porfirina de zinco(II) substituída com o grupo azida e diferentes alcinos. A azida como espécie 1,3-dipolar apresenta quatro híbridos de ressonância (Esquema 2.1A).^[8] A reação de cicloadição processa-se de forma concertada para dar origem ao anel 1,2,3-triazol (Esquema 2.1B), o que possibilita a conjugação de macrociclos porfirínicos a uma grande variedade de moléculas, incluindo péptidos.^[9]



Esquema 2.1 – Reação de cicloadição 1,3-dipolar: A) Híbridos de ressonância do grupo azida e B) Mecanismo concertado proposto

Relativamente às reações de Cu(I)AAC, existem várias descritas na literatura, envolvendo métodos não clássicos, como é o caso do uso do aquecimento com radiação de MW, que apresentou bons rendimentos de síntese (na ordem dos 70-80%) (Esquema 2.2).^[10]



Esquema 2.2 - Síntese de quinolonas substituídas com o anel triazole por Cu(I)AAC com aquecimento por radiação de micro-ondas (MW).

No presente trabalho apostou-se na obtenção de um conjugado porfirina-péptido, tendo em consideração que este conjugado deverá apresentar melhores propriedades de solubilidade e seletividade, de forma a poder ser utilizado como PS em PDT do cancro.^[11] Além disso, os péptidos poderão também funcionar como veículos transportadores de PSs até às células alvo, apresentando melhor capacidade de penetração dos tecidos e de transpor/atravesar a barreira hematoencefálica. Estas moléculas podem ser obtidas a partir de fontes naturais ou por síntese química,^[2] como por exemplo, por síntese peptídica em fase sólida.

Atualmente, já existem diversos conjugados porfirina-péptido,^[12] sendo possível observar alguns exemplos na Tabela 2.1. Os péptidos envolvidos apresentam em comum o aminoácido lisina e elevado teor de componentes catiónicos.

Tabela 2.1 - Exemplos de conjugados porfirina-péptido existentes ^[12]

Entrada	Conjugado	Sequência
1	TPP-apidaecin	TPP-GNNRPVYIPQPRPPHRL
2	TPP-Gbuforin	TPP-GTRSSRAGLQFPVGRVHLLRK
3	TPP-Lmagainin	TPP-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEILNS
4	TPP-(L)Ala/Aib	TPP-AUAUAUAUAUAUAUAUA
5	TPP-(D)-Ala/Aib	TPP-aUaUaUaUaUaUaUaUa
6	TPP-[Ala ⁵]Lmagainin	TPP-GIGKALHSAKKFGKAFVGEILNS
7	TPP-[1-12]Lmagainin	TPP-GIGKFLHSAKKF
8	TPP-Ahx-Lmagainin	TPP-NH(CH ₂) ₅ CO-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEILNS
9	TPP-[Ala ¹]Lmagainin	TPP-AIGKFLHSAKKFGKAFVGEILNS
10	TPP-(D)Ala-Lmagainin	TPP-aGIGKFLHSAKKFGKAFVGEILNS

2.2. Síntese do precursor porfirínico contendo o grupo azida

Para que as reações de Cu(I)AAC pudessem ocorrer com sucesso, foi necessário sintetizar o complexo de zinco(II) da porfirina substituída com o grupo azida (porfirina **5**), segundo a rota de síntese descrita no Esquema 2.3. A síntese da porfirina **5** teve por base a 5,10,15,20-

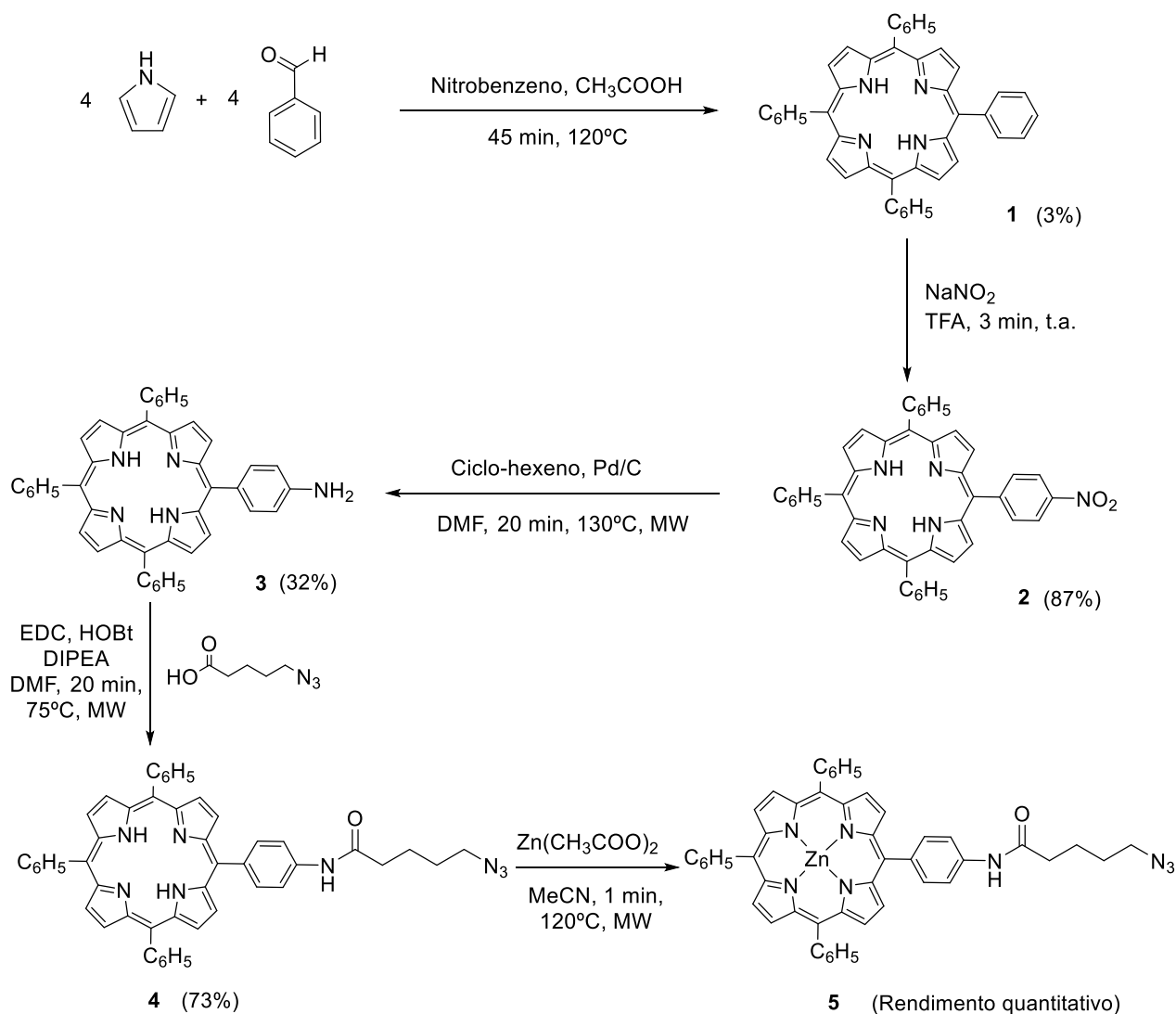
tetrafenilporfirina **1**, a qual foi nitrada usando as condições experimentais conducentes à mononitração. Assim foi realizada a nitração de **1** com nitrito de sódio, em ácido trifluoroacético (TFA). No processo de nitração, o nitrito de sódio foi utilizado em excesso em relação à porfirina **1** (1,8 equivalentes). A reação ocorreu à temperatura ambiente, durante três minutos. Na síntese da porfirina mononitrada, também se observou a formação de uma pequena quantidade de porfirina di-nitrada, que foi separada por cromatografia em coluna. Posteriormente a redução do grupo nitro a amina foi realizada recorrendo a diferentes protocolos:

- (i) Redução pelo método convencional, envolvendo o uso de cloreto de estanho: a reação ocorreu a partir de uma mistura de porfirina **2** e cloreto de estanho (6,8 equivalentes) em ácido clorídrico (HCl), em refluxo durante uma hora. Após arrefecimento da mistura reacional em gelo, esta foi neutralizada com amoníaco (NH₃), obtendo-se uma solução de cor acastanhada. Foram feitas sucessivas extrações líquido-líquido com clorofórmio. Posteriormente, a fase orgânica foi purificada por cromatografia em coluna. A porfirina **3** foi obtida por cristalização em metanol, sendo posteriormente filtrada a vácuo por funil de prego.
- (ii) Redução segundo o método de hidrogenação com recurso ao aquecimento por micro-ondas: preparou-se uma mistura de porfirina **2** e uma quantidade catalítica de paládio (Pd/C 10%) (adicionado sob atmosfera de azoto) em *N,N*-dimetilformamida (DMF) anidra. A esta mistura foi adicionado ciclo-hexeno (20 equivalentes). A reação ocorreu em aquecimento MW, à temperatura de 130°C, durante 20 minutos, com uma potência de 80 W, em vaso fechado de 30 mL. A mistura reacional foi, primeiramente, filtrada por filtro de algodão. Em seguida, foram realizadas sucessivas extrações líquido-líquido com acetato de etilo e uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura no evaporador rotativo. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, com aumento de polaridade do eluente começando-se por utilizar clorofórmio, passando para clorofórmio/acetona (98:2), em que a proporção clorofórmio/acetona foi aumentando de 95:5 até 90:10. Sendo assim, foi possível isolar a porfirina **3** com um rendimento de 32%.

O protocolo seguido em (ii) revelou ser o mais vantajoso,^[13] já que se trata de um método com menor tempo de reação, de tratamento mais fácil e mais seguro, tendo em consideração que não se recorreu ao uso de cloreto de estanho, que é perigoso em termos de saúde e ambientais. De modo a poder comprovar-se o sucesso da síntese da porfirina **3**, esta foi caracterizada por espectroscopia de RMN de ¹H. Além dos sinais correspondentes aos prótons aromáticos dos anéis β-pirrólicos e fenilo, o espectro revelou a presença de um singuleto a 4,04 ppm, correspondente a dois prótons, o que indica a presença do grupo amina.

No caso da obtenção da porfirina **4**, esta foi obtida por aquecimento MW, a partir da reação de porfirina **3** com o ácido 5-azidopentanóico (2,0 equivalentes), na presença de hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (2,1 equivalentes), como agente de acoplamento, e de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (2,0 equivalentes), como nucleófilo auxiliar, usando *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (5,9 equivalentes) como base. A reação ocorreu em DMF anidra no mínimo volume necessário, em aquecimento por MW, à temperatura de 75°C, durante 20 minutos, com uma potência de 100 W, em vaso fechado de 10 mL. A mistura reacional foi vertida em gelo e filtrada por filtro de algodão. O precipitado foi redissolvido em clorofórmio e seco com etanol a 99,8%, sendo o solvente evaporado no evaporador rotativo. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: clorofórmio/acetato de etilo (98:2) a (8:2)), tendo sido possível isolar a porfirina **4** com um rendimento de 73%.

A porfirina **5** resulta da metalação da porfirina **4** com zinco(II). Aqui, preparou-se uma mistura de porfirina **4** e acetato de zinco(II) (10 equivalentes), em acetonitrilo. A reação ocorreu por aquecimento por MW, à temperatura de 120°C, durante 1 minuto, com uma potência de 100 W, em vaso fechado de 30 mL. A mistura foi sujeita a sucessivas extrações líquido-líquido com água e acetato de etilo. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura no evaporador rotativo, obtendo-se a porfirina **5** com um rendimento quantitativo.



Esquema 2.3 - Síntese do complexo de Zn(II) da porfirina substituída com o grupo azida (**5**).

2.3. Caracterização estrutural dos precursores porfirínicos

Os macrociclos porfirínicos sintetizados foram caracterizados por diversas técnicas espectroscópicas incluindo RMN de ^1H e ^{13}C , UV/Vis e fluorescência, e ESI-MS.

2.3.1. Caracterização por RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H das porfirinas **3**, **4** e **5** revelaram ser muito semelhantes entre si, surgindo um conjunto de sinais aromáticos entre 8,97-7,74 ppm correspondentes à ressonância dos prótons β -pirrólicos e dos prótons dos anéis fenilo das posições *meso*. Já a zona alifática dos espectros mostrou diferenças significativas, principalmente no caso da porfirina **4** resultante do acoplamento entre a porfirina **3** e o ácido 5-azidopentanóico, com aparecimento de quatro sinais alifáticos correspondentes à ressonância dos prótons da cadeia alquílica. O espectro de RMN de ^1H da

porfirina **4** mostrou que a região aromática não sofre alterações significativas (Figura 2.1a), enquanto que na região alifática (Figura 2.1b) foi possível observar quatro sinais, o que é demonstrativo do acoplamento do ácido 5-azidopentanóico ao grupo amina da porfirina **3**, surgindo dois tripletos a 3,44 e 2,59 ppm correspondentes aos prótons $-\text{COCH}_2-$ e $-\text{CH}_2\text{N}_3$, respectivamente, e dois quintetos a 1,98 e 1,83 ppm, correspondentes aos prótons do grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Também se observou a -2,77 ppm, um singuleto correspondente aos prótons NH do centro do anel porfirínico. Portanto, comprova-se a presença da porfirina **4**.

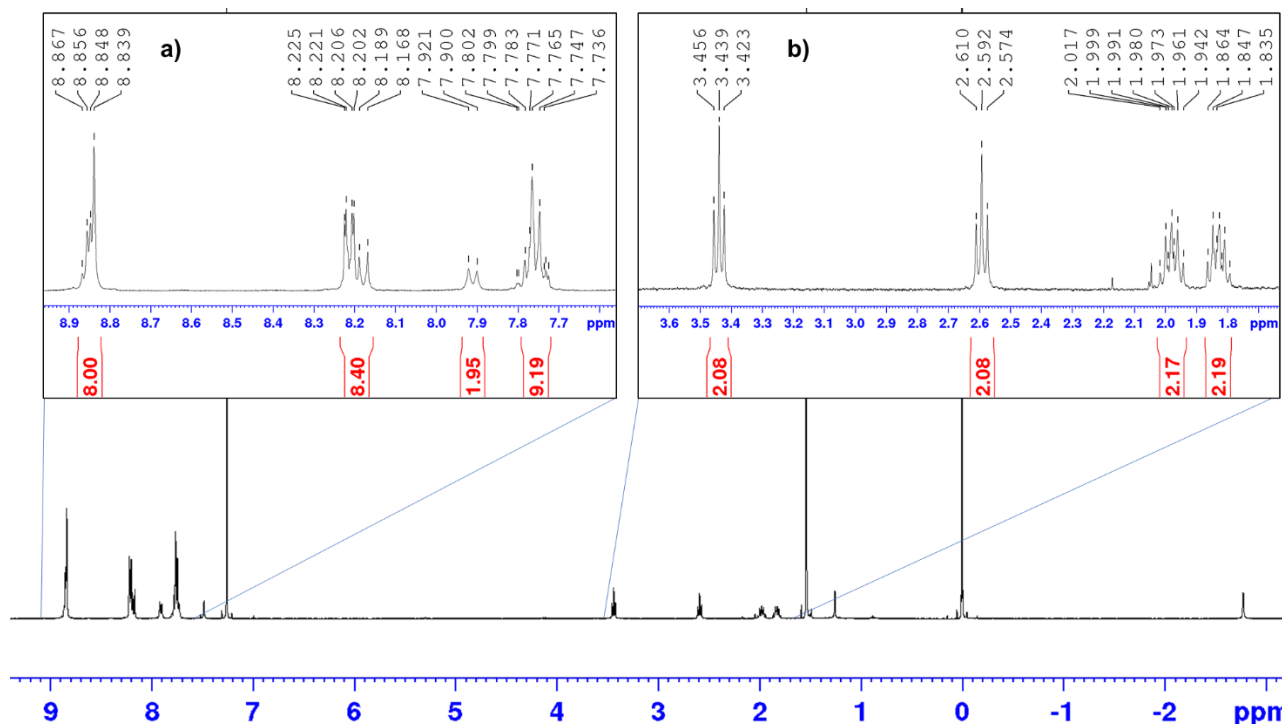


Figura 2.1 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da porfirina **4**, com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b).

A análise de RMN de ^1H da porfirina **5** (Figura 2.2) revelou que a coordenação do íon de metal Zn^{2+} à porfirina **4** ocorreu com sucesso, tendo em conta que o espectro mostrou a ausência do sinal correspondente à ressonância dos prótons NH do centro do anel porfirínico (que tipicamente surgem a valores negativos de desvio químico). Os restantes sinais mantiveram-se inalterados, tal como era esperado.

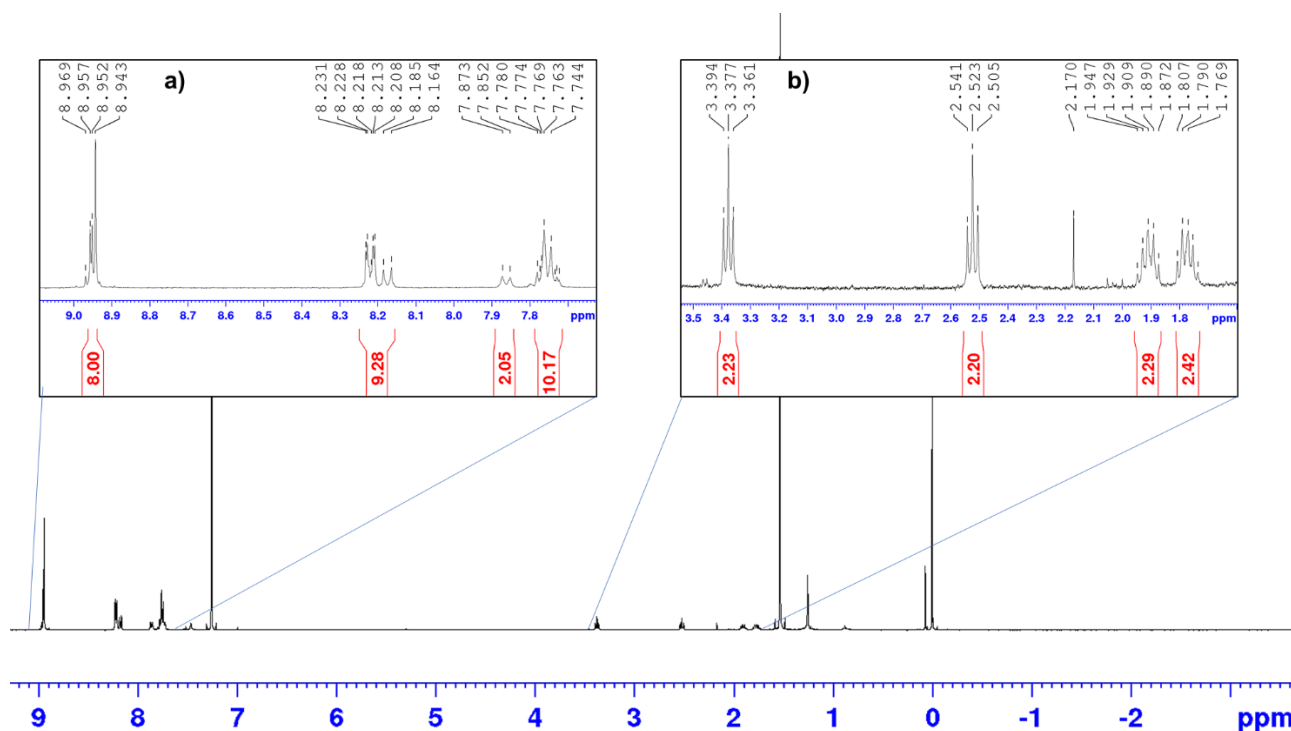


Figura 2.2 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da porfirina **5**, com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b).

2.3.2. Caracterização por UV/Vis e fluorescência

Em relação aos estudos por UV/Vis (Tabela 2.2 e Figuras 2.3 e 2.4), verificou-se que a porfirina **4** apresenta a banda Soret a 421 nm e um conjunto de bandas Q a 515, 551, 592 e 648 nm para as quais foram calculados os valores de absortividade molar, através da lei de Beer-Lambert. Os espectros de UV/Vis foram obtidos em DMF. Relativamente aos estudos por fluorescência, a porfirina **4** apresenta emissão máxima a 652 e a 717 nm. Foi também determinado o rendimento quântico desta porfirina em DMF, com o valor de 8,6%.

Tabela 2.2 – Comprimentos de onda máximos de absorção com respetivas absortividades molares e comprimentos de onda máximos de emissão e valores de rendimento quântico para as porfirinas **4** e **5**.

Porfirina	Absorção $\lambda_{\text{máx}}$ [nm] ($\epsilon_{\text{máx}}$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$])					Emissão	
	Soret	Bandas Q				$\lambda_{\text{máx}}$ [nm]	Φ
4	421 (347499)	515 (11144)	551 (6323)	592 (3508)	648 (3356)	652; 717	8,6
5	426 (294684)	517 (1819)	521 (1908)	----	----	606; 658	3,1

Já a porfirina **5** apresenta a banda Soret a 426 nm, o que representa um desvio batocrómico relativamente ao valor obtido para a porfirina **4**. Esta porfirina apresenta duas bandas Q a 517 e a 521 nm, o que é comprovativo da presença da metaloporfirina desejada.^[14] Por espectroscopia de fluorescência verificou-se que a porfirina **5** apresenta duas bandas de emissão máxima a 606 e 658

nm, sendo valores de comprimento de onda significativamente inferior ao da porfirina **4**. Quanto ao rendimento quântico, a metaloporfirina aqui obtida apresenta o valor de 3,1%, sendo consideravelmente inferior ao da porfirina livre.

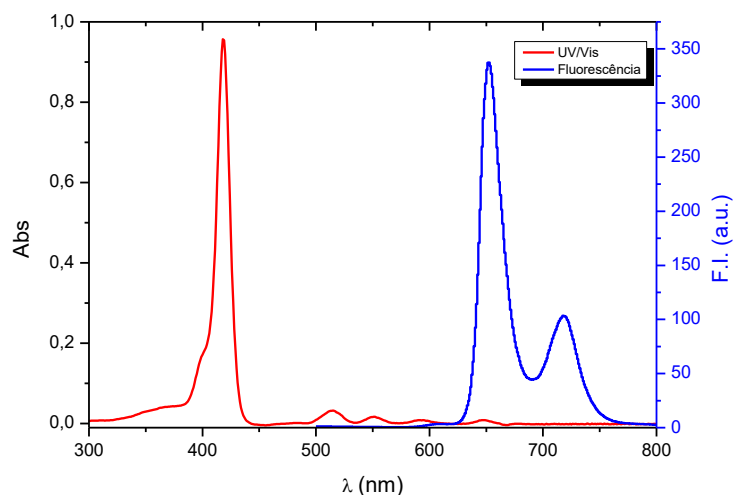


Figura 2.3 - Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) da porfirina **4**, em DMF.

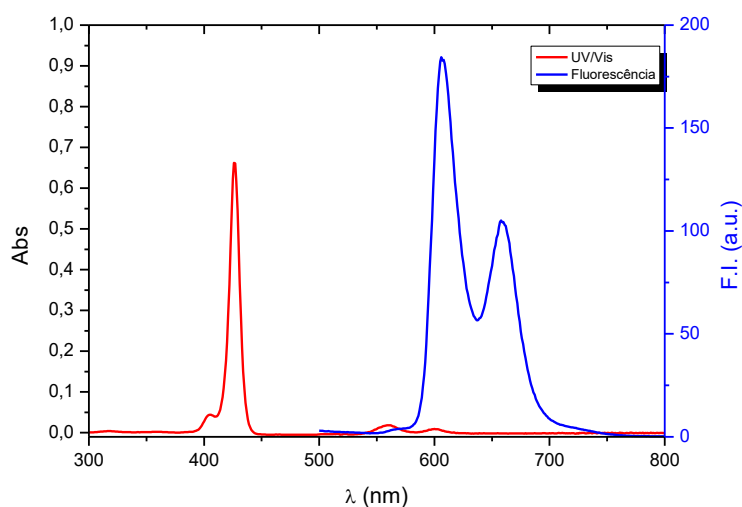


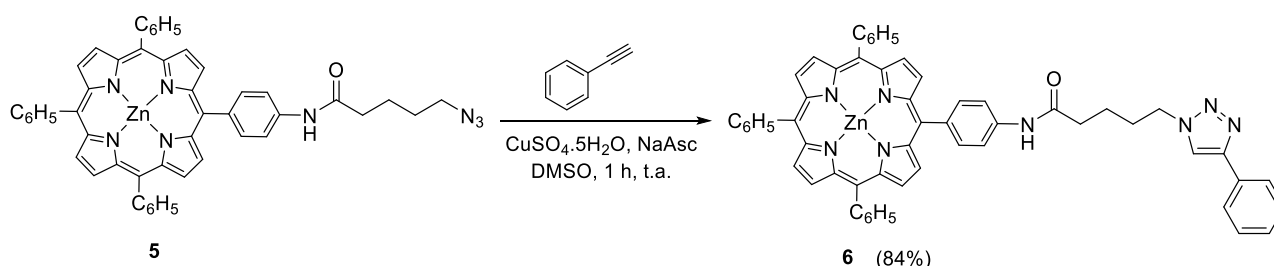
Figura 2.4 - Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) da porfirina **5**, em DMF.

2.4. Obtenção de conjugados porfirínicos *via* reação de Cu(I)AAC

Após a obtenção da porfirina **5** estudou-se a reatividade desta porfirina em reações de Cu(I)AAC, na presença de diferentes alcinos, incluindo o fenilacetileno e o propiolato de metilo, e ainda com um péptido funcionalizado com o terminal alcino.

2.4.1. Reação de Cu(I)AAC de porfirina **5** e fenilacetileno

A reação de Cu(I)AAC da porfirina **5** com o fenilacetileno foi realizada na presença de sulfato de cobre(II) e ascorbato de sódio, em dimetilsulfóxido (DMSO), durante 1 hora e à temperatura ambiente, conforme mostra o Esquema 2.4.

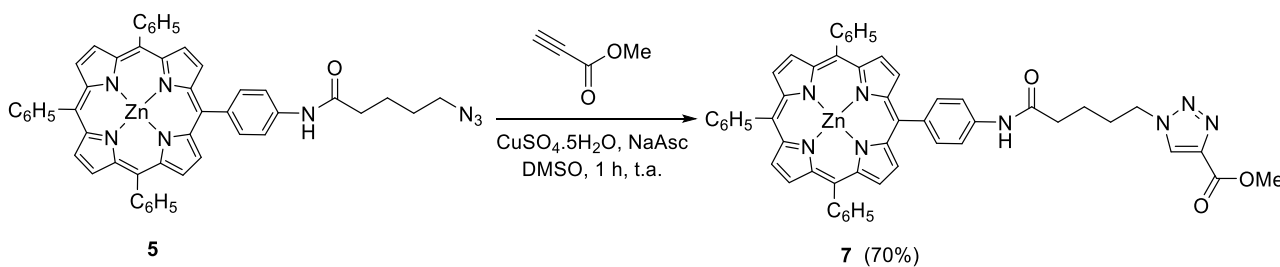


Esquema 2.4 - Síntese do conjugado **6** a partir da reação de cicloadição de porfirina **5** com fenilacetileno.

O derivado **6** foi obtido com um rendimento de 84%, tratando-se, assim, de uma excelente conversão da porfirina **5** no derivado desejado.

2.4.2. Reação de Cu(I)AAC de porfirina **5** e propiolato de metilo

A reação de Cu(I)AAC também foi realizada entre a porfirina **5** e o propiolato de metilo. Note-se que, o dipolarófilo propiolato de metilo possui o grupo substituinte $-\text{COOMe}$ fortemente sacador de elétrons, enquanto que o dipolarófilo fenilacetileno utilizado em 2.4.1 possui o grupo substituinte fenilo, tratando-se de um grupo substituinte relativamente menos reativo. O Esquema 2.5 descreve-se a rota seguida nesta síntese.



Esquema 2.5 - Síntese do conjugado **7** a partir da reação de cicloadição de porfirina **5** com propiolato de metilo.

O derivado **7** foi obtido de forma semelhante ao conjugado **6**, tendo sido isolado com rendimento de 70%, o que é demonstrativo do sucesso desta estratégia sintética.

2.5. Caracterização estrutural dos conjugados obtidos

A caracterização estrutural dos conjugados obtidos foi realizada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e diversas técnicas bidimensionais incluindo COSY, HMBC e HSQC, a fim de se poder comprovar a obtenção dos conjugados obtidos. Além disso, os conjugados foram também caracterizados por espectroscopia de UV/Vis, fluorescência e ESI-MS.

2.5.1. Caracterização por RMN

Quanto à caracterização do conjugado **6** por RMN de ^1H (Figura 2.5), os sinais que melhor caracterizam este conjugado são: a) o singuleto a 8,41 ppm correspondente ao próton do anel triazole; b) um conjunto de três sinais a 7,86; 7,44 e 7,34 ppm correspondente à ressonância do anel fenilo proveniente do fenilacetileno e c) o desvio para campos mais baixos do sinal tripleto correspondente ao $-\text{CH}_2\text{N}-$ (4,60 ppm) resultante da cicloadição do grupo azida ao acetileno. Com base no espectro de COSY (Figura 2.6) foi possível fazer a atribuição dos prótons correspondentes à cadeia alquílica.

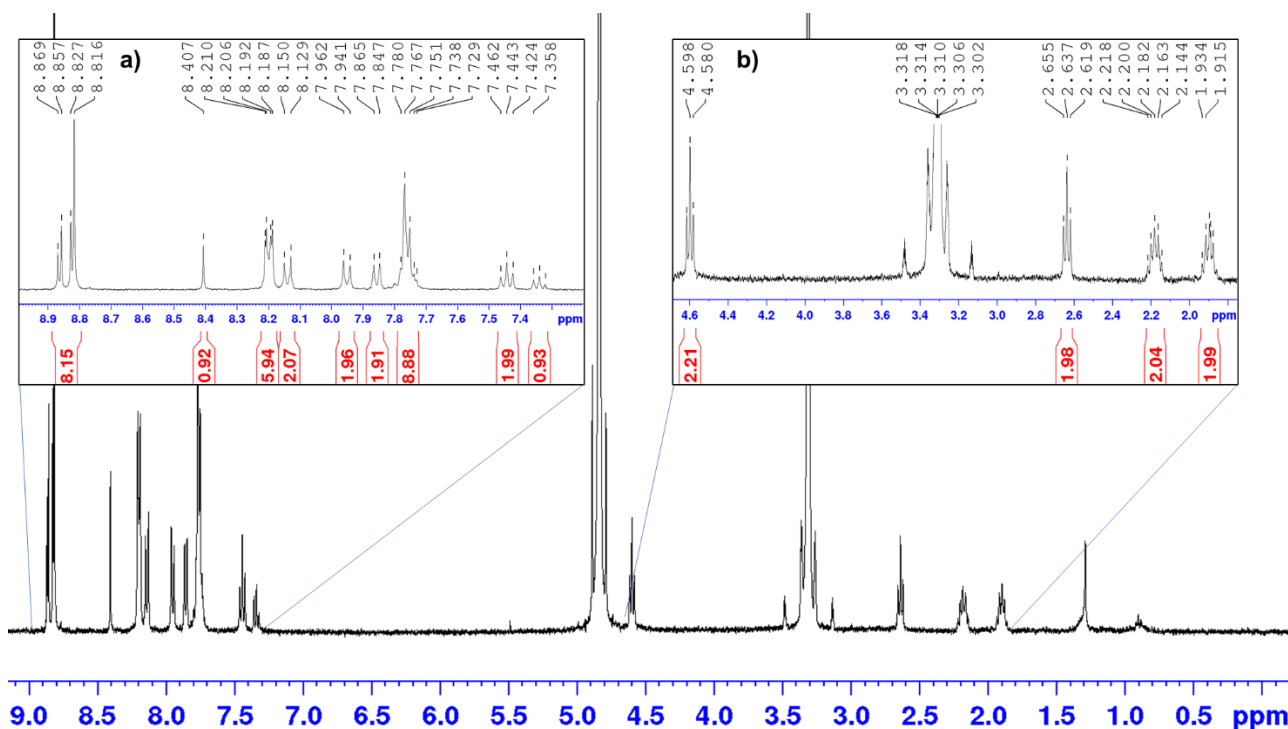


Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) do conjugado **6**, com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b).

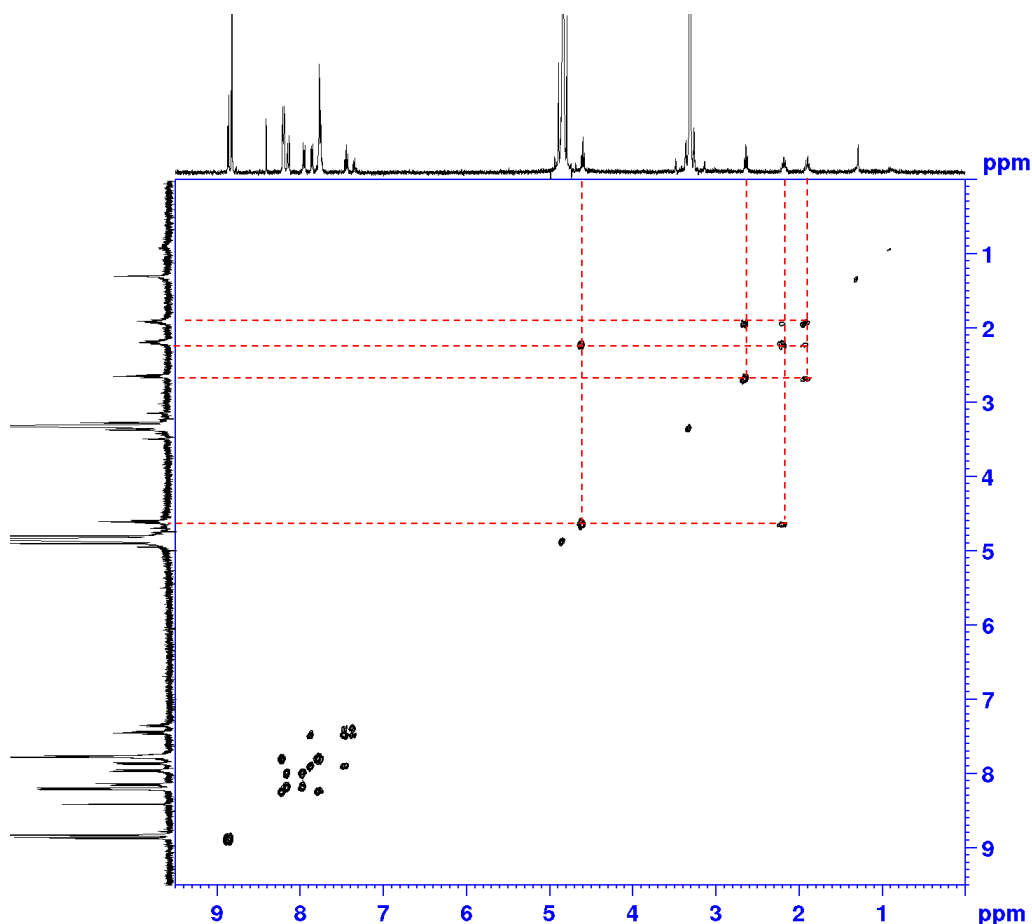


Figura 2.6 - Espectro de COSY do conjugado 6.

À semelhança do conjugado 6, o conjugado 7 foi caracterizado por RMN de ^1H , em metanol deuterado (Figura 2.7), sendo possível observar os sinais obtidos para os diferentes prótons. Neste caso, os sinais que melhor caracterizam o conjugado obtido são: a) o singuleto a 8,53 ppm correspondente ao próton do anel triazole; b) o singuleto a 3,83 ppm correspondente aos prótons do grupo $-\text{COOCH}_3$ e c) o desvio para campos mais baixos do sinal tripleto correspondente ao $-\text{CH}_2\text{N}-$ (4,50 ppm) resultante da cicloadição do grupo azida à ligação tripla. Com base no espectro de COSY (Figura 2.8) foi possível fazer a atribuição dos prótons correspondentes à cadeia alquílica. Com recurso à análise dos espectros de ^{13}C , HSQC e HMBC (Figuras 2.9 e 2.10), foi possível atribuir os sinais a 23,7; 30,7; 37,1 e 51,4 ppm como sendo correspondentes aos carbonos da cadeia alquílica. Foi ainda possível atribuir o sinal a 52,5 ppm como sendo correspondente ao carbono OCH_3 do grupo éster; o sinal a 128,4 ppm referente ao carbono não substituído do anel triazole; o sinal a 162,5 ppm do carbono carbonilo do grupo éster e a 174,1 ppm o carbono carbonilo da ligação amida.

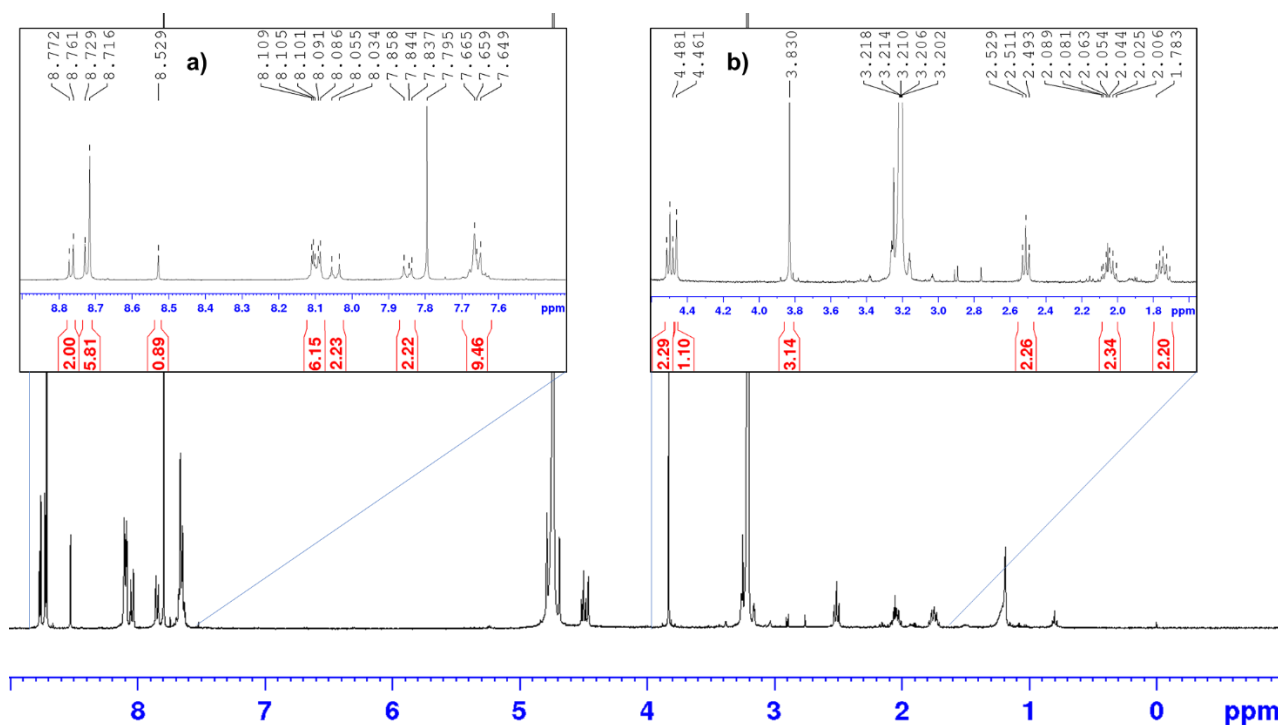


Figura 2.7 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) do conjugado 7, com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b).

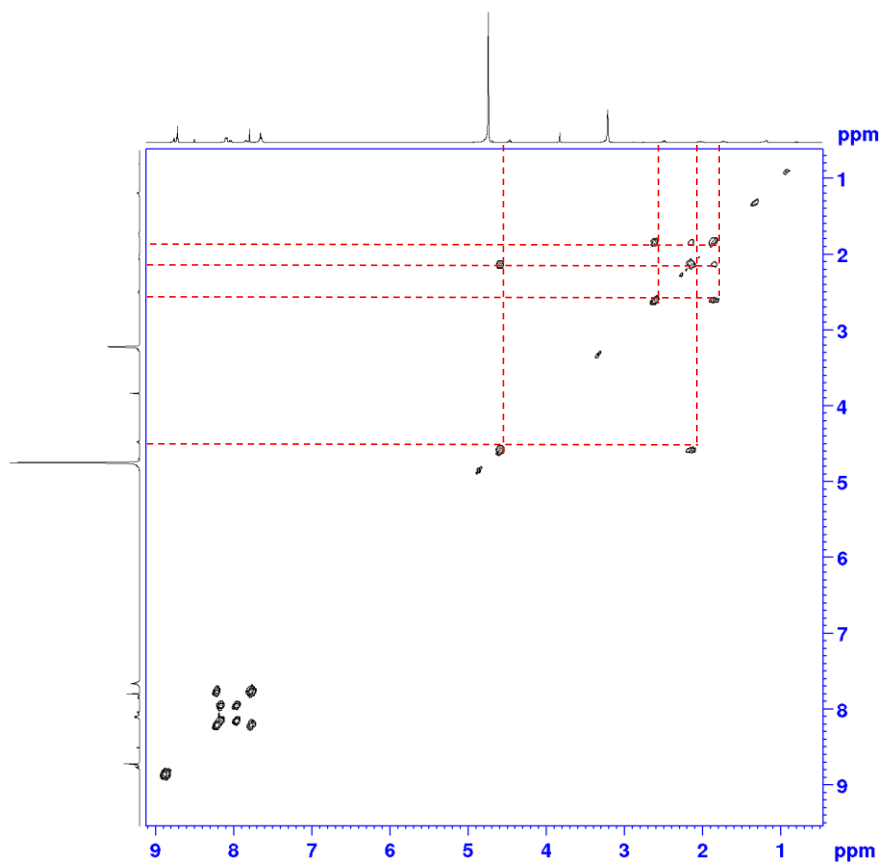


Figura 2.8 - Espectro de COSY do conjugado 7.

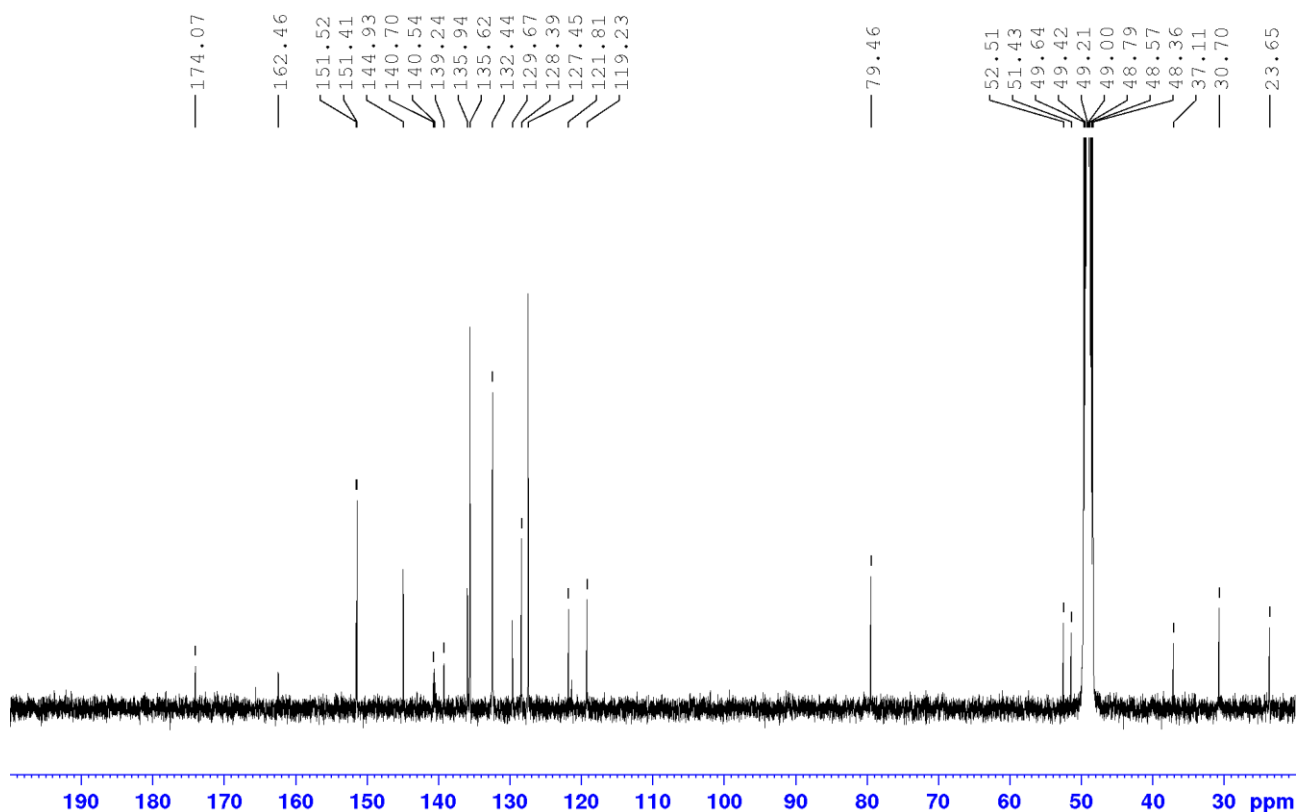


Figura 2.9 - Espectro de RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CD_3OD) do conjugado 7.

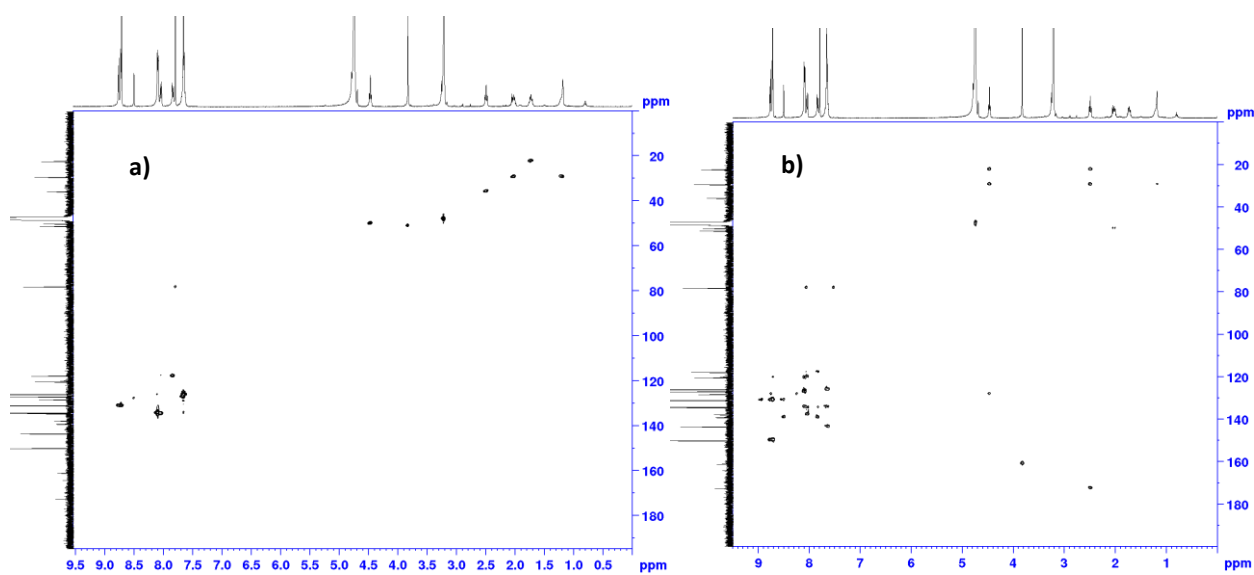


Figura 2.10 - Espectros de HSQC (a) e HMBC (b) do conjugado 7.

2.5.2. Caracterização por ESI-MS

O conjugado **6** foi também caracterizado por ESI-MS, de modo a comprovar o sucesso da síntese deste composto. Observa-se a presença do pico correspondente ao ião quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ com o valor de m/z de 918,28, o que comprova a presença do produto pretendido.

O conjugado **7** foi também caracterizado por ESI-MS, tendo-se obtido o pico correspondente ao ião quasi-molecular $[M+H]^+$ com o valor de m/z de 900,25, que comprova a presença do composto pretendido.

2.5.3. Caracterização por espectroscopia de UV/Vis e fluorescência

Com o objetivo de estudar as propriedades fotofísicas (absorção e emissão) dos conjugados obtidos, foram realizados os espectros de UV/Vis e fluorescência (Figuras **2.11** e **2.12**), em DMF.

Em relação ao conjugado **6**, os espectros de UV/Vis mostram a 426 nm a banda Soret, ao passo que as bandas Q surgem a 560 e a 599 nm. A partir daqui, foi possível obter os valores de absorvidade molar para cada um destes comprimentos de onda (Tabela **2.3**). Comparativamente com a porfirina precursora (porfirina **5**), a banda Soret manteve-se a 426 nm, no entanto apresenta uma absorvidade molar muito superior à da porfirina **5**. Relativamente às bandas Q, observa-se um desvio batocrômico, em relação à porfirina precursora. Nestas últimas bandas, também se observa um aumento da absorvidade molar. Relativamente ao estudo por fluorescência, o composto **6** apresenta emissão máxima a 607 e 659 nm. À semelhança das porfirinas **4** e **5**, também foi determinado o rendimento quântico do conjugado **6**, em que se obteve o valor de 3,0%, que é semelhante ao da porfirina **5**, sendo inferior ao da porfirina livre de metal (porfirina **4**).

Tabela 2.3 - Comprimentos de onda máximos de absorção com respetivas absorvidades molares e comprimentos de onda máximos de emissão e valores de rendimento quântico para os conjugados **6** e **7**

Conjugado	Absorção $\lambda_{\text{máx}}$ [nm] ($\epsilon_{\text{máx}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹])					Emissão	
	Soret	Bandas Q				$\lambda_{\text{máx}}$ [nm]	Φ_f
6	426 (1620000)	560 (13762)	599 (7038)	----	----	607; 659	3,0
7	425 (533035)	559 (11443)	599 (6085)	----	----	607; 659	3,3

Os espectros de UV/Vis (Figura **2.12**) revelaram que o conjugado **7** apresenta a banda Soret a 425 nm. Em relação às bandas Q, estas surgem a 559 e 599 nm. Tendo em conta as bandas obtidas, foi possível obter os valores de absorvidade molar para cada uma delas (Tabela **2.3**). Em comparação com a porfirina **5**, verifica-se que a banda Soret se mantém no mesmo valor de comprimento de onda máximo de absorvância, no entanto verifica-se um desvio batocrômico ao nível das bandas Q. No que diz respeito aos valores de absorvidade molar, verifica-se que estes são significativamente superiores aos da porfirina precursora.

Os estudos por fluorescência (Figura **2.12**) revelaram que o conjugado **7**, apresenta emissão máxima a 607 e 659 nm, à semelhança do conjugado **6**, sendo inferior ao da porfirina **5**.

Relativamente ao rendimento quântico, este conjugado apresenta o valor de 3,3%, que é semelhante ao conjugado **6** e à porfirimina **5**, sendo inferior ao valor obtido para a porfirimina **4** livre de metal.

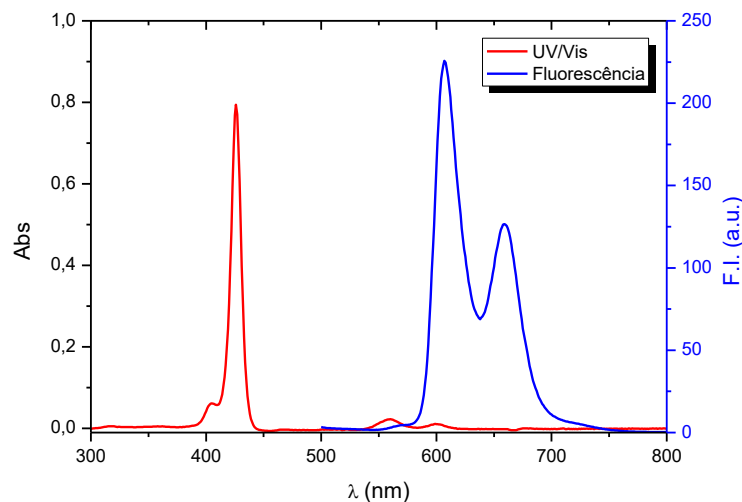


Figura 2.11 - Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) do conjugado **6**, em DMF.

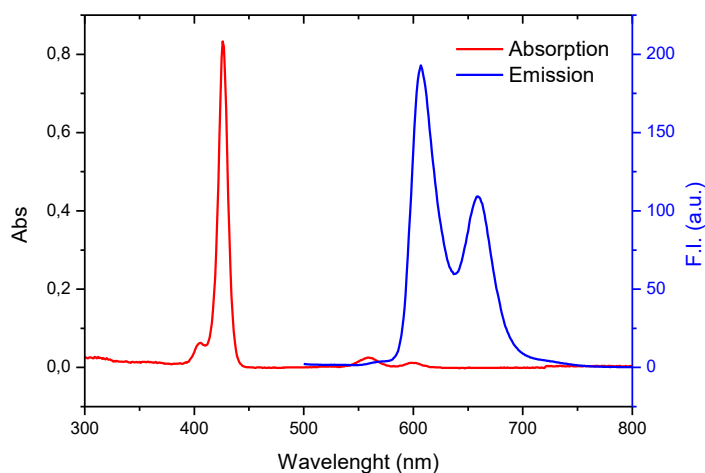


Figura 2.12 - Espectros de UV/Vis (vermelho) e fluorescência (azul) do conjugado **7**, em DMF.

2.6. Síntese do conjugado porfirimina-péptido via reação de Cu(I)AAC

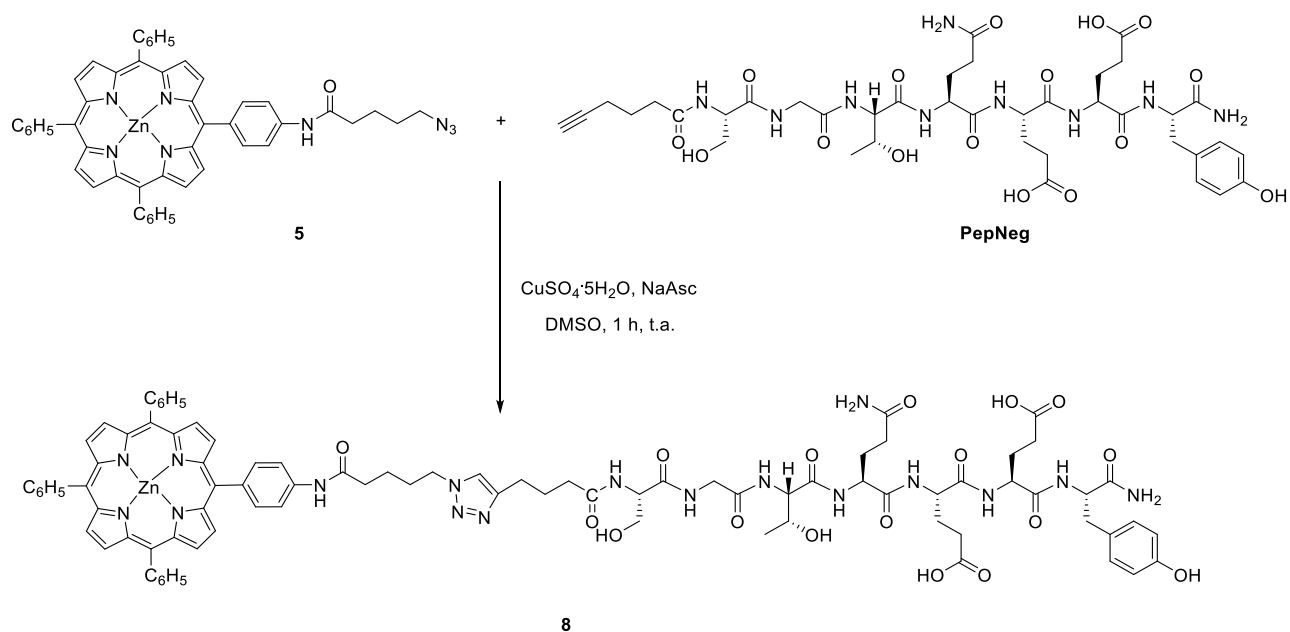
2.6.1. Estratégia de síntese

No sentido de obter PSS com propriedades farmacocinéticas melhoradas, maior solubilidade em meios fisiológicos e seletividade para as células tumorais,^[11, 15] decidiu-se conjugar/combinar a porfirimina **5** com o péptido PepNeg.^[16] Trata-se de um péptido aniónico, altamente solúvel em água, e com capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica.

O péptido PepNeg foi sintetizado em estreita colaboração com a Prof. Paula Gomes e a Dra. Cátia Teixeira, do LAQV/REQUIMTE. Este foi obtido por síntese peptídica em fase sólida (SPPS),^[17] consistindo em ciclos alternados de acoplamento/desproteção de aminoácidos. Os passos de acoplamento de aminoácidos (na forma Fmoc-AA-OH), que ocorreram durante 1 hora com agitação contínua, foram realizados na presença de hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(1H-benzotriazole-1-il)urónio (HBTU) como agente de acoplamento e DIPEA como base, sendo estes dissolvidos no volume mínimo necessário de DMF. A desproteção foi realizada com recurso a uma solução de piperidina 20% em DMF, durante 20 minutos com agitação contínua. Entre os ciclos de acoplamento e desproteção, houve lugar a lavagens sucessivas com DMF (3 vezes) e diclorometano (4 vezes), por esta ordem. O sucesso dos ciclos de acoplamento/desproteção foi testado através do teste da ninidrina. No fim, o péptido foi acoplado ao ácido 5-hexinóico em *N*-terminal, utilizando o agente de acoplamento 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ) (3,1 equivalentes), sendo esta mistura dissolvida em diclorometano. Quando concluída a sequência peptídica, procedeu-se à clivagem da resina, com recurso a um *cocktail* constituído por 95% de TFA, 2,5% de tri-isopropilsilano (TIS) e 2,5% de água, durante 2 horas com agitação. Após este processo, a mistura foi filtrada a vácuo, sendo recolhido o filtrado. A resina que ficou no filtro foi lavada com o *cocktail* que não foi utilizado na clivagem e com TFA. O filtrado foi sujeito a quatro sucessivas extrações líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico (MTBE) e água. As primeiras três fases aquosas foram analisadas, conjuntamente, por HPLC-DAD (eluição por gradiente 0-100% de acetonitrilo), assim como a quarta fase recolhida. Verificou-se que as fases aquosas continham o péptido puro. Assim, as fases aquosas foram combinadas numa única fase, e analisada por ESI-MS, o que comprovou tratar-se do péptido pretendido. Procedeu-se, então, à liofilização, obtendo-se o péptido-alvo.

Seguidamente, realizou-se a reação de Cu(I)AAC envolvendo a porfirina **5** e o péptido **PepNeg** sintetizado, utilizando condições reacionais semelhantes às utilizadas na obtenção dos conjugados **6** e **7** (Esquema 2.6).

Síntese de (bio)conjugados porfirínicos via reação de cicloadição catalisada por cobre(I)



Esquema 2.6 - Síntese do conjugado porfirina-péptido **8** via Cu(I)AAC de porfirina **5** e o péptido **PepNeg**.

O conjugado **8** foi obtido após purificação da mistura reacional por diálise em água desionizada e, posteriormente, em solução aquosa de HCl a 1%, durante quatro dias, substituindo-se o meio em intervalos de 12 horas.

2.6.2. Caracterização estrutural do conjugado porfirina-péptido obtido

O péptido **PepNeg** funcionalizado com o ácido 5-hexinóico, bem como o conjugado péptido-porfirina, foram caracterizados por ESI-MS. Fez-se, em primeiro lugar, uma análise por ESI-MS ao péptido **PepNeg** (Figura 2.13), a fim de verificar a presença do produto desejado.

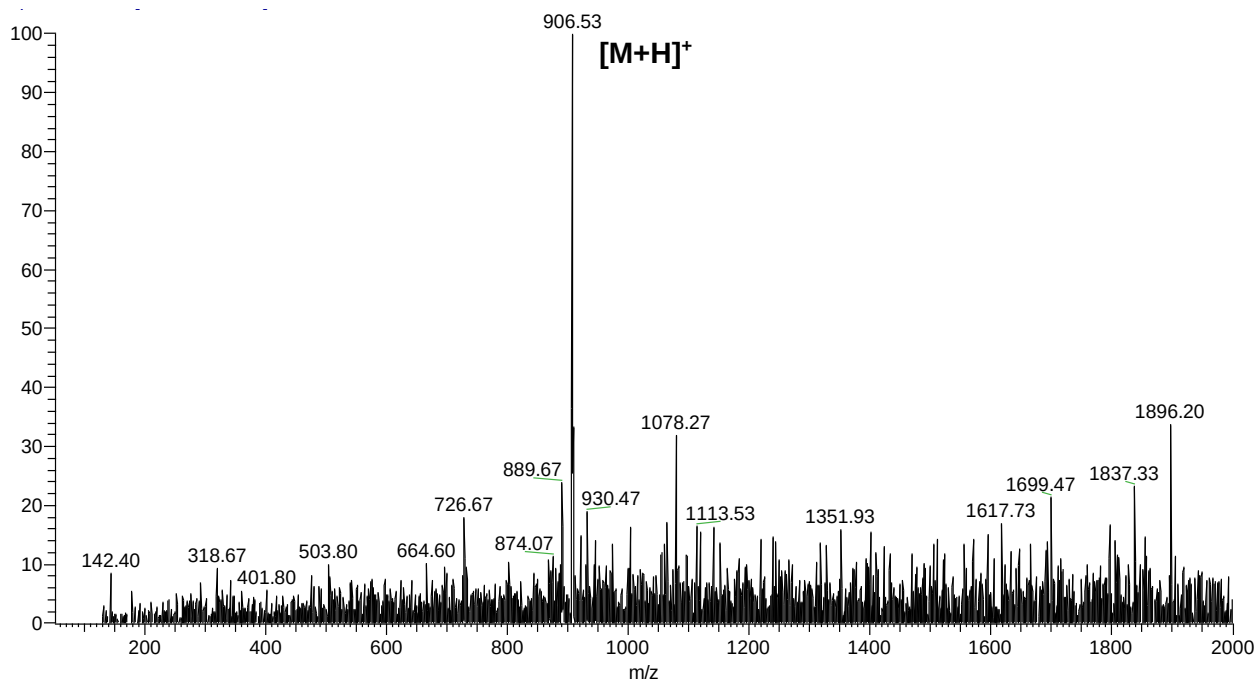


Figura 2.13 - Espectro de ESI-MS (positivo) do péptido **PepNeg**.

O espectro de ESI-MS do péptido **PepNeg** mostra um pico de elevada abundância relativa com o valor de m/z 906,53, correspondente ao ião quasi-molecular $[M+H]^+$, confirmando a obtenção do péptido desejado. Antes de se proceder à diálise, foi igualmente realizada uma análise por ESI-MS à mistura reacional (Figura 2.14).

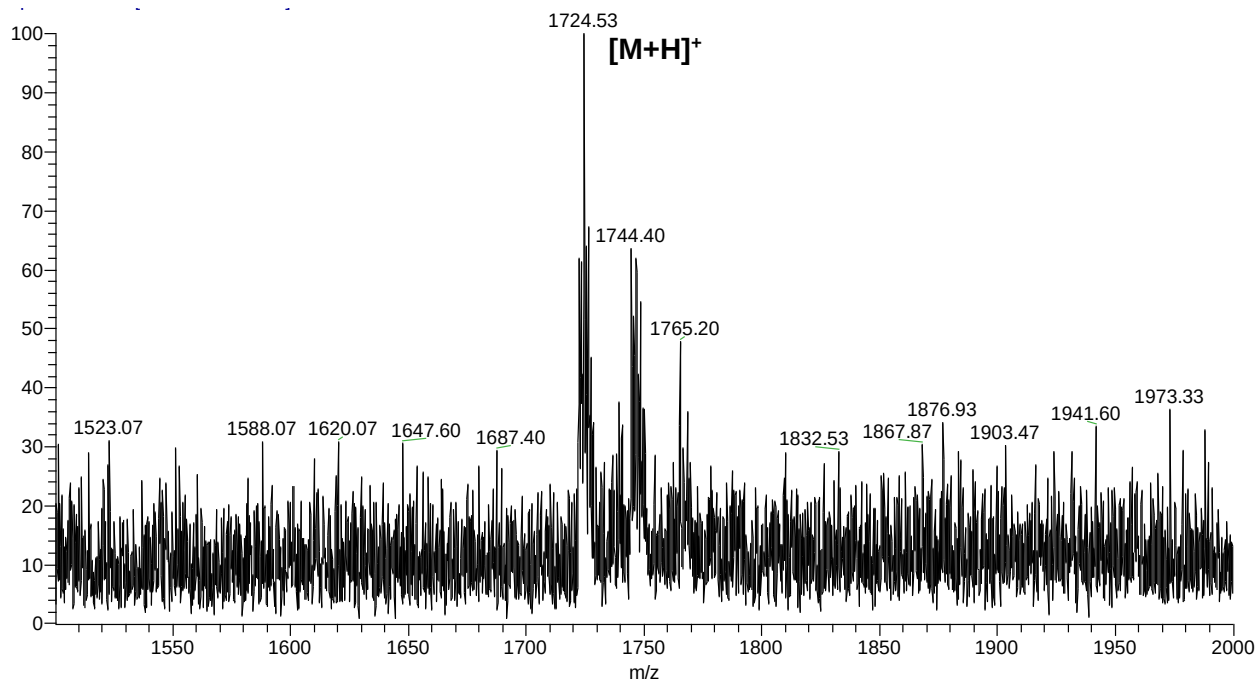


Figura 2.14 - Espectro de ESI-MS (positivo) da mistura reacional obtida.

No espectro de ESI-MS obtido da mistura reacional observa-se um pico de elevada intensidade relativa com o valor de m/z de 1724,53, correspondente ao quasi-molecular $[M+H]^+$, o que é indicativo da presença do conjugado pretendido.

Ao fim de um dia de diálise, parte do conteúdo que se encontrava na membrana foi centrifugado, sendo recolhidos o sobrenadante e o precipitado. Foram ambos analisados por ESI-MS, tendo-se verificado que o conjugado se encontrava no precipitado (Figura 2.15).

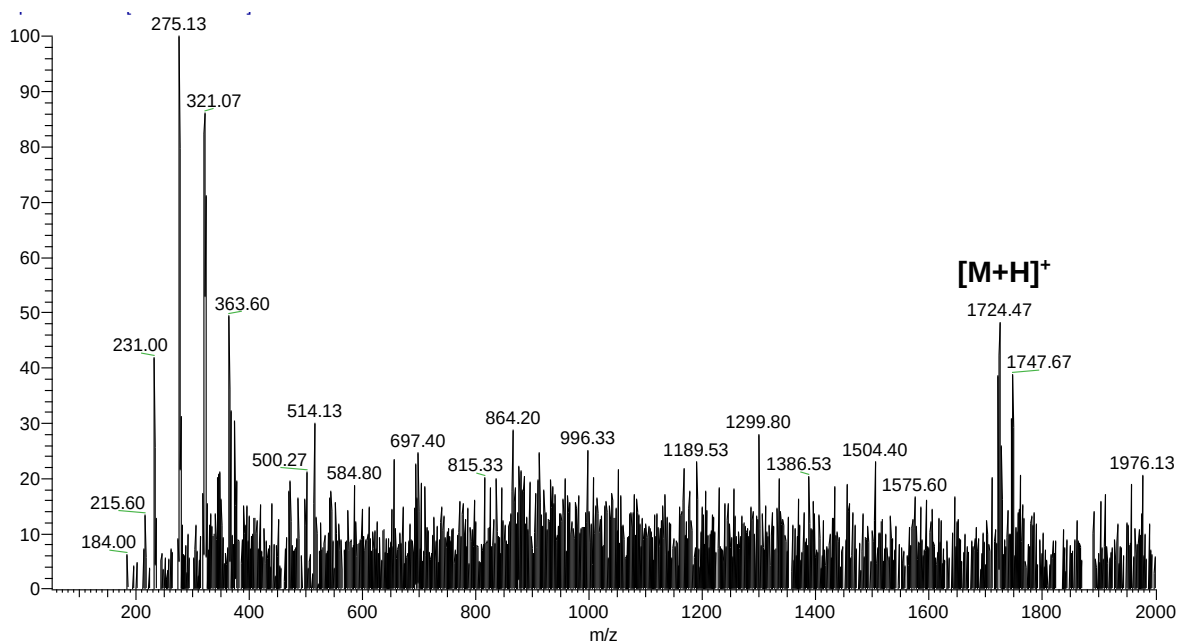


Figura 2.15 - Espectro de ESI-MS (positivo) do precipitado após centrifugação.

No entanto, também foi possível verificar a existência de impurezas em quantidades apreciáveis. Observa-se também um pico com o valor de m/z de 1747,67, que corresponde ao sal de sódio do conjugado, proveniente do ascorbato de sódio utilizado na reação Cu(I)AAC.

Os próximos passos irão envolver a purificação do conjugado obtido por HPLC preparativa e posteriormente a sua caracterização estrutural recorrendo às técnicas espectroscópicas de RMN, UV/Vis e fluorescência.

2.7. Referências

1. Williams, T.M.; Sibrian-Vazquez, M. e Vicente, M.G.H., *Design and Synthesis of Photosensitizer-Peptide Conjugates for PDT*, in *Handbook of Photodynamic Therapy*. 2016. p. 45-93.
2. Giuntini, F.; Alonso, C.M. e Boyle, R.W., *Synthetic approaches for the conjugation of porphyrins and related macrocycles to peptides and proteins*. Photochemistry and Photobiology Science, 2011. **10**(5): p. 759-91.
3. Schroder, D.C.; et al., *1,4-Disubstituted 1H-1,2,3-Triazole Containing Peptidotriazoleamers: A New Class of Peptidomimetics With Interesting Foldamer Properties*. Frontiers in Chemistry, 2019. **7**(155): p. 155.
4. Liu, B.; et al., *Intramolecular cyclization of the antimicrobial peptide Polybia-MPI with triazole stapling: influence on stability and bioactivity*. Journal of Peptide Science, 2017. **23**(11): p. 824-832.
5. Su, C.L.; et al., *Using gene expression database to uncover biology functions of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues synthesized via a copper (I)-catalyzed reaction*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **132**: p. 90-107.
6. Bicak, T.C.; et al., *Simultaneous and Sequential Synthesis of Polyaniline-g-poly(ethylene glycol) by Combination of Oxidative Polymerization and CuAAC Click Chemistry: A Water-Soluble Instant Response Glucose Biosensor Material*. Macromolecules, 2017. **50**(5): p. 1824-1831.
7. Acebo, C.; et al., *Synthesis of 1,2,3-triazole functionalized hyperbranched poly(ethyleneimine) and its use as multifunctional anionic macroinitiator for diglycidyl ether of bisphenol A curing*. European Polymer Journal, 2016. **85**: p. 390-400.
8. Brase, S.; et al., *Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds*. Angewandte Chemie International Edition in English, 2005. **44**(33): p. 5188-5240.
9. Dondi, R.; et al., *Flexible synthesis of cationic peptide-porphyrin derivatives for light-triggered drug delivery and photodynamic therapy*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2016. **14**(48): p. 11488-11501.
10. Kappe, C.O. e Van der Eycken, E., *Click chemistry under non-classical reaction conditions*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(4): p. 1280-1290.
11. Biscaglia, F. e Gobbo, M., *Porphyrin-peptide conjugates in biomedical applications*. Peptide Science, 2018. **110**(5): p. e24038.

12. Biscaglia, F.; et al., *Linker dependent chirality of solvent induced self-assembled structures of porphyrin-alpha-helical peptide conjugates*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2016. **14**(40): p. 9568-9577.
13. Caddick, S., *Microwave assisted organic reactions*. Tetrahedron, 1995. **51**(38): p. 10403-10432.
14. Martinez De Pinillos Bayona, A.; et al., *Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers*. Chemistry and Biology Drug Design, 2017. **89**(2): p. 192-206.
15. Luciano, M. e Bruckner, C., *Modifications of Porphyrins and Hydroporphyrins for Their Solubilization in Aqueous Media*. Molecules, 2017. **22**(6): p. 980-1027.
16. Neves-Coelho, S., et al., *A new noncanonical anionic peptide that translocates a cellular blood-brain barrier model*. Molecules, 2017. **22**(10): p. 1753-1764.
17. Montalbetti, C.A.G.N. e Falque, V., *Amide bond formation and peptide coupling*. Tetrahedron, 2005. **61**(46): p. 10827-10852.

Capítulo 3 - Novos derivados porfirínicos obtidos por reação com o fluoróforo dansilo

3.1. Motivação e objetivos

O objetivo do presente capítulo é preparar novos conjugados porfirínicos a partir da reação de macrociclos funcionalizados com o grupo amina e o fluoróforo dansilo, *via* formação da ligação sulfonamida, tendo em vista a obtenção de novos PSs com propriedades fotofísicas melhoradas para potencial aplicação em fototerapia e fotodiagnóstico do cancro.

Os derivados obtidos a partir do cloreto de dansilo são muito atrativos devido às propriedades espectroscópicas que possuem, exibindo tipicamente elevados valores de rendimento quântico de fluorescência e comprimentos de onda de emissão na região dos 400–600 nm. Por outro lado, o cloreto de dansilo reage facilmente com aminas alifáticas ou aromáticas, *via* formação de sulfonamidas, o que tem permitido a preparação de uma grande variedade de sensores ou sondas fluorescentes para as mais variadas aplicações.^[1] Neste contexto, pretende-se combinar as propriedades espectroscópicas intrínsecas dos macrociclos porfirínicos com o fluoróforo dansilo, e estudar as propriedades de absorção e emissão dos conjugados resultantes. Para isso selecionaram-se dois macrociclos porfirínicos contendo o grupo amina: (i) a porfirina **3** anteriormente sintetizada e contendo um grupo amina na posição *para* do anel fenilo e (ii) a clorina **12** contendo um grupo amina alifático.

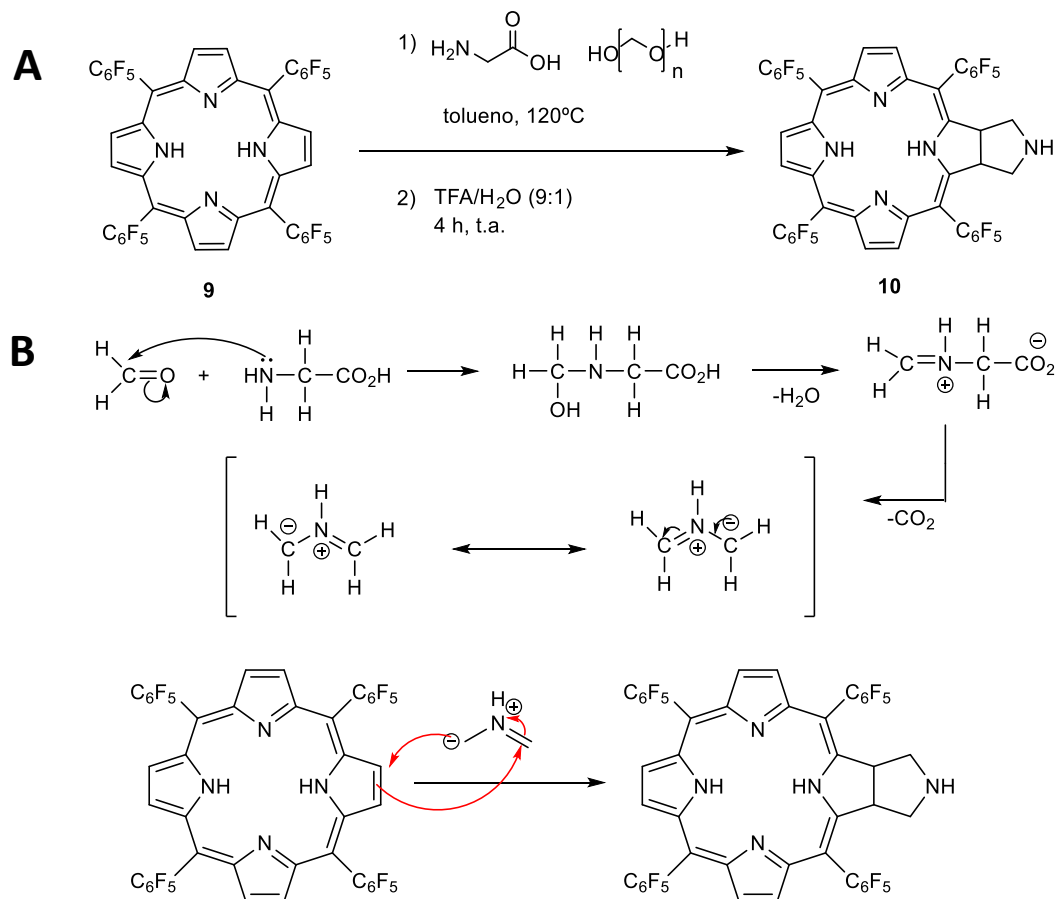
Além da formação de sulfonamidas, o grupo amina constitui um grupo funcional muito reativo e interessante, podendo reagir com diversos derivados através de várias reações, entre as quais, formação de ligações amida, *N*-alquilações, substituições nucleófilas, cicloadições e reações catalisadas pelo paládio, entre outras.^[2]

3.2. Síntese de precursores porfirínicos contendo o grupo amina

Tendo em vista a síntese de conjugados porfirínicos derivados do fluoróforo dansilo, foram selecionados os seguintes precursores porfirínicos: (i) a porfirina **3** contendo um grupo amina na posição *para* do anel fenilo; a síntese desta porfirina encontra-se descrita no Capítulo 2 desta tese e envolve a reação de mononitração da 5,10,15,20-tetrafenilporfirina, seguida por redução do grupo nitro a amina e (ii) a clorina **12** contendo um grupo amina alifático; a síntese desta clorina envolve a reação de cicloadição 1,3-dipolar (1,3-DC) de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (daqui em diante designada por porfirina **9**) com o ileto de azometino gerado a partir do par glicina/paraformaldeído, seguindo-se reação da clorina obtida com *N*-(2-bromoetil)ftalimida e remoção da ftalimida para assim se obter o grupo NH₂ (Esquema **3.1** e Esquema **3.3**).

As reações 1,3-DC permitem obter novos derivados porfirínicos, sendo caracterizadas pela sua elevada versatilidade e regioseletividade, o que torna este tipo de reações uma excelente

estratégia na obtenção de novos derivados porfirínicos.^[3, 4] Além disso, estas reações são irreversíveis, sendo por isso controladas cineticamente, aplicando-se este princípio ao acoplamento de ileto de azometino a *meso*-tetraarilporfirinas.^[5] No esquema **3.1**, encontram-se descritas as condições experimentais da reação de 1,3-DC que origina a clorina **10** a partir da porfirina **9**.



Esquema 3.1 – A) Síntese da clorina **10** a partir da porfirina **9** via reação 1,3-DC com o ileto de azometino gerado a partir do par glicina/paraformaldeído. **B)** Mecanismo da reação de formação do ileto de azometino e da reação de 1,3-DC

Tendo em vista a síntese da clorina **10** com bons rendimentos, foi testado um grande leque de condições experimentais que envolveu:

- (i) Aquecimento micro-ondas em regime multimodo: com recurso ao equipamento de aquecimento com radiação MW multimodo (Tabela **3.1**) e utilizando como ponto de partida as condições descritas por C. M. Drain e colaboradores,^[6] foram realizados oito ensaios, em simultâneo, em que se pretendia estudar a variação de solvente, da massa de porfirina **9** pesada e a influência da moagem prévia ou não do par glicina/paraformaldeído no curso da reação. O aquecimento MW em regime multimodo permite realizar várias reações em simultâneo, nas mesmas condições, tendo a capacidade máxima para 36 vasos fechados ou um vaso aberto de 5 L.^[7] Este equipamento apresenta algumas diferenças relativamente ao

equipamento de MW em regime monomodo, sendo as mais importantes destacadas na Tabela 3.1. Na Tabela 3.2, encontram-se as condições em que as reações decorreram. As reações ocorreram em quatro ciclos de aquecimento alternados com o mesmo número de ciclos de arrefecimento. Nos ciclos de aquecimento, foi atingida a temperatura de 130°C, permanecendo neste patamar durante 5 minutos. Seguindo-se os ciclos de arrefecimento, em que a temperatura desceu até aos 60°C. Atingido este valor, iniciou-se um novo ciclo de aquecimento. A potência máxima utilizada foi de 1790 W. Terminadas as reações, no caso dos vasos 1, 2, 5 e 6 evaporou-se o solvente à secura no evaporador rotativo. No caso dos restantes vasos, realizou-se uma separação por cromatografia em coluna com o objetivo de eliminar o solvente clorobenzeno. Os resíduos obtidos foram todos analisados por RMN de ^1H , tendo-se concluído que não foi possível obter a clorina **10** de forma satisfatória por nenhum destes métodos, tendo-se recuperado uma elevada quantidade de porfirimina de partida (porfirimina **9**) por reagir. Além disso, houve formação de outros produtos não pretendidos. Uma possível explicação para este insucesso poderá ser o curto tempo de reação, ou seja, o tempo utilizado nos ciclos de reação não ser suficiente para que as reações ocorram.

Tabela 3.1 - Principais diferenças entre o equipamento multimodo e monomodo

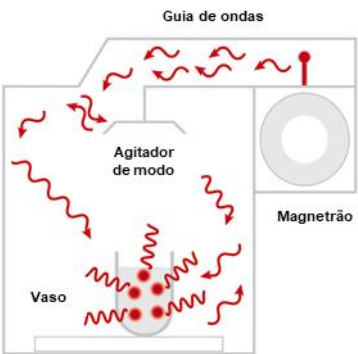
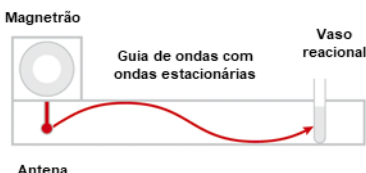
Propriedades	Equipamento de aquecimento MW multimodo	Equipamento de aquecimento MW monomodo
Esquema de funcionamento ^[8]		
Reatores	vários reatores em simultâneo	um reator de cada vez
Potência máxima	1800 W	300 W

Tabela 3.2 - Condições experimentais da reação 1,3-DC entre a porfirimina **9** e o par glicina/paraformaldeído, realizada no equipamento de aquecimento por radiação MW multimodo

Vaso	Glicina (massa, g)	Paraformaldeído (massa, g)	Porfirimina 9 (massa, g)	Solvente (volume, mL)	Moagem glicina/paraformaldeído
1	0,1008	0,0404	0,01040	1,2-dicloroetano (9 mL)	Sim
2	0,1004	0,0399	0,01020	1,2-dicloroetano (9 mL)	Não
3	0,1002	0,0403	0,01039	Clorobenzeno (9 mL)	Sim
4	0,0999	0,0403	0,01032	Clorobenzeno (9 mL)	Não

5	0,0309	0,0120	0,00303	1,2-dicloroetano (9 mL)	Sim
6	0,0300	0,0123	0,00333	1,2-dicloroetano (9 mL)	Não
7	0,0312	0,0122	0,00307	Clorobenzeno (9 mL)	Sim
8	0,0308	0,0123	0,00326	Clorobenzeno (9 mL)	Não

- (ii) Aquecimento micro-ondas em regime monomodo: foi realizada a síntese da clorina **10**, em regime monomodo, ou seja, no aparelho que permite apenas a irradiação de um vaso de cada vez. Também foram realizados quatro ciclos alternados de aquecimento/arrefecimento. Nos ciclos de aquecimento, estes ocorreram à temperatura de 130°C, durante 5 minutos, à potência máxima de 300 W. Nos ciclos de arrefecimento, através de arrefecimento com ar comprimido, a temperatura baixou até aos 60°C, repetindo-se um novo ciclo de aquecimento quando atingida esta temperatura. Por este método, também se verificou que houve formação de clorina **10**, mas em quantidades muito pequenas, ao mesmo tempo que a porfirina **9** é recuperada em grande quantidade e também se verifica a formação de outros produtos secundários. Aqui, o tempo curto de aquecimento também poderá ser uma possível explicação para o baixo rendimento obtido.
- (iii) Síntese por aquecimento convencional: foi preparada uma mistura de porfirina **9** com glicina (4 equivalentes) e paraformaldeído (10 equivalentes), em tolueno. Essa mistura foi refluxada (120°C) em banho de óleo, durante 9 horas, sob atmosfera de azoto, com agitação contínua e ao abrigo da luz. Durante o período de reação, foram feitas mais duas adições de glicina e de paraformaldeído, no mesmo número de equivalentes da primeira adição. As duas últimas adições foram feitas de 3 em 3 horas. Após arrefecimento da mistura reacional, esta foi filtrada com filtro de algodão, sendo evaporado o tolueno. O resíduo sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna, verificando-se a eluição da porfirina **9** que não reagiu com diclorometano/hexano (1:1), seguindo-se a clorina com clorofórmio/acetona (9:1). A clorina obtida foi sujeita à hidrólise ácida, numa mistura de TFA/água (9:1), durante 4 horas, à temperatura ambiente. Após esta etapa, a mistura foi diluída em água e extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi neutralizada, em gelo, com uma solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio. A seguir à neutralização, a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura. Foi possível obter a clorina **10**, com um rendimento de 53%.

Finalmente, verificou-se que as melhores condições para a obtenção da clorina **10** envolvem a reação de **9** com o par glicina/paraformaldeído em tolueno a 120°C, em aquecimento convencional, num total de 9 horas. Depois de isolada por cromatografia em coluna e, posteriormente, hidrolisada em TFA/água, a clorina **10** foi obtida com um rendimento de 53%, com uma recuperação de 26% da porfirina de partida (porfirina **9**). A clorina obtida foi posteriormente caracterizada por RMN de ^1H

(Figura 3.1). O espectro mostrou a presença de sinais a 8,39-8,70 ppm correspondentes aos prótons β -pirrólicos e o sinal -1,82 ppm devido aos prótons NHs. O sucesso desta síntese é comprovado pelo aparecimento do multipeto a 5,22 e 5,23 ppm correspondente aos prótons H-2,3 e dois multipletos entre 3,13 e 3,43 ppm correspondentes aos H-pirrolidina, o que confirma a formação do anel fundido pirrolidina resultante da reação 1,3-DC.

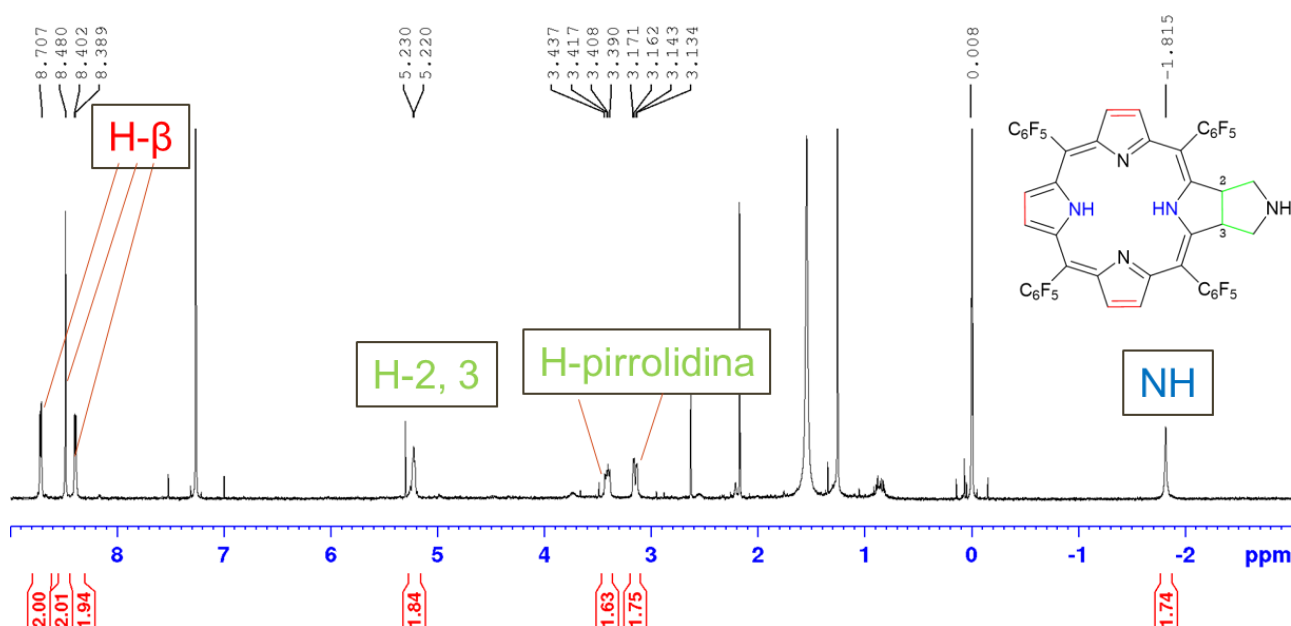


Figura 3.1 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da clorina **10**.

A clorina **10** também foi analisada por espectroscopia de UV/Vis e fluorescência, em clorofórmio (Figura 3.2). Os espectros mostram que a clorina **10** apresenta a banda Soret a 405 nm e, uma banda Q bastante intensa a 652 nm e que é característica dos macrociclos do tipo clorina. Foram também obtidos os valores das absorvidades molares para cada uma das bandas obtidas (Tabela 3.3). Relativamente à fluorescência, observa-se que a clorina **10** tem emissão máxima a 652 nm.

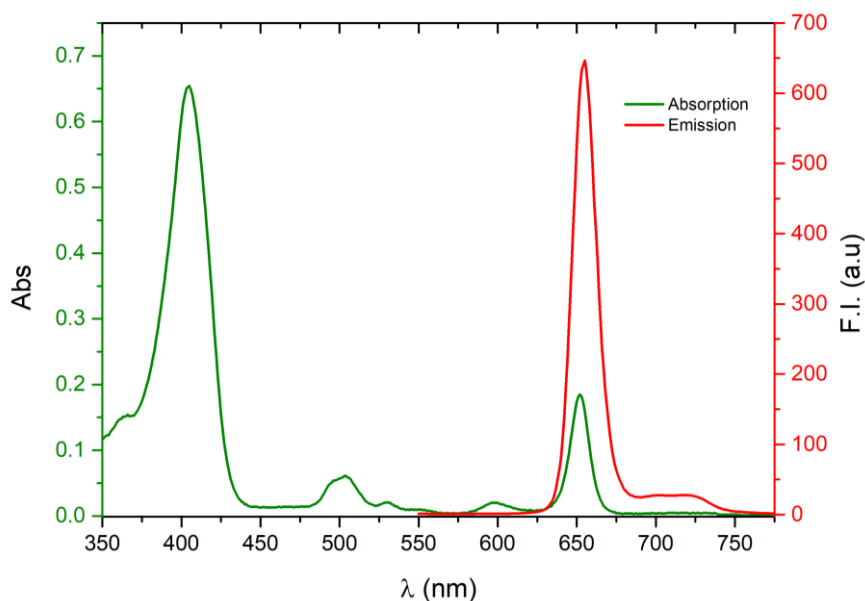


Figura 3.2 – Espectros de UV/Vis (verde) e de fluorescência (vermelho) da clorina **10**, em CHCl_3 .

Tabela 3.3 - Valores das absorvidades molares das bandas Soret e Q da clorina **10**, em CHCl_3 .

$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
405	154240
503	12283
530	4110,5
598	3869,2
652	38182

Uma vez obtida a clorina **10**, esta serviu como ponto de partida para a obtenção de clorina **12** contendo o grupo terminal amina (Esquema **3.3**). Para a obtenção da clorina **12**, começou-se por se realizar o acoplamento da clorina **10** à *N*-(2-bromoetil)ftalimida, obtendo-se a clorina **11**. No acoplamento da clorina **10** à *N*-(2-bromoetil)ftalimida, foram testadas duas metodologias:

- (i) Aquecimento convencional: a clorina **10** reagiu com a *N*-(2-bromoetil)ftalimida (em excesso) na presença de uma base (8 equivalentes), em acetonitrilo anidro (5 mL). Aqui estudou-se a variação de temperatura, tempo de reação, a base utilizada e o número de equivalentes de *N*-(2-bromoetil)ftalimida, tal como se encontra descrito na Tabela **3.4**. Os resultados obtidos revelam que as condições experimentais que permitem obter a clorina **11** com melhor rendimento são as descritas no ensaio 2. Após arrefecimento, a mistura reacional foi sujeita a extrações líquido-líquido com clorofórmio e água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura. O resíduo sólido obtido foi purificado por cromatografia

em placa, utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio/acetona (99:1), tendo sido possível isolar a clorina **11**, com um rendimento de 37%.

Tabela 3.4 - Condições experimentais para a síntese da clorina **11** por aquecimento convencional

Entrada	Clorina 10	N-(2-bromoetil)ftalimida		Base	Temperatura (°C)	Tempo de reação	Rendimento (%)
	Massa, g	Massa, g	Equivalentes	Equivalentes			
1	0,0326	0,0090	1,1	Na ₂ CO ₃ (8 eq.)	80	48 h	Não ocorreu
2	0,0436	0,0132	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq.)	55-70	5 dias	37%
3	0,0408	0,0115	1,1	Cs ₂ CO ₃ (8 eq.)	60-70	27 h	13%
4	0,0403	0,0508	5,0	K ₂ CO ₃ (8 eq.)	60-70	20 h	14%
5	0,0315	0,0403	5,1	K ₂ CO ₃ (8 eq.)	60-70	20 h	35%

- (ii) Aquecimento micro-ondas em regime monomodo: a síntese da clorina **11** também foi testada em aquecimento micro-ondas monomodo. Neste caso foram realizados vários ensaios, em que se estudou a variação da base e o seu número de equivalentes, solvente e o seu volume, bem como as condições de pressão, temperatura, potência e tempo de reação. Na Tabela **3.5**, encontram-se descritas todas as condições utilizadas. Os resultados obtidos revelam que as melhores condições experimentais para obter a clorina **11** são as descritas na entrada 10, em que a reação ocorre em dois ciclos de 30 minutos. Além da adição inicial da N-(2-bromoetil)ftalimida (1,2 equivalentes), foi feita, ao fim do primeiro ciclo reacional, uma segunda adição deste reagente, no mesmo número de equivalentes, passando-se, em seguida, para o segundo ciclo de reação. No fim da reação, a mistura reacional foi precipitada em água e gelo. Após remoção do sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em clorofórmio e desidratado com etanol absoluto, sendo os solventes, posteriormente, evaporados. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna, sendo o eluente uma mistura de clorofórmio/acetona (9:1), em que se obteve a clorina **11** com um rendimento de 77%.

Tabela 3.5 - Condições experimentais para a síntese da clorina **11** em aquecimento micro-ondas monomodo.

Entrada	Clorina 10	N-(2-bromoetil)ftalimida		Base	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Pressão (Psi)	Potência (W)	Rendimento (%)
	Massa, g	Massa, g	Eq.	Eq.	Volume, mL					
1	0,0580	0,0160	1,1	DIPEA (0,05 mL)	DMF (2 mL)	75	5	100	50	Não ocorreu
2	0,0403	0,0122	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	120	15	100	150	Não ocorreu
3	0,0403	0,0116	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	75	15	100	150	Não ocorreu
4	0,0403	0,0118	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	75	60	100	150	Não ocorreu

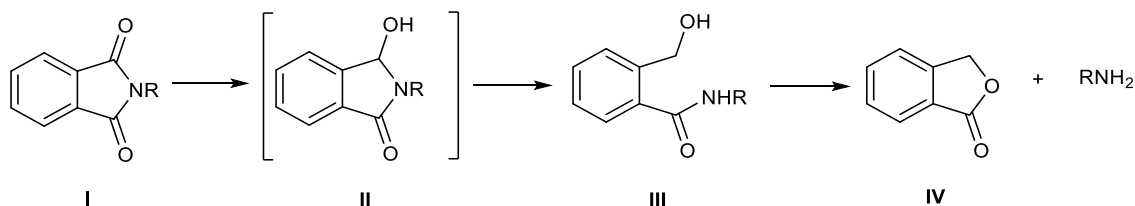
5	0,0403	0,0117	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	75	60	100	150	Não ocorreu
6	0,0410	0,0125	1,2	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	75	60	100	150	Não ocorreu
7	0,0410	0,0502	4,9	K ₂ CO ₃ (8 eq)	MeCN (5 mL)	75	60	100	150	Não ocorreu
8	0,0401	0,0126	1,3	K ₂ CO ₃ (2 eq)	DMF (1,5 mL)	75	3 x 5 min	50	50	14%
9	0,0401	0,0125	1,2	K ₂ CO ₃ (2 eq)	DMF (0,1 mL)	75	3 x 15 min	50	50	32%
10	0,1001	0,0302	1,2	K ₂ CO ₃ (2 eq)	DMF (0,15 mL)	75	2 x 30 min	50	50	77%
11	0,0806	0,0247	1,2	K ₂ CO ₃ (2 eq)	DMF (0,15 mL)	75	2 x 30 min	50	50	44%
12	0,0477	0,0153	1,3	K ₂ CO ₃ (2 eq)	DMF (0,15 mL)	75	2 x 30 min	50	50	55%

Os resultados demonstram que foi possível obter a clorina **11** pelos dois métodos anteriormente descritos. Optou-se pelo método descrito em (ii), usando o aquecimento micro-ondas, por este permitir obter o produto desejado com um rendimento mais elevado e com menor tempo de reação. Além disso, o seu tratamento é mais simples do que o método convencional.

Uma vez obtida a clorina **11**, procedeu-se à remoção do grupo ftalimida de modo a obter-se o grupo amina, dando origem à clorina **12**. Aqui foram testados dois métodos diferentes:

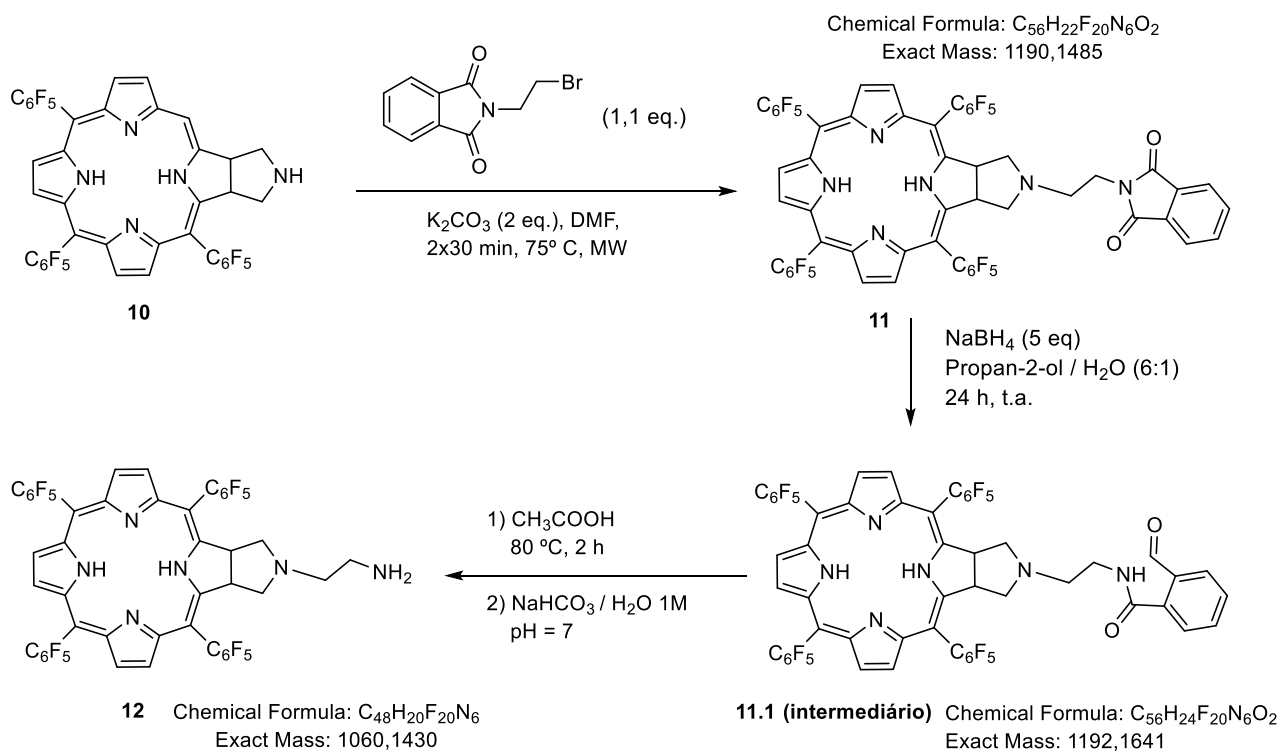
- (i) Método descrito por H. Kim e colaboradores:^[9] a clorina **11** foi dissolvida numa mistura de etanol/tolueno (2:1), à qual foi adicionada hidrazina mono-hidratada (16 equivalentes), à t.a., em atmosfera de azoto. De seguida, a reação foi refluxada (90°C) durante 2 horas. Terminada a reação, a mistura reacional foi arrefecida em gelo, o pH foi ajustado a 2, com uma solução aquosa de ácido clorídrico 12 M, ficando, posteriormente, em agitação durante 30 minutos. Findo este período de tempo, a mistura foi neutralizada a pH 7 com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M. Posteriormente a solução foi sujeita a três extrações líquido-líquido sucessivas com clorofórmio e água, sendo a fase orgânica lavada duas vezes com água e uma vez com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio. Concluídas as lavagens, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna, sendo a mistura clorofórmio/metanol (9:1) utilizada como eluente.
- (ii) Método descrito por Bruce Ganem e colaboradores:^[10] Este método consiste no tratamento de ftalimidas com boro-hidreto de sódio em 2-propanol, seguindo-se hidrólise em ácido acético. A estratégia seguida pelos autores envolve a redução da ftalimida (I) no intermediário o-hidroximetil benzamida (III), que posteriormente por tratamento em meio

ácido ou alcalino, é convertido na lactona (IV) com concomitante libertação da amina primária (Esquema 3.2).



Esquema 3.2 – Estratégia de desproteção do grupo ftalimida.

Tendo como base o método descrito por Bruce Ganem e colaboradores,^[10] realizou-se a redução de um dos grupos carbonilo do anel ftalimida com boro-hidreto de sódio, havendo abertura do anel, formando o intermediário **11.1** (Esquema 3.3). Por hidrólise ácida envolvendo o tratamento com ácido acético, e posterior neutralização com uma solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1M, foi possível obter a clorina **12**. No entanto, esta obteve-se em quantidades muito baixas, não sendo possível determinar o seu rendimento de síntese. Contudo, foi possível caracterizar esta clorina obtida por RMN de ^1H e ESI-MS, de modo a comprovar a sua formação. Também se verificou que havia, ainda, vestígios do intermediário **11.1**, tendo este sido também caracterizado por RMN de ^1H e por ESI-MS.



Esquema 3.3 – Estratégia de síntese da clorina **12** a partir da clorina **10**.

3.3. Caracterização estrutural da clorina 12

3.3.1. Caracterização por RMN de ^1H

O intermediário **11.1** isolado foi analisado por RMN de ^1H (Figura 3.3), tendo-se observado a presença de sinais indicativos da formação deste intermediário, como é o caso dos diversos sinais que surgem na região aromática, que incluem os prótons correspondentes ao anel ftalimida. No entanto, é necessário ressaltar que a amostra analisada se encontrava bastante diluída e com algumas impurezas, o que explica o facto do espectro apresentado na Figura 3.3 ter baixa resolução.

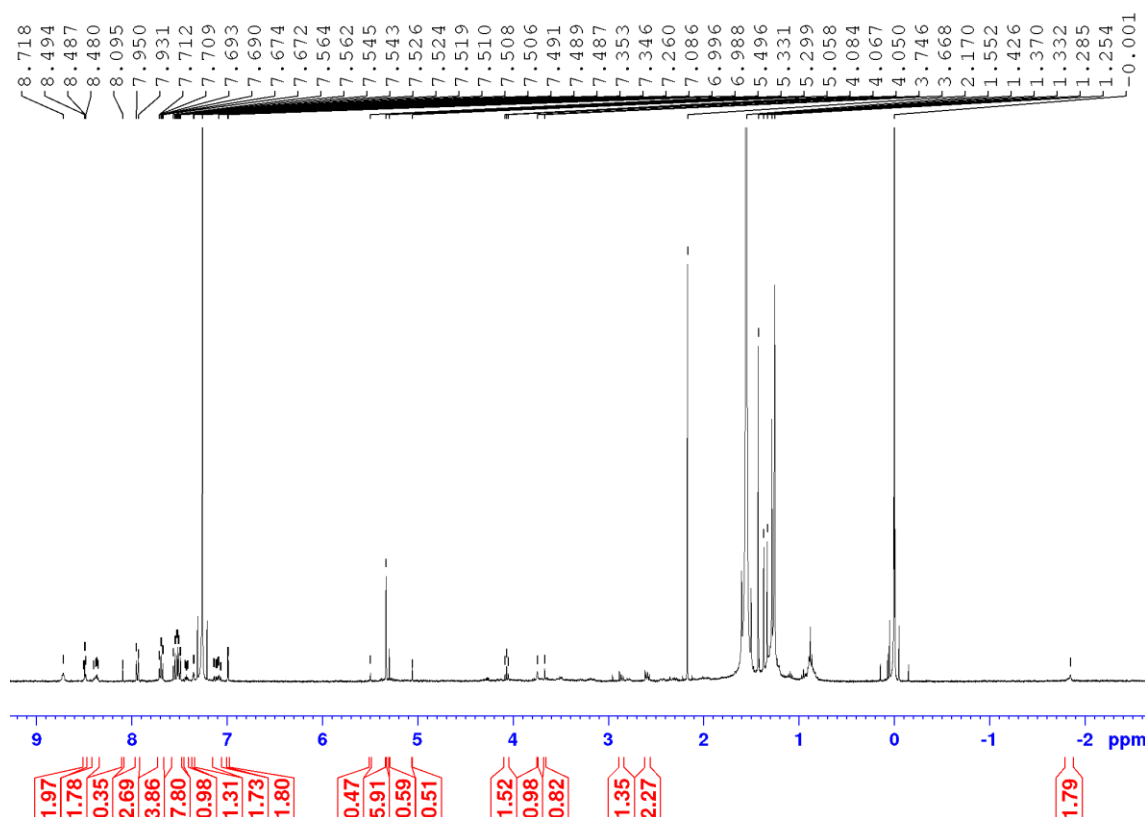


Figura 3.3 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do intermediário **11.1**.

A clorina **12** foi analisada por RMN de ^1H (Figura 3.4) a fim de se aferir o sucesso da sua síntese. O espectro obtido mostrou que a clorina **12** foi obtida, no entanto, também se observam algumas impurezas. Na região aromática observam-se os sinais a 8,00-9,00 ppm correspondentes aos prótons β -pirrólicos, sem alterações significativas relativamente à clorina **10**. Verifica-se a ausência dos sinais correspondentes aos prótons do anel ftalimida, o que é indicativo do sucesso da hidrólise, originando a clorina **12**. Na região alifática observam-se três multipletos a 2,54-2,59, 2,84-2,88 e 3,33-3,37 ppm correspondentes aos prótons do anel pirrolidina e aos da cadeia alquílica onde se encontra o grupo amina.

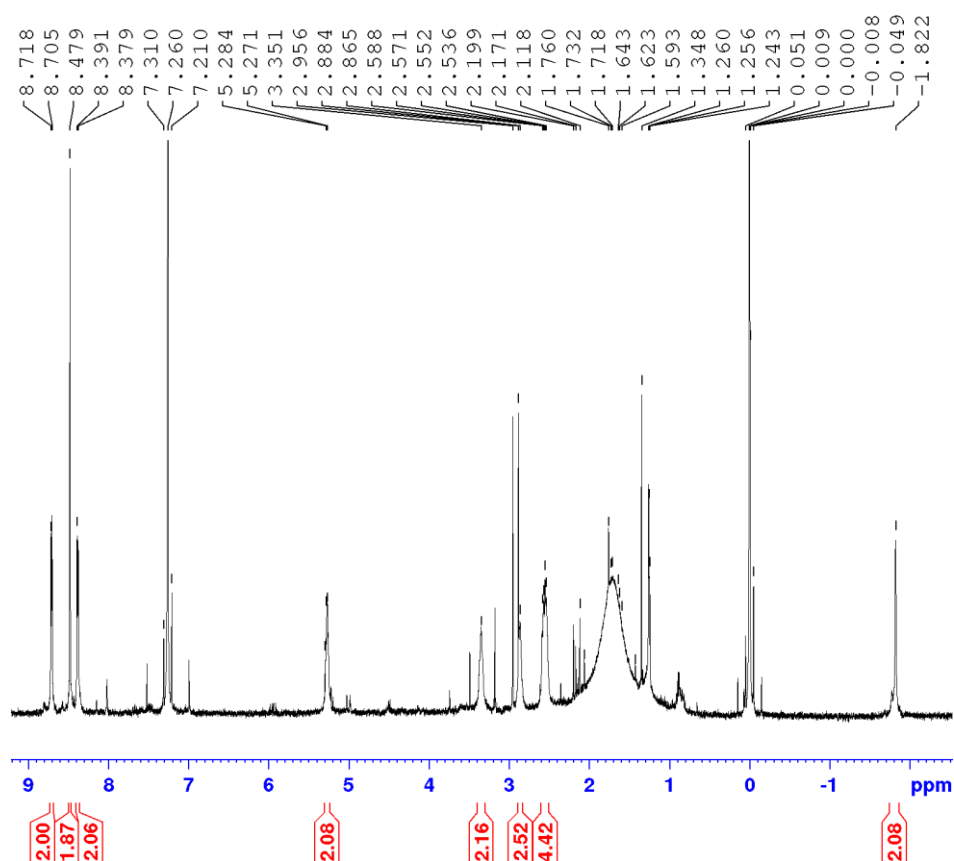


Figura 3.4 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) da clorina **12**.

3.3.2. Caracterização por ESI-MS

O intermediário **11.1** e a clorina **12** foram analisados por ESI-MS (Figuras 3.5 e 3.6). No caso do intermediário **11.1**, observou-se o sinal a m/z de 1193,1737 (valor teórico 1193,1714), o que confirma a sua presença.

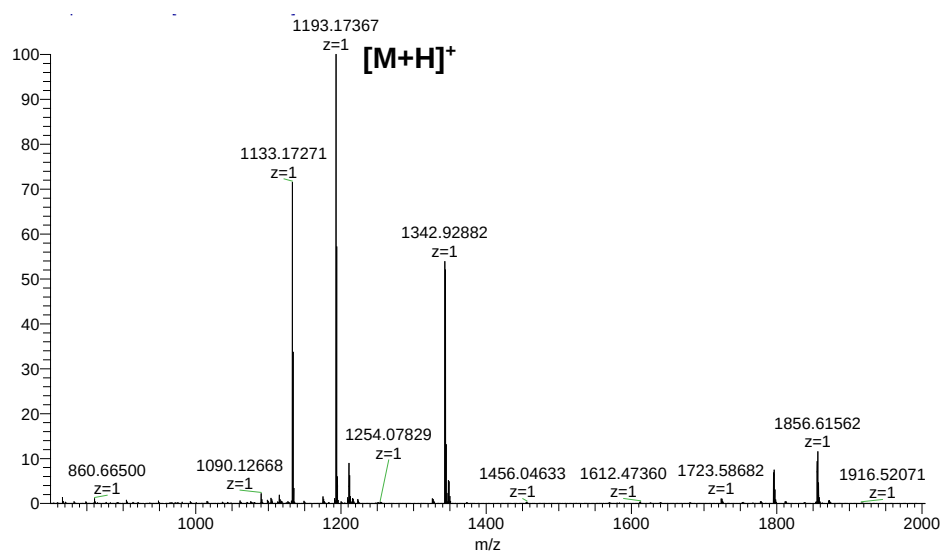


Figura 3.5 - Espectro de ESI-MS (positivo) do intermediário **11.1**.

Relativamente à clorina **12**, observou-se o sinal a m/z de 1061,1508 correspondente ao ião quasi-molecular $[M+H]^+$ (valor teórico 1061,1503), o que também confirma a presença da clorina desejada.

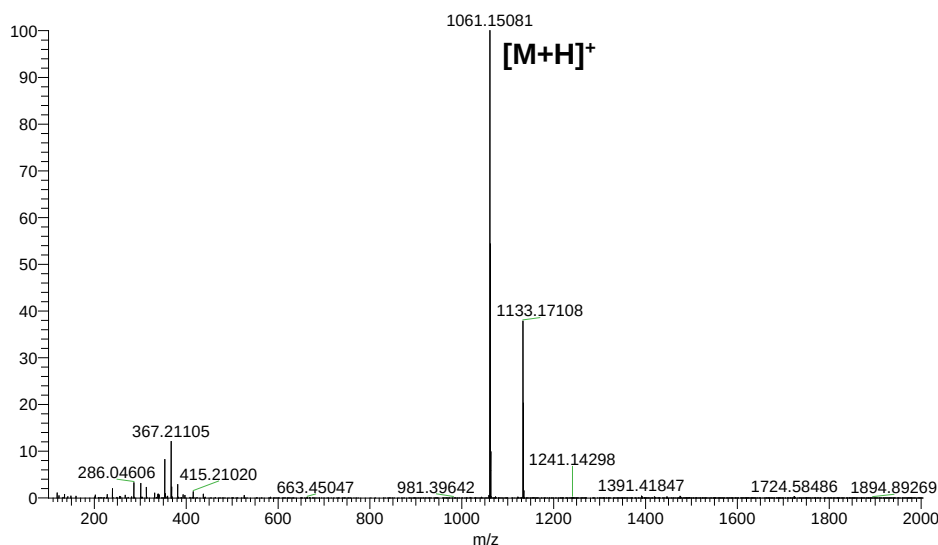


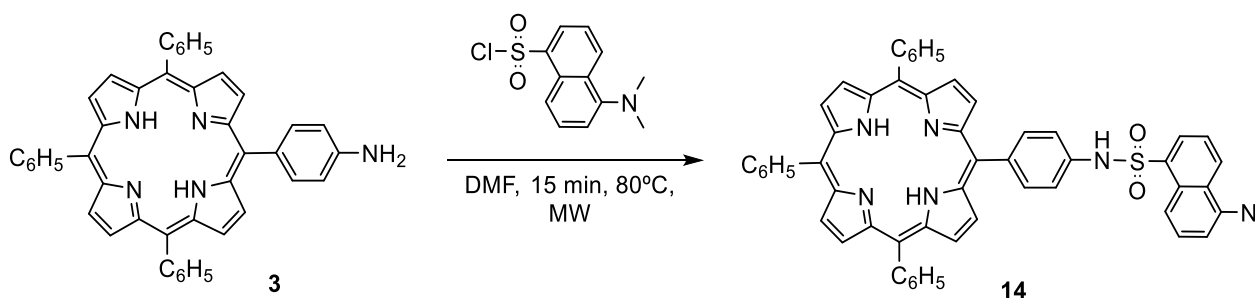
Figura 3.6 - Espectro de ESI-MS (positivo) da clorina **12**.

3.4. Reação de macrociclos porfirínicos com cloreto de dansilo

No sentido de sintetizar potenciais PSs com propriedades fotofísicas melhoradas e atividade antitumoral acrescida, decidiu-se ligar os macrociclos porfirínicos ao fluoróforo dansilo, através da formação da ligação sulfonamida. De salientar que as sulfonamidas constituem um grupo de compostos de elevado interesse farmacológico, uma vez que geralmente apresentam vários efeitos fisiológicos, entre estes, a inibição do crescimento celular.^[11] Algumas sulfonamidas apresentam a capacidade de inibirem seletivamente a proliferação, bloqueando o ciclo celular, o que causa a apoptose em células humanas cancerígenas sem afetar as células saudáveis.^[12] Por outro lado, o cloreto de dansilo apresenta propriedades de fluorescência interessantes como forte fluorescência na região do visível e com elevados rendimentos quânticos^[13, 14], o que o torna um bom fluoróforo para aplicações biológicas (ex.: PDT). Assim, espera-se que a combinação de PSs porfirínicos com o cloreto de dansilo venha a produzir derivados com propriedades melhoradas para a aplicação na fototerapia e fotodiagnóstico do cancro.

3.4.1. Reação de porfirina **3** com cloreto de dansilo

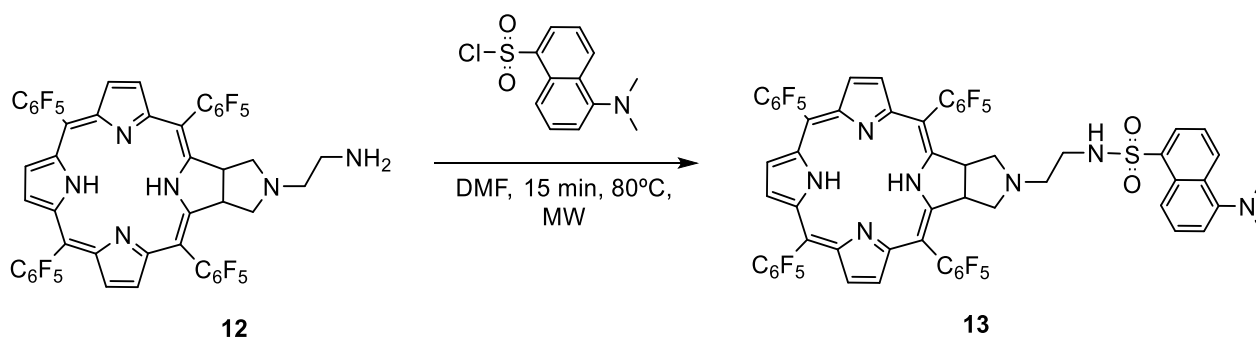
A reação de porfirina **3** com o cloreto de dansilo foi realizada com recurso ao aquecimento por MW, usando DMF como solvente e no mínimo volume possível (Esquema **3.4**). Nestas condições foi possível obter o derivado **14**, com um rendimento de 8%, tratando-se, portanto, de um rendimento de síntese baixo. Ao mesmo tempo recuperou-se muita porfirina **3** por reagir e verificou-se a formação de produtos secundários em quantidade apreciável.



Esquema 3.4 - Síntese do derivado **14** a partir da porfirina **3** com o cloreto de dansilo.

3.4.2. Reação de clorina 12 com cloreto de dansilo

Aqui, o objetivo pretendido foi realizar a reação entre a clorina **12** e o cloreto de dansilo com recurso à síntese assistida por micro-ondas (Esquema **3.5**). Foi possível obter o derivado **13**, no entanto, este foi obtido em quantidade muito baixa, pelo que não foi possível determinar o seu rendimento de síntese. Ainda assim, com a quantidade de composto obtida foi possível fazer a sua caracterização estrutural por espectroscopia de RMN de ^1H .



Esquema 3.5 - Síntese do derivado **13** a partir da clorina **12** com o cloreto de dansilo.

3.5. Caracterização estrutural dos derivados obtidos

3.5.1. Caracterização por RMN

A análise estrutural do derivado **14** foi realizada por RMN de ^1H , com o objetivo de verificar o sucesso da sua síntese (Figura **3.7**). O espectro obtido mostrou, na região aromática (Figura **3.7a**) a existência de mais sinais comparativamente com o espectro da porfirina **3**, o que indica a presença de novos anéis aromáticos na estrutura do produto obtido. Além disso, na região alifática (Figura **3.7b1**), verifica-se o sinal a 2,92 ppm, correspondente a seis prótons, que deverão corresponder à ressonância dos prótons dos dois grupos metilo do fluoróforo dansilo.

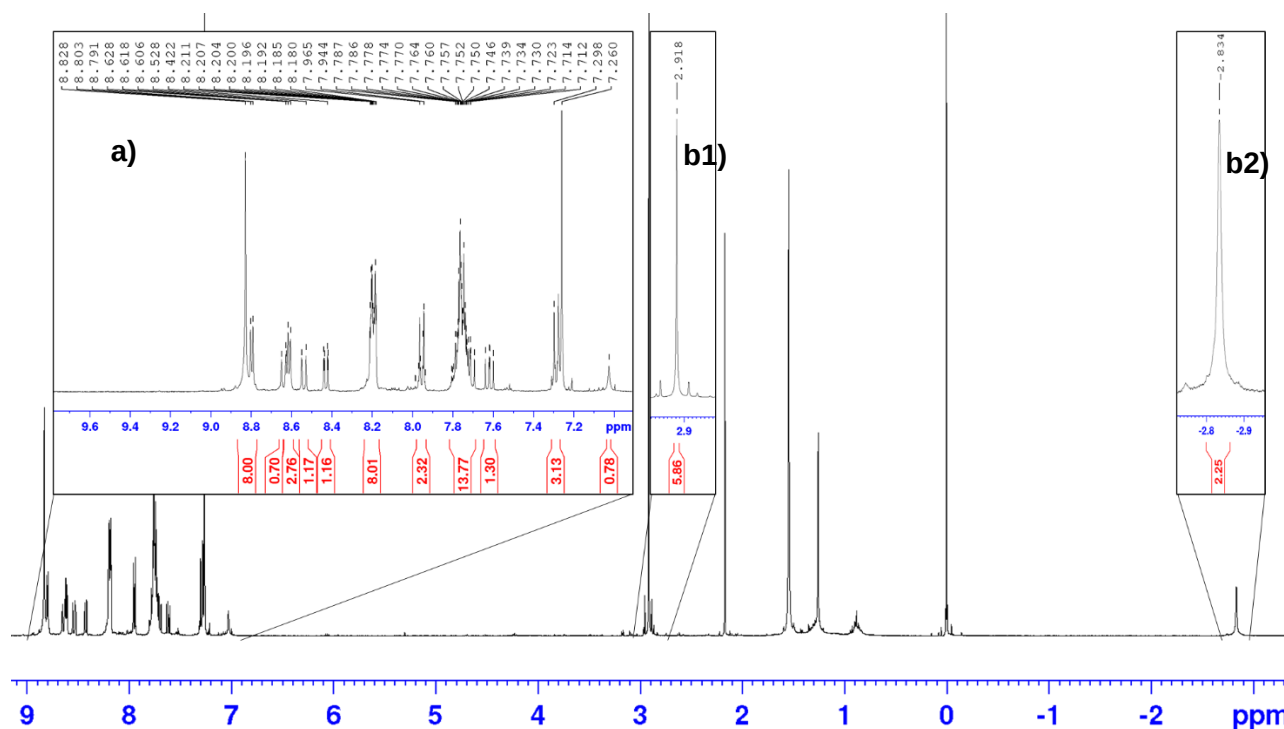


Figura 3.7 - Espectro de RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) do derivado **14**, com ampliação nas regiões aromática (a) e alifática (b1 e b2).

O derivado **13** também foi analisado por espectroscopia de RMN de ^1H . Atendendo ao facto de este derivado ter sido obtido em quantidade muito reduzida, o espectro obtido evidenciou baixa resolução, uma vez que a amostra analisada se encontrava muito diluída. Apesar disso, o espectro mostrou na região aromática, além dos sinais correspondentes aos prótons β -pirrólicos, outros sinais o que pode ser indicativo da ligação da amina terminal da clorina **12** ao cloreto de dansilo. Como trabalho futuro, vai ser necessário repetir a síntese de **13**, de forma a obter o produto desejado em quantidade apropriada para a realização da caracterização estrutural e estudos fotofísicos.

3.5.2. Caracterização por ESI-MS

O derivado **14** foi analisado por ESI-MS. Verificou-se a presença do ião quasi-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ do composto analisado a m/z de 863,3198. No caso do método de ionização negativo, observou-se que o pico base apresenta um valor de m/z de 861,3003. Tendo em consideração que o valor esperado de m/z seria de 862,3090, pode-se concluir que o derivado **14** foi obtido com sucesso.

3.5.3. Caracterização por UV/Vis e fluorescência

O derivado **14** foi caracterizado em termos de propriedades fotofísicas (absorção e emissão), tendo-se usado como solvente a DMF. Quanto ao estudo por UV/Vis (Figura **3.8**), determinaram-se os comprimentos de onda de absorção bem como os respetivos valores de absortividade molar (Tabela **3.6**). A análise dos resultados obtidos, mostra que a banda Soret surge a 417 nm e quatro bandas Q surgem a 514, 551, 591 e 647 nm, tratando-se, portanto, do perfil espectral esperado para porfirinas livre de metal.

Relativamente ao estudo por fluorescência (Figura **3.8**), verifica-se que este composto apresenta intensidade máxima a 652 nm, havendo também outra banda a 717 nm. Comparativamente à porfirina **3**, cujo comprimento de onda de intensidade máxima de fluorescência é de 635 nm, verifica-se que há um desvio desse valor para os 652 e 717 nm. Estes resultados sugerem que há uma melhoria significativa em termos de propriedades de absorção e emissão do conjugado **14**, pois o valor de comprimento de onda de intensidade máxima de absorção obtido já se encontra situado na janela fototerapêutica (650-850 nm). De futuro pretende-se realizar mais estudos de absorção e emissão, incluindo em diferentes solventes orgânicos, tendo em vista estudar a influência da combinação das duas moléculas (porfirina e dansilo) nas propriedades fotofísicas no conjugado obtido.

Tabela 3.6 - Valores das absortividades molares das bandas Soret e Q do derivado **14** em DMF.

λ (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
417	86242
514	3459,4
551	1722,4
591	1153,6
647	950,46

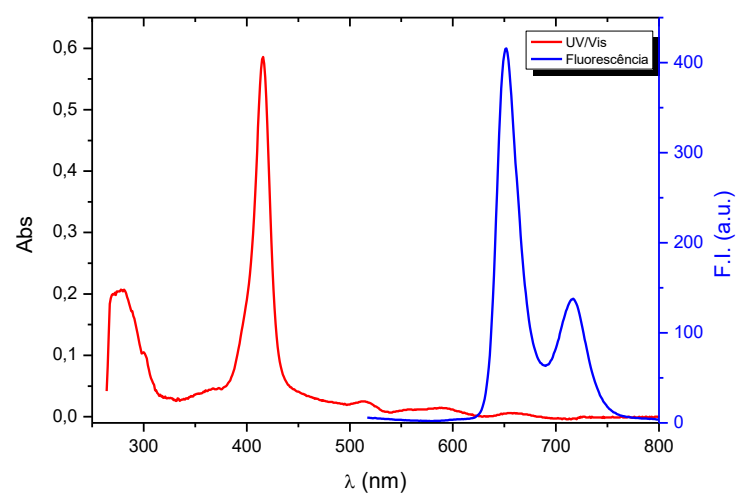


Figura 3.8 - Espectros de UV/Vis (vermelho) e de fluorescência (azul) do derivado **14**, em DMF.

3.6. Referências

1. Formica, M.; *et al.*, *New fluorescent chemosensors for metal ions in solution*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(1-2): p. 170-192.
2. Serra, V.I.V.; *et al.*, *Meso-tetraarylporphyrins bearing nitro or amino groups: synthetic strategies and reactivity profiles*. Topics in Heterocyclic Chemistry, 2014. **33**: p. 35-78.
3. Silva, A.M.G.; *et al.*, *1,3-Dipolar cycloaddition reactions of porphyrins with azomethine ylides*. Journal of Organic Chemistry, 2005. **70**(6): p. 2306-2314.
4. Silva, A.M.G.; *et al.*, *Porphyrins in 1,3-dipolar cycloaddition reactions with sugar nitrones. Synthesis of glycoconjugated isoxazolidine-fused chlorins and bacteriochlorins*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**: p. 603-605.
5. Almeida, J.; *et al.*, *1,3-Dipolar cycloadditions with meso-tetraarylchlorins – site selectivity and mixed bisadducts*. Organic Chemistry Frontiers, 2017. **4**(4): p. 534-544.
6. Gonzales, J.; *et al.*, *One-Pot Synthesis of Four Chlorin Derivatives by a Divergent Ylide*. Journal of Organic Chemistry, 2018. **83**(12): p. 6307-6314.
7. CEM. *MARS™ 6 Synthesis*. [citado 2019 16-09-2019]; Disponível em: <http://cem.com/en/mars-6-synthesis>.
8. Paar, A., *Which microwave synthesis reactor is the best one for your research?* [citado 2019 16-09-2019]; Disponível em: <https://wiki.anton-paar.com/en/which-microwave-synthesis-reactor-is-the-best-one-for-your-research/#monomode-microwave-reactors>.
9. Kim, H.; *et al.*, *Total Synthesis of Amino-Functionalized Calphostin Analogs as Potent and Selective Inhibitors of Protein Kinase C (PKC)*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2016. **37**(10): p. 1586-1592.
10. Osby, J.O.; Martin, M.G. e Ganem, B., *An exceptionally and deprotection of phthalimides*. Tetrahedron Letters, 1984. **25**(20): p. 2093-2096.
11. Takagi, M.; *et al.*, *In vivo antitumor activity of a novel sulfonamide, HNM-214, against human tumor xenografts in mice and the spectrum of cytotoxicity of its active metabolite, HMN-176*. Investigational New Drugs, 2003. **21**: p. 387-399.
12. Khanusiya, M. e Gadhawala, Z., *Chalcones-Sulphonamide Hybrids: Synthesis, Characterization and Anticancer Evaluation*. Journal of the Korean Chemical Society-Daehan Hwahak Hoe Jee, 2019. **63**(2): p. 85-93.
13. Gorur, M.; *et al.*, *Synthesis, characterization, and Pb²⁺ ion sensing application of hexa-armed dansyl end-capped poly(ϵ -caprolactone) star polymer with phosphazene core*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. **132**(32): p. 42380-42387.
14. Uygun, M.; *et al.*, *One-pot photoinduced synthesis of dansyl containing acrylamide hydrogels and their chemosensing properties*. Journal of Applied Polymer Science, 2019. **136**(8): p. 47096-47104.

Capítulo 4 - Conclusão e Perspetivas de Futuro

A presente dissertação teve como objetivo a síntese de novos (bio)conjugados porfirínicos, no sentido de melhorar as propriedades farmacocinéticas, solubilidade e especificidade destes potenciais PSs para os tecidos cancerígenos.

Para tal foi estudada a reação de Cu(I)AAC, um exemplo de reação de “click-chemistry”, (**Capítulo 2**) que envolveu o uso do precursor porfirínico ligado ao grupo azida (**5**) e dos dipolarófilos fenilacetileno e propiolato de metilo, com obtenção dos conjugados **6** e **7** com rendimentos de 84% e 70%, respetivamente. Posteriormente estendeu-se esse método à preparação de um conjugado porfirina-péptido (conjugado **8**) a partir de um péptido aniónico com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. O estudo das propriedades de absorção e emissão dos conjugados obtidos revelou que os conjugados **6** e **7** apresentam valores de emissão idênticos entre 607 e 659 nm e um rendimento quântico de 3,0-3,3%, valores que também são semelhantes aos obtidos para a porfirina precursora **5**. Os resultados revelam ainda que os comprimentos de onda de emissão e rendimento quântico destes conjugados são inferiores aos da porfirina precursora livre de metal (**4**), que apresenta um rendimento quântico de 8,6%. Verifica-se que os rendimentos quânticos da porfirina **5** e dos conjugados **6** e **7** apresentam piores valores relativamente ao da porfirina **4**. Em suma, os resultados sugerem que os conjugados sintetizados **6**, **7** e **8** possuem propriedades adequadas para uma potencial aplicação como PSs em PDT, sendo, no entanto, necessário a realização de estudos complementares (ex.: determinação de oxigénio singuleto) para melhor poder aferir a sua futura aplicação em PDT.

Relativamente ao **Capítulo 3**, o objetivo foi sintetizar novos derivados porfirínicos através da reação de condensação entre os macrociclos porfirina/clorina funcionalizados com o grupo amina e o fluoróforo cloreto de dansilo, antecipando a obtenção de PSs com propriedades farmacocinéticas e fotofísicas melhoradas. Tendo em vista este objetivo, preparou-se a clorina **10** via reação de 1,3-DC envolvendo a reação de *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina e o ileto de azometino gerado a partir de glicina e paraformaldeído. A clorina **10** foi estudada por espectroscopia de UV/Vis e fluorescência, verificando-se que possui uma banda Q de forte intensidade a 652 nm, o que a torna um potencial candidato a PS para aplicação em PDT. A partir do acoplamento da clorina **10** à *N*-(2-bromoetil)ftalimida, foi possível obter a clorina **11** com um rendimento de 77%, verificando-se que o melhor método para a sua obtenção é o de síntese assistida por aquecimento em micro-ondas, no qual se recorre a 1,2 equivalentes de *N*-(2-bromoetil)ftalimida, 2 equivalentes de carbonato de potássio, à temperatura de 75°C, com dois ciclos de aquecimento de 30 minutos, cada um. Posteriormente, a desproteção da ftalimida para obtenção da clorina **12** envolveu duas fases: i) redução do grupo carbonilo do anel ftalimida, com abertura do anel e ii) hidrólise em ácido acético. No entanto, não foi possível obter este composto em quantidade apreciável para se calcular o rendimento de síntese. Apesar da baixa quantidade que se obteve de clorina **12**, procedeu-se ao

seu acoplamento com o cloreto de dansilo, recorrendo à síntese assistida por micro-ondas. Análise realizada por RMN de ^1H sugere que ocorreu formação do conjugado desejado (conjugado **13**), no entanto também se obtiveram outros produtos secundários.

Foi testado o acoplamento com o cloreto de dansilo com a clorina **12** e a porfirina **3**, ambos realizados através de síntese por aquecimento por micro-ondas. No caso do conjugado **13**, este foi obtido numa quantidade muito reduzida, com a formação de produtos secundários. Já o conjugado **14** foi obtido com rendimento de 8%, ocorrendo também a obtenção de produtos secundários em quantidade apreciável. Ainda assim, foi possível estudá-lo por UV/Vis e fluorescência, verificando-se que apresenta emissão máxima a 652 e 717 nm. Estes resultados obtidos são muito positivos e encorajadores tendo em vista a potencial aplicação destes derivados em PDT.

Comparando com os PSs já existentes (Tabela **1.1**, do **Capítulo 1**), em termos de valores de absorção máxima, os conjugados **6** e **7** (599 nm) apresentam valores de comprimento de onda máximo semelhantes ao Photofrin[®] (630 nm). Já o conjugado **13** (647 nm) é comparável com o Foscan[®] (652 nm) e o Radachlorin[®] (662-664 nm). A clorina **10** (652 nm) apresenta um valor de comprimento de onda de absorção máxima igual ao do Foscan[®]. O facto dos compostos aqui sintetizados apresentarem valores de comprimentos de onda máximo próximos ou iguais aos valores obtidos para os PSs já existentes, indica que estes conjugados poderão ser candidatos a eventual uso como PSs.

Em trabalhos futuros, o conjugado **8** terá que ser purificado e caracterizado quer a nível estrutural quer a nível de propriedades fotofísicas, a fim de verificar a sua viabilidade como potencial PS. A síntese da clorina **12** e dos conjugados **13** e **14** terá que ser novamente abordada de forma a tornar as reações mais seletivas, evitando ou reduzindo a formação de produtos não desejados, aumentando, assim, os respetivos rendimentos de síntese. Quando tal for possível, estes compostos poderão ser alvo de estudos de propriedades fotofísicas. Os restantes compostos, que foram obtidos com sucesso, assim como os referidos neste parágrafo, poderão também ser estudados a nível de geração de oxigénio singuleto, sendo esta uma propriedade com enorme importância para um bom PS.

Capítulo 5 - Parte Experimental

5.1. Reagentes, solventes e equipamento

Na realização do trabalho apresentado, os reagentes comerciais foram adquiridos à Sigma-Aldrich, sem nenhuma ação de purificação prévia. Nas pesagens, foram utilizadas as balanças: analítica Metler AT 201 (2×10^{-5} g) e semi-analítica Metler (2×10^{-4} g).

Conforme já foi referido, nas reações de síntese recorreu-se ao aquecimento convencional ou aquecimento por de micro-ondas. Relativamente ao aquecimento convencional, foram utilizadas placas de aquecimento Corning com sensor de temperatura, modelo Cat. 6795PR, enquanto que no aquecimento por micro-ondas foi utilizado um reator de modelo CEM Discover SP-X, com 300 W de potência máxima e sistema de refrigeração através de ar comprimido. Também se recorreu a testes de síntese no reator multimodo MARS 6, com 1800 W de potência máxima, com sistema de refrigeração e sensor de temperatura de fibra ótica, tendo-se utilizado os vasos GalssChem em pyrex com capacidade máxima de 20 mL, temperatura máxima de 180°C e pressão máxima de controlo de 200 Psi.

Para seguir a evolução das reações, recorreu-se à cromatografia em camada fina, em folhas de sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck. Na separação de compostos provenientes das diversas misturas reacionais, recorreu-se à cromatografia em coluna, com sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) da Merck. Em alguns compostos recorreu-se à separação por cromatografia em camada fina preparativa em placas de vidro (20x20 cm), sendo estas revestidas com uma camada de sílica gel 60 G, da Merck, com cerca de 0,5 mm de espessura e secas na estufa a 100°C, durante 12 horas.

Na medição de absorvâncias dos produtos obtidos, recorreu-se a um espectrofotómetro de UV/Vis de feixe duplo, Shimadzu UV-3600, e a uma célula com o passo de ótica de 1 cm. Quanto aos espectros de fluorescência, estes foram obtidos num fluorímetro Varian Cary Eclipse. Os rendimentos quânticos de fotoluminescência absoluta foram obtidos no espectrofotómetro Quantauros QY C1347-11 (Hamamatsu) equipado com uma esfera integradora de modo a medir o fluxo luminoso na totalidade.

Os espectros de RMN foram adquiridos no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), através de um aparelho Bruker Avance III 400, operando à frequência de 400,14 MHz para ^1H e a 100,63 MHz para ^{13}C . Os desvios químicos (δ) foram medidos em ppm, as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hz. O padrão interno utilizado foi o TMS.

Os espectros de massa por ionização de eletrospray (ESI-MS) também foram obtidos no CEMUP, com recurso a um espectrómetro de massa Thermo Scientific LTQ-Orbitrap XL, externamente calibrado com um kit padrão fornecido pelo fabricante. O espectrómetro operou no modo de ionização positiva ajustando a tensão capilar a 3,1 kV, sendo a temperatura do capilar de transferência de iões de 275°C. Os espectros foram registados para valores de m/z entre 400 e 3500.

Na síntese do conjugado **8** (Porfirina **5** + péptido **PepNeg**), o produto obtido foi purificado por diálise, na qual se recorreu a uma membrana da marca Spectra/Por®, modelo Standard RC, com uma largura plana nominal de 18 mm, diâmetro de 11,5 mm, fluxo de 1,1 ml cm⁻¹, com um comprimento de 1 m, tendo um corte de peso molecular (MWCO) de 1 kDa, podendo ser utilizada no intervalo de pH de 2 a 12.

5.2. Síntese de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (1)

Esta porfirina foi sintetizada de acordo com um método já publicado^[1]: a uma mistura de ácido acético glacial (300 mL) e nitrobenzeno (150 mL) em refluxo, foi adicionado benzaldeído (8,6 mL; 84,6 mmol) e pirrole (6,0 mL; 86,5 mmol), gota a gota. A reação ocorreu durante 45 minutos, à temperatura de 120°C, com agitação contínua. Após o arrefecimento, foi adicionado metanol à mistura reacional. De seguida, filtrou-se a solução com a porfirina através de um funil de vidro com filtro de algodão. Dissolveu-se o sólido obtido em diclorometano e recristalizou-se numa mistura de diclorometano/metanol. Foram obtidos 1,60 g (rendimento de 3%) de porfirina **1**.

Porfirina 1: RMN de ¹H (400,14 MHz, CDCl₃) δ: -2,77 (s, 2H, NH); 7,72-7,78 (m, 12H, H_{meta+para}-Ph); 8,22 (dd; J = 6,0 e J = 1,8 Hz, 8H, H_{orto}-Ph); 8,84 (s, 8H, H-β).

5.3. Síntese da 5-(4-nitrofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (2)

A síntese desta porfirina foi realizada de acordo com um método já publicado:^[2] Uma mistura contendo TFA (80 mL), porfirina **1** (1,60 g; 2,61 mmol) e nitrito de sódio (0,32 g; 4,66 mmol) foi deixada a agitar, à temperatura ambiente, durante 3 minutos. Ao fim desse tempo de reação, a mistura reacional foi diluída com água (80 mL) e extraída com diclorometano (160 mL). De seguida, a fase orgânica foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio, sendo, posteriormente, lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl. Por fim, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, seguindo-se filtração, evaporação do diclorometano no evaporador rotativo. A porfirina **2** foi cristalizada em diclorometano/metanol, tendo-se obtido 1,49 g deste composto (rendimento de 87%).

5.4. Síntese da 5-(4-aminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (3)

Uma mistura de porfirina **2** (0,15 g; 0,22 mmol), ciclo-hexeno (470 µL; 4,64 mmol) e DMF anidra (5 mL) foi colocada num vaso de 30 mL. A esta mistura foi adicionada uma quantidade catalítica de Pd/C 10%, sob atmosfera de N₂. O vaso reacional foi fechado e a mistura reacional foi sujeita a aquecimento por micro-ondas com uma rampa de aquecimento de 1 minuto até ser atingida a temperatura de 130 °C, mantendo-se esta durante 20 minutos, com uma potência máxima de 80 W,

com agitação média. A mistura reacional foi filtrada, lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl e extraída com acetato de etilo. Após secagem com sulfato de sódio anidro e filtração, a fase orgânica foi evaporada e purificada por cromatografia em coluna, eluindo primeiro com clorofórmio a porfirina **1** (11,6 mg, 6% recuperada) e depois com uma mistura de clorofórmio/acetona (9:1) a porfirina **3** (68,5 mg; 32% de rendimento a partir da porfirina **1**).

Porfirina 3: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -2,70 (s, 2H, NH); 4,04 (s, 2H, NH_2); 7,08 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- $\text{H}_{\text{meta-Ar}}$); 7,75-7,83 (m, 9H, 10,15,20 $\text{H}_{\text{meta+para-Ph}}$); 8,03 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- $\text{H}_{\text{ortho-Ar}}$); 8,24-8,26 (m, 6H, 10,15,20- $\text{H}_{\text{ortho-Ph}}$); 8,866-8,872 (m, 6H, H- β); 8,97 (d, 2H, $J = 4,4$ Hz, H- β).

MS (ESI): m/z 630,264 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_5^+$ 630,265.

5.5. Síntese da porfirina (4)

Uma mistura de porfirina **3** (56,1 mg; 0,0892 mmol), ácido 5-azidopentanóico (em teoria seriam utilizados 1,95 equivalentes, mas não sendo possível medir o volume a utilizar, adicionaram-se duas gotas deste reagente à mistura reacional), EDC (37,8 mg; 0,198 mmol), HOBT (25,8 mg; 0,191 mmol), DIPEA (0,1 mL; 0,553 mmol) e DMF anidra (0,95 mL) foi colocada num vaso de 10 mL. Este foi fechado, sendo a mistura reacional sujeita a aquecimento por micro-ondas, a 75°C, durante 20 minutos, com a potência máxima de 100 W, com agitação média. De seguida, verteu-se a mistura para um gobelé com gelo. Após a precipitação do conteúdo da mistura, esta foi filtrada e o precipitado foi redissolvido em clorofórmio, seco com etanol absoluto (99,8%) e evaporado, obtendo-se um resíduo seco. Este último foi purificado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de clorofórmio/acetato de etilo (98:2), eluindo primeiro a porfirina **3** (1,0 mg; 2% recuperada) e depois a porfirina **4** (49,0 mg; 73% de rendimento).

Porfirina 4: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -2,77 (s, 2H, NH); 1,83 (quinteto, 2H, $J = 7,0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 1,98 (quinteto, 2H, $J = 7,0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 2,59 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{N}_3$); 3,44 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, $-\text{COCH}_2-$); 7,73-7,80 (m, 9H, 10,15,20- $\text{H}_{\text{meta+para-Ph}}$); 7,91 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- $\text{H}_{\text{meta-Ph}}$); 8,18 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- $\text{H}_{\text{orto-Ph}}$); 8,20-8,23 (m, 6H, 10,15,20- $\text{H}_{\text{orto-Ph}}$); 8,84-8,87 (m, 8H, H- β); **UV/Vis (DMF)** $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}]$): 418 (347); 515 (11,1); 551 (6,32); 592 (3,51); 648 (3,36); **Fluorescência (DMF)** $\lambda_{\text{máx}}$, nm: 652; 717; $\phi_F = 0,086$.

5.6. Metalação de porfirina 4 com Zn(II) – Síntese da metaloporfirina (5)

Uma mistura de porfirina **4** (0,0490 g; 0,0649 mmol) e de acetato de zinco (0,1425 g; 0,649 mmol) e acetonitrilo (22 mL) foi colocada num vaso de 30 mL. Este foi fechado, sendo a mistura sujeita a aquecimento por micro-ondas, a 120°C, durante 1 minuto, à potência máxima de 100 W, com agitação média. A mistura reacional foi extraída com acetato de etilo e água. De seguida, a fase

orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura, tendo-se obtido a porfirina **5** com um rendimento quantitativo.

Porfirina 5: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : 1,77 (quinteto, 2H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 1,91 (quinteto, 2H, $J = 7,2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$); 2,52 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-\text{CH}_2\text{N}_3$); 3,38 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-\text{COCH}_2-$); 7,72-7,78 (m, 9H, 10,15,20- $\text{H}_{\text{meta+para}}$ -Ph); 7,86 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 5- H_{meta} -Ph); 8,17 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 5- H_{orto} -Ph); 8,21-8,23 (m, 6H, 10,15,20- H_{orto} -Ph); 8,93-8,97 (m, 8H, H- β); **UV/Vis (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$):** 426 (294,7); 517 (1,82); 521 (1,91); **Fluorescência (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm:** 606; 658; $\phi_F = 0,031$.

5.7. Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e fenilacetileno (6)

A síntese do conjugado entre a porfirina **5** teve por base um método já publicado ^[3]: num balão de fundo redondo de 25 mL, dissolveram-se em DMSO anidro (3 mL) a porfirina **5** (0,0385 g; 0,0471 mmol), ascorbato de sódio (0,0321 g; 0,162 mmol), sulfato de cobre penta-hidratado (0,0116 g; 0,0465 mmol) e fenilacetileno (9,2 μL ; 0,0839 mmol). A reação ocorreu sob atmosfera de azoto (N_2), à temperatura ambiente, durante 1 hora, com agitação contínua e ao abrigo da luz. A mistura reacional foi diluída com acetato de etilo (100 mL) e lavada com solução aquosa saturada de NaCl (100 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x150 mL). O conjunto de fases orgânicas foi lavado com uma solução aquosa saturada de NaCl (4x100 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, seguindo-se a sua filtração. De seguida, o crude foi evaporado até à secura. Após esta etapa, o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: diclorometano/metanol (95:5)), em que se isolou o produto desejado (conjugado **6**) com cor púrpura (0,0364 g, 84% de rendimento).

Conjugado 6: RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) δ : 1,86-1,93 (m, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$); 2,14-2,22 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$); 2,64 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-\text{COCH}_2-$); 4,60 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-\text{CH}_2\text{N}-$); 7,34 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz; H-Ph); 7,44 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz; H-Ph); 7,73-7,78 (m, 9H, 10,15,20- $\text{H}_{\text{meta+para}}$ -Ph); 7,86 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-Ph); 7,95 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- H_{meta} -Ph); 8,14 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, 5- H_{orto} -Ph); 8,20 (dd, 6H, $J = 1,8$ e $J = 7,4$ Hz, 10,15,20- H_{orto} -Ph); 8,41 (s, 1H, H-triazole); 8,82-8,87 (m, 8H, H- β); **UV/Vis (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$):** 426 (1620), 560 (13,8), 599 (7,04); **Fluorescência (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm:** 607; 659; $\phi_F = 0,030$; **MS (ESI) m/z :** calculado para $\text{C}_{57}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{OZn}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 918,2773; experimental: 918,2757.

5.8. Reação de Cu(I)AAC de porfirina 5 e propiolato de metilo (7)

O protocolo aqui seguido foi o mesmo de **5.7** ^[3]: num balão de fundo redondo de 25 mL, dissolveram-se em DMSO anidro (3 mL) a porfirina **5** (0,0325 g, 0,0397 mmol), ascorbato de sódio (0,0289 g,

0,146 mmol), sulfato de cobre penta-hidratado (0,0094 g, 0,0376 mmol) e propiolato de metilo (6,8 μ L, 0,0761 mmol). A reação ocorreu sob atmosfera de azoto (N_2), à temperatura ambiente, durante 1 hora, com agitação contínua e ao abrigo da luz. A mistura reacional foi diluída com acetato de etilo (100 mL) e lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl (100 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x150 mL). O conjunto de fases orgânicas foi lavado com uma solução aquosa saturada de NaCl (4x100 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, seguindo-se a sua filtração. De seguida, o crude foi evaporado até à secura. Após esta etapa, o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: diclorometano/metanol (95:5)), em que se isolou o produto desejado (conjugado 7) com cor púrpura (0,0250 g, 70% de rendimento).

Conjugado 7: RMN de ^1H (400,14 MHz, CD_3OD) δ : 1,71-1,78 (m, 2H, $-COCH_2CH_2-$); 2,01-2,09 (m, 2H, $-CH_2CH_2N-$); 2,51 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-COCH_2-$); 3,83 (s, 3H, $COOCH_3$); 4,50 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; $-CH_2N-$); 7,63-7,68 (m, 9H, 10,15,20- $H_{meta+para}$ -Ph); 7,84 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 5- H_{meta} -Ph); 8,04 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 5- H_{orto} -Ph); 8,09 (dd, 6H, $J = 2,4$ e $J = 6,1$ Hz, 10,15,20- H_{orto} -Ph); 8,53 (s, 1H, H-triazole); 8,72-8,77 (m, 8H, H- β); **RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CD_3OD) δ :** 23,7 ($-COCH_2CH_2-$); 30,7 ($-CH_2CH_2N-$); 37,1 ($-COCH_2-$); 51,4 ($-CH_2N-$); 52,5 ($-COOCH_3$); 119,2; 121,8; 127,4; 128,4 (CH-triazole); 129,7; 132,4; 135,6; 135,9; 139,2; 140,5; 140,7; 144,9; 151,4; 151,5; 162,5 ($-COOCH_3$); 174,1 ($-CONH-$); **UV/Vis (DMF) $\lambda_{m\acute{a}x}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [M^{-1}.cm^{-1}]$):** 425 (533); 559 (11,4); 599 (6,08); **Fluorescência (DMF) $\lambda_{m\acute{a}x}$, nm:** 607; 659; $\phi_F = 0,033$; **MS (ESI) m/z :** calculado para $C_{53}H_{40}N_8O_3Zn^+ [M+H]^+$: 900,2515; experimental: 900,2522.

5.9. Síntese do péptido PepNeg

5.9.1. Preparação da montagem e da resina e construção da sequência peptídica SGTQEEY

A síntese do péptido PepNeg, de sequência SGTQEEY, foi realizada por síntese peptídica em fase sólida, de acordo com um método já publicado ^[4]: num tubo de seringa, depositou-se resina Fmoc-Rink Amide MBHA (0,0862 g; funcionalização: 0,52 mmol g^{-1}), que foi inchada com DMF e diclorometano (por esta ordem, durante 30 minutos com cada um) e desprotegida com solução de piperidina 20% em DMF (confirmada pelo teste da ninidrina, em que se verificou uma solução de cor azul), foi construída a cadeia peptídica, de C-terminal para N-terminal (isto é, de Y para S), com ciclos alternados de acoplamento e desproteção, intercalados com passos de lavagem da resina e teste da ninidrina, para confirmação do sucesso do passo realizado. Nos passos de acoplamento, num pequeno frasco, uma mistura de aminoácido (AA) (na forma Fmoc-AA-OH), o agente de acoplamento HBTU, a base DIPEA foram dissolvidos no mínimo volume necessário de DMF. A mistura foi transferida para resina, permanecendo em agitação durante 1 hora. Ao fim deste tempo, foram feitas lavagens sucessivas com DMF (3 lavagens) e diclorometano (4 lavagens), por esta

ordem. De seguida, efetuou-se o teste da ninidrina, em que se observou a cor original (amarelo pálido), indicativo do sucesso do acoplamento. Quando o acoplamento não ocorreu ou não foi completo (cor azul), procedeu-se à sua repetição nas condições atrás referidas. Havendo acoplamento, procedeu-se à desproteção com uma solução de piperidina 20% em DMF, durante 20 minutos, sendo feitos os mesmos passos de lavagem realizados nos acoplamentos e o teste da ninidrina, sendo que a cor azul a indicativa do sucesso desta etapa. No fim da construção da cadeia peptídica, procedeu-se à desproteção do aminoácido *N*-terminal com solução de piperidina 20% em DMF, fazendo de seguida os mesmos passos de lavagem e teste da ninidrina.

5.9.2. Acoplamento de ácido 5-hexinóico em *N*-terminal

Estando a sequência peptídica concluída, procedeu-se ao acoplamento do ácido 5-hexinóico ao azoto terminal do péptido. Este foi pesado, em massas iguais, para dois frascos. Numa primeira fase, a um dos frascos com ácido 5-hexinóico, foi adicionado o agente de acoplamento EEDQ (3,1 equivalentes), sendo dissolvidos em diclorometano. A mistura foi transferida para a resina, ficando a reagir durante 5 horas, com agitação contínua. Findo este processo, filtrou-se e lavou-se a resina com tetrahidrofurano (THF) (3 lavagens) e diclorometano (3 lavagens), por esta ordem. Após esta etapa, ao outro frasco com ácido 5-hexinóico foi adicionado o agente de acoplamento EEDQ (3,1 equivalentes), sendo dissolvidos em diclorometano. Esta mistura foi adicionada à resina e ficou a reagir durante a noite. Em seguida, filtrou-se e lavou-se a resina com THF (6 lavagens) e diclorometano (6 lavagens), por esta ordem. Não foi realizado o teste da ninidrina nem a desproteção, apenas se deixou secar a resina.

5.9.3. Clivagem da peptidil-resina para obtenção do produto desejado

Após a resina se encontrar totalmente seca, foi transferida para um tubo Falcon. A clivagem foi realizada com recurso a um *cocktail* (2 mL) constituído por 95% de TFA, 2,5% de água desionizada e 2,5% de TiS, apenas se transferiu 1 mL deste *cocktail* de clivagem para o tubo Falcon, sendo estes colocado em agitação durante 2 horas, à temperatura ambiente, num agitador orbital. Após a conclusão desta fase, a solução de clivagem foi filtrada para outro tubo Falcon previamente lavado com TFA. Aqui foi utilizado o restante *cocktail* e TFA. Ao produto obtido a partir da clivagem foi adicionado MTBE, à temperatura ambiente. De seguida, foram feitas quatro extrações líquido-líquido sucessivas com água desionizada (4x25mL), em que as primeiras três frações de fase aquosa foram recolhidas para um matraz e a quarta para outro. As fases aquosas foram analisadas por HPLC-DAD (eluição por gradiente 0-100% de acetonitrilo) e LC-MS, nas quais se verificou que o produto obtido se encontrava puro, não sendo necessárias operações de purificação.

PepNeg: LC-MS *m/z* calculado para $C_{39}H_{55}N_9O_{16}^+$ $[M+H]^+$: 906,38; Experimental: 906,40.

5.10. Reação de click de porfirina 5 e péptido PepNeg (8)

O protocolo aqui seguido teve por base o que foi seguido em 5.7 e 5.8 [3, 5]: num balão de fundo redondo de 25 mL, dissolveram-se em DMSO anidro (3 mL), a porfirina 5 (0,0094 g; 0,0115 mmol), o péptido **PepNeg** (0,0179 g; 0,0198 mmol), ascorbato de sódio (0,0085 g; 0,0429 mmol) e sulfato de cobre penta-hidratado (0,0028 g; 0,0112 mmol). A reação ocorreu em atmosfera de N₂, à temperatura ambiente, durante 1 hora, com agitação contínua e ao abrigo da luz. Após o fim da reação, adicionou-se água desionizada (2 mL) à mistura reacional, sendo esta colocada numa membrana de diálise. Esta última foi depositada em água desionizada (1 L) com agitação contínua. A diálise ocorreu durante 4 dias, sendo o meio substituído de 12 em 12 horas. Nos primeiros dois dias, o meio era constituído apenas água desionizada, enquanto que nos restantes passou a ser constituído por uma solução aquosa de HCl a 1%. Terminada a diálise, o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon, tendo sido centrifugado durante 30 minutos a 6600 rpm.

Conjugado 8: MS (ESI) *m/z*: calculado para C₈₈H₉₁N₁₇O₁₇Zn⁺ [M+H]⁺: 1724,18; experimental: 1724,47.

5.11. Síntese de 5,10,15,20-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (9)

Esta porfirina foi sintetizada de acordo com um método já publicado [1]: a uma mistura de ácido acético glacial (300 mL) e nitrobenzeno (140 mL) em refluxo, foi adicionado pentafluorobenzaldeído (7,2 mL; 58,3 mmol) e pirrole (4 mL; 58 mmol), gota a gota. A reação ocorreu durante 45 minutos, à temperatura de 120°C. Ao fim de 1 hora de arrefecimento, o ácido acético glacial e o nitrobenzeno foram destilados a pressão reduzida. De seguida, purificou-se a porfirina 9 por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de diclorometano/hexano (2:8) e cristalizou-se a porfirina 8 com uma mistura de diclorometano/metanol.

Porfirina 9: RMN de ¹H (400,14 MHz, CDCl₃) δ: -2,91 (s, 2H, NH); 8,91 (s, 8H, H-β).

5.12. Cicloadição 1,3-DC de porfirina 9 com ileto de azometino (10)

Num balão de fundo redondo de 50 mL dissolveu-se a porfirina 9 (0,2000 g; 0,205 mmol) e foram feitas 3 adições, de 3 em 3 horas, de paraformaldeído (0,0308 g; 1,03 mmol) e glicina (0,0770 g; 1,03 mmol) em tolueno (25 mL) em refluxo e sob atmosfera de azoto. A reação ocorreu num tempo total de 9 horas, à temperatura de 120°C, com agitação contínua e ao abrigo da luz. Após arrefecimento da mistura, esta foi filtrada com filtro de algodão, tendo-se evaporado o tolueno. O resíduo sólido foi purificado por cromatografia em coluna, eluindo primeiro a porfirina 9 (0,1601 g; 26% de recuperação) com diclorometano/hexano (1:1) e depois a clorina NH não tratada com

clorofórmio/acetona (9:1). Obteve-se a clorina NH não tratada por evaporação desta até à secura. O resíduo obtido foi tratado por hidrólise ácida, em que este foi dissolvido numa mistura de TFA/água (9:1) (50 mL), durante 4 horas, à temperatura ambiente e com agitação contínua. De seguida, a mistura foi diluída em água e fez-se extração com clorofórmio. A fase orgânica foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio, em gelo. Após este passo, a fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura. Obteve-se a clorina **10** (0,3343 g; 53% de rendimento).

Clorina 10: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -1,82 (s, 2H, NH); 3,15 (dd, 2H, $J = 3,6$ e $J = 11,20$ Hz, H-pirrolidina); 3,41 (dd, 2H, $J = 7,6$ e $J = 11,20$ Hz, H-pirrolidina); 5,23 (d, 2H, $J = 4,0$ Hz, H-2,3); 8,40 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H- β); 8,48 (s, 2H, H- β); 8,71 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H- β); UV/Vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$): 405 (154); 652 (38,2); Fluorescência (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$, nm: 652.

5.13. *N*-alquilação da clorina 10 com *N*-(2-bromoetil)ftalimida (11)

Uma mistura de clorina **10** (0,1001 g; 0,0984 mmol), *N*-(2-bromoetil)ftalimida (0,0302 g; 0,119 mmol) e carbonato de potássio (0,0278 g; 0,201 mmol), foi dissolvida em DMF anidra (0,15 mL), num vaso de 10 mL. Este foi fechado, sendo a mistura reacional sujeita a aquecimento por micro-ondas, à temperatura de 75°C, à pressão máxima de 50 Psi e à potência máxima de 50 W, durante 30 minutos. Ao fim deste período de tempo, fez-se uma nova adição de *N*-(2-bromoetil)ftalimida (0,0306 g; 0,120 mmol) e repetiu-se um novo ciclo de 30 minutos de aquecimento, nas mesmas condições de pressão, temperatura e potência. No fim da reação, à mistura reacional foi adicionada água desionizada e gelo para que ocorresse precipitação, sendo removido o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em clorofórmio e seco com etanol absoluto, que por sua vez foi levado à secura no evaporador rotativo. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (eluente: clorofórmio/acetona (99:1)), sendo possível isolar o produto desejado, a clorina **11**, um composto de cor verde escuro (0,0904 g, 77% de rendimento).

Clorina 11: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -1,90 (s, 2H, NH); 2,54 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$); 2,64 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}-$); 3,30 (t, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-pirrolidina); 3,63 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-pirrolidina); 5,10 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz, H_{2,3}); 7,20-7,25 (m, 4H, H-Ph); 8,40 (d, 2H, $J = 4,9$ Hz, H- β); 8,50 (s, 2H, H- β); 8,71 (d, 2H, $J = 4,9$ Hz, H- β).

5.14. Hidrólise do grupo ftalimida da clorina 11 (12)

A síntese deste composto teve por base um protocolo já publicado ^[6]: num balão de pera, dissolveram-se em propan-2-ol/água (6:1) (0,45 mL), a clorina **11** (0,0099 g; $8,32 \times 10^{-3}$ mmol), boro-

hidreto de sódio (NaBH_4) (0,0026 g; 0,0687 mmol). A reação ocorreu durante 24 horas, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e com agitação contínua. No fim deste passo reacional, foi adicionada uma mistura de TFA/HCl (1:2) (0,15 mL) à mistura reacional, tendo este novo passo decorrido à temperatura de 85°C, durante 2 horas, com condensador aberto. Concluída esta etapa, a mistura reacional foi colocada em gelo, sendo neutralizada com uma solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1M, até pH 7. Em seguida, foram feitas três extrações líquido-líquido com diclorometano e água. A fase orgânica foi lavada com água (2x) e com solução aquosa saturada de NaCl (1x), sendo seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura no evaporador rotativo. Procedeu-se à purificação do produto obtido por cromatografia em placa (eluente: clorofórmio/metanol (9:1)), sendo possível isolar três frações, sendo a primeira correspondente ao produto desejado (clorina **12**), a segunda correspondente ao intermediário formado no primeiro passo reacional e, a terceira correspondeu à clorina **11** recuperada.

Clorina 12: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -1,82 (s, 2H, NH); 2,54-2,59, 2,84-2,88 e 3,33-3,37 (3 m, 8H, H-pirrolidina e $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$); 5,28 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz; $\text{H}_{2,3}$); 8,38 (d, 2H, $J = 4,8$ Hz, H- β); 8,48 (s, 2H, H- β); 8,71 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz, H- β)

5.15. Acoplamento do cloreto de dansilo à clorina 12 (13)

A síntese deste composto teve por base um protocolo já publicado ^[7]: uma mistura de clorina **11** (0,0130 g; 0,0123 mmol) e cloreto de dansilo (0,0041 g; 0,0152 mmol) foi dissolvida em DMF anidra (0,2 mL), num vaso de 10 mL. Este foi fechado, sendo a mistura reacional sujeita a aquecimento por micro-ondas, à temperatura de 80°C, à pressão máxima de 100 Psi e à potência máxima de 100 W, durante 15 minutos. Após este período de tempo, foi feita mais uma adição de cloreto de dansilo (0,0040 mg; 0,0148 mmol), sendo repetido um novo ciclo reacional. Terminada a reação, foram feitas sucessivas extrações líquido-líquido com água e acetato de etilo (3x40 mL). A fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl (3x50 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura no evaporador rotativo. O produto desejado (conjugado **13**) foi isolado por cromatografia em placa (eluente: clorofórmio/metanol (8:2)). Foi realizada análise por RMN de ^1H , no entanto a amostra encontrava-se muito diluída, o que levou a que se obtivesse um espetro com baixa resolução. No futuro, será necessário repetir a síntese deste composto, de forma a obtê-lo em quantidade apreciável para caracterização estrutural e estudo de propriedades fotofísicas.

5.16. Acoplamento do cloreto de dansilo à porfirina 3 (14)

A síntese deste composto teve por base um protocolo já estabelecido ^[7]: uma mistura de porfirina **3** (0,0133 g; 0,0176 mmol) e cloreto de dansilo (0,0058 g; 0,0215 mmol) foi dissolvida em DMF anidra

(0,2 mL), num vaso de 10 mL. Este foi fechado, sendo a mistura reacional sujeita a aquecimento por micro-ondas, à temperatura de 80°C, à pressão máxima de 100 Psi e à potência máxima de 100 W, durante 15 minutos. Após a reação, a mistura reacional foi vertida para um banho de gelo. Quando arrefecida, fizeram-se extrações líquido-líquido sucessivas com acetato de etilo (3x50 mL). A fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl (3x50 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada à secura no evaporador rotativo. O produto desejado (conjugado **14**) foi isolado por cromatografia em placa (eluente: clorofórmio/metanol (95:5)), obtendo-se 1,2 mg de composto (rendimento: 8%).

Conjugado 14: RMN de ^1H (400,14 MHz, CDCl_3) δ : -2,83 (s, 2H, NH); 2,92 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 7,03 (s, 1H, -NH); 7,29 (d, 3H, $J = 8,6$ Hz, H-Ph-dansilo); 7,62 (dd, 1H, $J = 7,4$ e $J = 8,6$ Hz, H_{Ar}); 7,69-7,81 (m, 12H, $\text{H}_{5,10,15,20}\text{-Ph}$); 7,95 (dd, 2H, $J = 2,0$ e $J = 6,5$ Hz, H-Ph-dansilo); 8,18-8,21 (m, 8H, H- β); 8,43 (dd, 1H, $J = 1,2$ e $J = 7,4$ Hz, $\text{H}_{\text{o,p-Ar}}$); 8,54 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{o,p-Ar}}$); 8,62 (t, 3H, $J = 4,5$ Hz, $\text{H}_{\text{o,p-Ph}}$); 8,65 (s, 1H, H_{Ph}); 8,79-8,83 (m, 7H, $\text{H}_{5,10,15,20}\text{-Ph}$) ; **RMN de ^{13}C (100,63 MHz, CDCl_3)** δ : 0,141; 29,8; 45,6; 115,5; 118,7; 118,9; 120,0; 120,3; 120,4; 123,3; 126,8; 127,9; 129,0; 130,1; 130,1; 130,9; 131,3; 134,4; 134,7; 135,2; 136,4; 139,4; 142,2; 152,5; **UV/Vis (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm ($\epsilon \times 10^3 [\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}]$):** 417 (86,2); 514 (3,46); 551 (1,72); 591 (1,15); 647 (0,950). **Fluorescência (DMF) $\lambda_{\text{máx}}$, nm:** 652; 717; **MS (ESI) m/z :** calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 863,3090; experimental: 863,3198; calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^-$ $[\text{M}]^-$: 861,3090; experimental: 861,3003

5.17. Referências

1. Gonsalves, A.M.d.A.R.; Varejão, J.M.T.B. e Pereira, M.M., *Some of new aspects related to the synthesis of meso-substituted porphyrins*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 1991. **28**: p. 635-640.
2. Dondi, R.; et al., *Flexible synthesis of cationic peptide-porphyrin derivatives for light-triggered drug delivery and photodynamic therapy*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2016. **14**(48): p. 11488-11501.
3. Staegemann, M.H.; et al., *A toolset of functionalized porphyrins with different linker strategies for application in bioconjugation*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2016. **14**(38): p. 9114-9132.
4. BACHEM, *Solid phase peptide synthesis - tips and tricks for solid phase peptide synthesis from the experts at BACHEM*. Bachem Group, 2016: p. 1-55.
5. Montalbetti, C.A.G.N. e Falque, V., *Amide bond formation and peptide coupling*. Tetrahedron, 2005. **61**(46): p. 10827-10852.
6. Osby, J.O.; Martin, M.G. e Ganem, B., *An exceptionally and deprotection of phthalimides*. Tetrahedron Letters, 1984. **25**(20): p. 2093-2096.
7. Leite, A.; et al., *Design of a Water Soluble Fluorescent 3-Hydroxy-4-Pyridinone Ligand Active at Physiological pH Values*. Journal of Fluorescence, 2016. **26**(5): p. 1773-1785.

Anexos

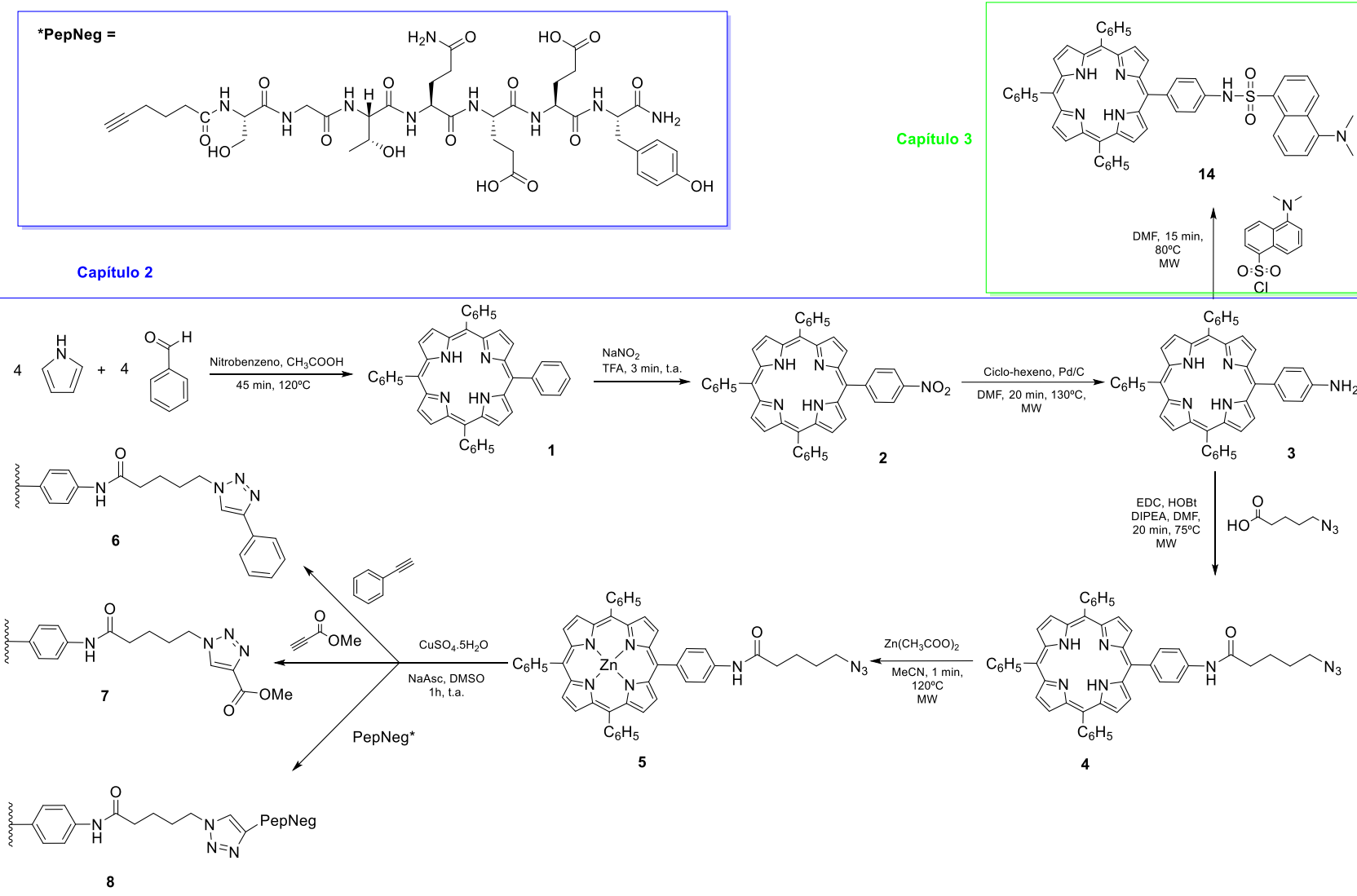


Figura A1 - Rota de síntese dos conjugados porfíricos na presente tese

Capítulo 3

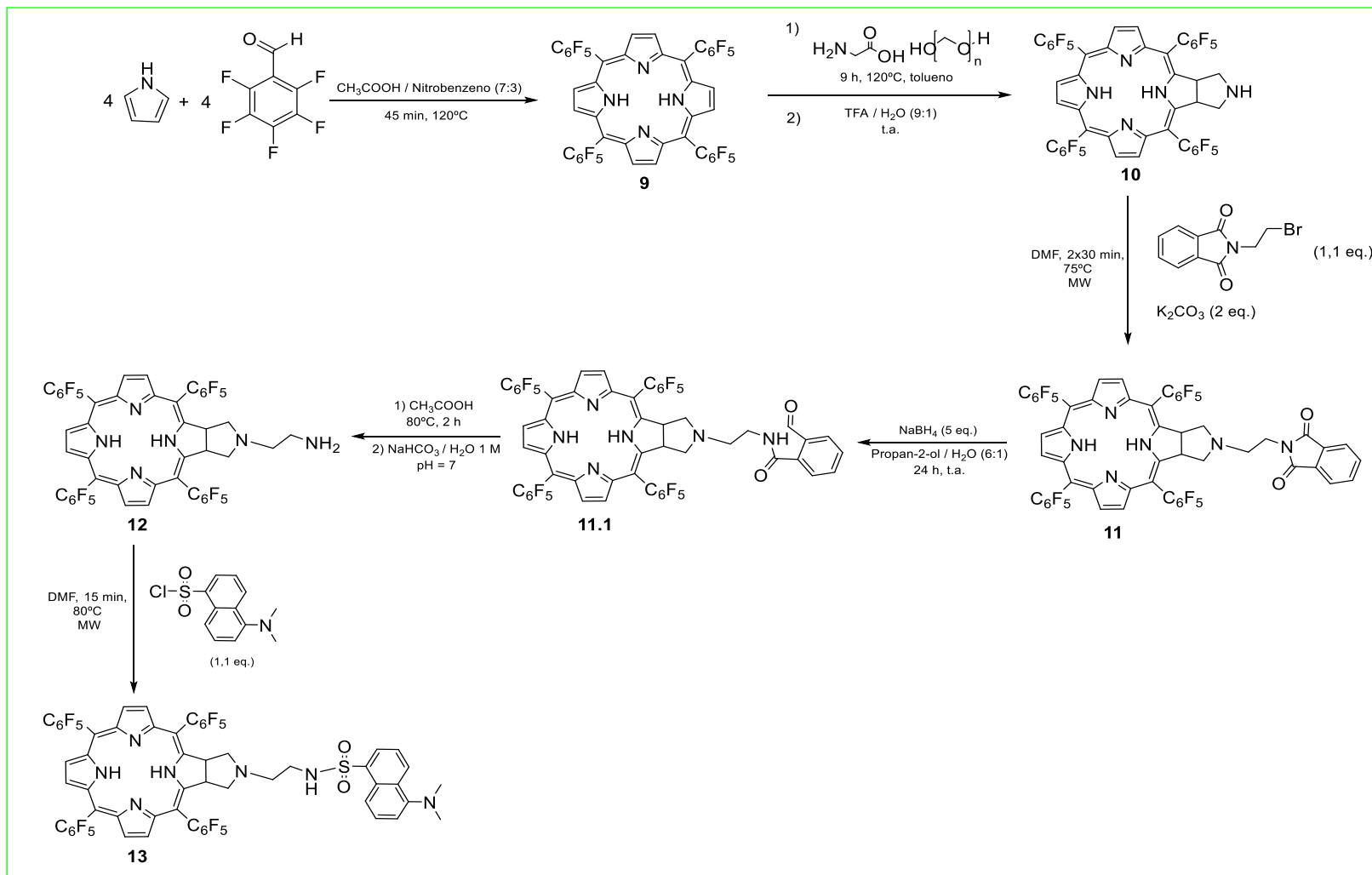


Figura A2 - Rota de síntese dos macrociclos porfíricos obtidos no Capítulo 3